



论文

糙刺参(*Stichopus horrens*)线粒体基因组及一种新的基因排列顺序

范嗣刚^{①②}, 胡超群^{①*}, 文菁^③, 张吕平^①^① 中国科学院南海海洋研究所海洋生物资源可持续利用重点实验室广东省应用海洋生物学重点实验室, 广州 510301;^② 中国科学院研究生院, 北京 100049;^③ 湛江师范学院生物学系, 湛江 524048

* 联系人, E-mail: cqhu@scsio.ac.cn

收稿日期: 2011-01-31; 接受日期: 2011-03-16

国家科技支撑计划(批准号: 2009BAB44B02)、广东省科技计划(批准号: 2007A020300007-15)和广东省海洋渔业科技项目(批准号: A200901E01 和 A200899E02)资助

摘要 线粒体基因组序列在后口动物进化研究中有着重要的作用. 本研究使用 PCR 方法获得糙刺参(*Stichopus horrens*)线粒体全基因组序列. 该序列全长 16257 bp, 包含 13 个蛋白编码基因, 22 个 tRNA 基因和 2 个 rRNA 基因. 除了一个蛋白编码基因(*nad6*)和 5 个 tRNA 基因(*tRNA^{Ser(UCN)}*, *tRNA^{Gln}*, *tRNA^{Ala}*, *tRNA^{Val}*, *tRNA^{Asp}*)在轻链上编码外, 其余的基因都在重链上编码. 糙刺参线粒体重链碱基有 30.8% A, 23.7% C, 16.2% G, 和 29.3% T 构成. 假定的线粒体控制区长 675 bp. 基因间间隔碱基长 1~50 bp, 共 227 bp. 11 个基因间有重叠碱基, 长 1~10 bp, 共 25 bp. 13 个蛋白编码基因起始密码子均为 ATG, 终止密码子大多为 TAA(*nad3* 和 *nad4* 的为 TAG). 亮氨酸编码频率最高(16.29%), 随后是丝氨酸(10.34%)和苯丙氨酸(8.37%). 所有的 22 个 tRNA 基因均能折叠成三叶草结构. 通过和其他 4 种海参的线粒体基因排列顺序比较, 本研究发现糙刺参的线粒体基因排列顺序是一种新的排列方式.

关键词

线粒体 DNA 序列全长

糙刺参

基因排列

海参纲

一般地, 所有的动物线粒体 DNA 都有 37 个基因: 13 个蛋白编码基因, 2 个 rRNA 基因(12S RNA 和 16S RNA)和 22 个 tRNA 基因^[1]. 线粒体 DNA 具有结构紧密, 拷贝数多, 进化速率快以及缺乏重组的特点, 以被广泛地应用于进化、遗传多样性和种类鉴定方面的研究^[2]. 用线粒体基因组序列研究后口动物的进化关系非常普遍^[3,4]. 除了线粒体序列外, 线粒体基因排列顺序也是一个重要的研究进化的分子标记^[1,5~7]. 目前研究发现, 线粒体基因组序列重排现象在棘皮

动物中广泛存在, 比较这些线粒体基因序列, 能解决一些棘皮动物更深层次的进化难题^[5,8~12].

海参(Sea cucumber, Holothurian)是棘皮动物门海参纲(Holothuroidea)所有物种的总称. 目前世界上的

缩略词: *atp6* 和 8: ATPase subunits 6 and 8; *cob*: cytochrome b; *cox1-3*: cytochrome c oxidase subunits I-III; *nad1-6* 和 4L: NADH dehydrogenase subunits 1-6 and 4L; *srRNA* 和 *lrRNA*: small and large subunits ribosomal RNA; *tRNA*: transfer RNA (tRNA) genes; bp: base pair(s); *L1*: *tRNA^{Leu(CUN)}*; *L2*: *tRNA^{Leu(UUR)}*; *S1*: *tRNA^{Ser(AGN)}*; *S2*: *tRNA^{Ser(UCN)}*

海参约有 1400 种^[13], 但这些海参的系统进化关系还没有完全研究清楚^[14]. 线粒体基因排列顺序相同的物种具有共同的祖先. 比较线粒体基因不同的排列顺序, 或许可以解决海参的系统进化方面的一些问题^[15].

糙刺参(*Stichopus horrens*, 海参纲, 刺参科, 刺参属)主要分布在太平洋海域. 从马来西亚到法属波利尼西亚的社会群岛, 从日本南部、夏威夷到新喀里多尼亚都有糙刺参的踪迹^[16]. 糙刺参身体为灰棕色, 并间杂灰白色斑点^[16]. 白天, 糙刺参躲藏在死珊瑚或石下, 夜里才出来活动^[17]. 在中国, 糙刺参具有食用价值^[18].

本研究对糙刺参线粒体全长进行描述和分析. 在和其他 4 种海参线粒体排列顺序比对后, 本研究发现糙刺参线粒体基因排列顺序是一种新的排列方式. 本研究为探索海参的系统进化提供了新的资料.

1 材料与方法

1.1 样品采集和鉴定

成体糙刺参取自中国西沙群岛. 分别剪取 2 种海参的背部肌肉组织, 用 100% 酒精固定, 带回实验室后, 放置在 -20℃ 中保存. 参照廖玉麟^[19]和 Massin 等人^[16]对糙刺参背部体壁骨片的描述, 用扫描电子显微镜对糙刺参骨片进行观察和物种鉴定. 骨片制备和扫描电子显微镜制样过程如下: 用 10% 的 NaClO 溶液处理糙刺参体壁 1~2 min 后, 产生的白色沉淀用蒸馏水清洗 4 次, 然后干燥, 再用离子溅射仪(Hitachi, E-1010)镀金膜, 最后用扫描电子显微镜(Hitachi, S-3400N)拍照观察.

1.2 DNA 提取

取约 30 mg 的背部肌肉组织, 根据试剂盒说明书, 用海洋生物 DNA 提取试剂盒(天根生化科技有限公司, 中国)提取 DNA. 得到的 DNA 放置在 -20℃ 保存备用.

1.3 PCR 扩增和测序

本研究通过一般 PCR 扩增和长 PCR 扩增得到糙刺参线粒体核苷酸全长序列. 所有的 PCR 反应均在 PCR 仪 PTC-100 (BioRad, 美国)中完成. 表 1 列出所用到的 PCR 引物序列及反应程序. 首先使用 3 对通用引物 16sb/coIer^[20], cobF424/cobR876^[21], cox3F/cox3R^[21] 和一对自行设计的引物 16s1F/16s1R 分别 PCR 扩增 cox1, cob, cox3 和 16S rRNA 这 4 条短的 DNA 序列(表 1).

PCR 反应体系为 50 μL, 反应混合物包括 1 μg 的 DNA 模板, 0.2 μmol L⁻¹ 的正/反向引物, 15 mmol L⁻¹ 的 MgCl₂, 100 μmol L⁻¹ 的 dNTP 和 2U Taq 酶(TaKaRa, 日本), ddH₂O 补足 50 μL. PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 随后用 DNA 胶回收试剂盒(天根生化科技有限公司, 中国)纯化琼脂糖凝胶产物, 再克隆到 PMD18-T 载体中(TaKaRa, 日本). 用相应的 PCR 引物检测重组子. 再将含有目的片段的重组子委托上海生工生物工程技术有限公司测序. 随后根据所得到的 DNA 序列, 设计如下 3 对引物: cox1-3F/cox1-3R, cox3-cobF/cox3-cobR 和 cob-16sF/cob-16sR (表 1), 进行长 PCR 扩增^[22]. PCR 反应体系为 50 μL, 反应混合物包括 1 μg 的 DNA 模板, 0.2 μmol L⁻¹ 的正/反向引物, 15 mmol L⁻¹ 的 MgCl₂, 200 μmol L⁻¹ 的 dNTP, 和 2.5 U Taq 酶(TaKaRa, 日本), ddH₂O 补足 50 μL. 所获得的 PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测后, 送样至上海生工生物工程技术有限公司, 用相应的引物直接测序.

1.4 序列分析

获得的 DNA 序列都经 NCBI 中 BLAST 检索进行确认, 然后用 DNASTAR 软件包的 SeqMan 软件(DNASTar, Madison, USA)进行拼接和人工校正. 根据仿刺参(*Apostichopus japonicus*)线粒体基因组^[12]来确定糙刺参线粒体的蛋白编码基因和 rRNA. 用 tRNAscan-SE 1.21 软件^[23], 确定 tRNA 基因. 用 MEGA4.0^[24]来计算糙刺参线粒体基因组的核苷酸的碱基构成和密码子偏好. 用公式 GC 偏好性=(G%-C%)/(G%+C%), AT 偏好性=(A%-T%)/(A%+T%)^[25]计算碱基偏好性. 用软件 OGDRAW v1.1^[26]做糙刺参线粒体基因组环状图.

1.5 线粒体基因排列顺序分析

从 Genbank 中获得其他 4 种海参的线粒体全基因组序列: *Holothuria forskali* (FN562582), 仿刺参^[12] (EU294194), *Parastichopus nigripunctatus* (AB525762), *Cucumaria miniata*^[27] (NC_005929), 进行海参纲线粒体基因排列顺序比对.

2 结果和讨论

2.1 糙刺参物种鉴定

糙刺参的背部体壁的骨片种类和形态如图 1 所

表 1 PCR 扩增糙刺参线粒体全基因组的引物^{a)}

顺序	引物名称	引物序列(5'→3')	PCR 反应条件	产物大小 (bp)	引物来源
1*	16s1F 16s1R	GAGACCAGGAAAGGACAATAAGATC TCGGTCTGAACTCAGATCATGTAG	35×(94℃ 30 s, 55℃ for 30 s, 72℃ for 1 min)	897	本研究
2**	16sb co1er	GACGAGAAGACCCTGTGGAGC GCTCGTGTRTCTACRTCCAT	35×(95℃ 30 s, 50℃ for 30 s, 72℃ for 1.5 min)	1528	[20]
3*	cobF424 cobR876	GGWTAYGTWYTWCCWTGRGGWCARAT GCRTAWGCRAAWARRAARTAYCAYTCWGG	35×(94℃ 30 s, 50℃ for 30 s, 72℃ for 1 min)	449	[21]
4*	cox3F cox3R	TGGTGGCGAGATGTTKNTCNGNA ACWACGTCKACGAAGTGTCARTATCA	35×(94℃ 30 s, 45℃ for 30 s, 72℃ for 1 min)	575	[21]
5*	cox1-3F cox1-3R	GGCATCCAGAAGTTTACATCCT TTGGAGATAGGCTTCTGTGGA	35×(94℃ 30 s, 48℃ for 30 s, 72℃ for 3.5 min)	3161	本研究
6*	cox3-cobF cox3-cobR	AGCAGCAGCCTGATACTGACACTTC TCATACTCACTGTACGACGGTTTCTCC	35×(94℃ 30 s, 49℃ for 30 s, 72℃ for 4 min)	4880	本研究
7*	cob-16sF cob-16sR	CAACAGGGCTAGACAGAAGATACGAC GGTTTAACGCTTACCGAAATGATGG	35×(94℃ 30 s, 46℃ for 30 s, 72℃ for 5 min)	5855	本研究

a) * 94℃ 预变性 2 min, 随后 35 个循环如表中所示, 最后 72℃ 延伸 10 min; ** 95℃ 预变性 1 min, 50℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 90 s. 随后 35 个循环如表中所示. 最后 72℃ 延伸 10 min

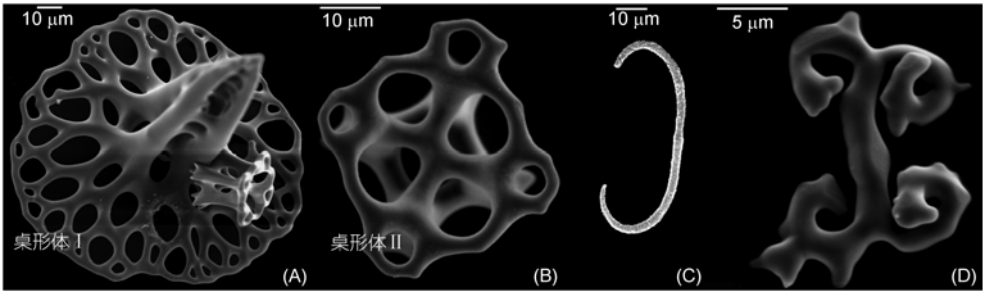


图 1 糙刺参背部体壁骨片图

(A) 桌形体 I 和桌形体 II; (B) 桌形体 2; (C) C 形体; (D) 花纹样体

示: 2 种桌形体, C 形体和花纹样体(图 1). 骨片的形态和大小和其他人的描述^[16,19]. 桌形体 I 呈大头针状, 底盘直径为 110~130 μm. 桌形体 II 底盘直径为 30~35 μm, 周边光滑, 中间有 4 个大穿孔和 4~10 个小孔. C 形体有 20~50 μm 长, 花纹样体有 17~30 μm 长. 桌形体 I 是糙刺参的标志性骨片^[16,28], 据此可确定所采海参为糙刺参(图 1(A)).

2.2 糙刺参线粒体全基因组构成

本研究使用一般 PCR 和长 PCR 方法获得糙刺参线粒体全基因组序列. 和大多数后口动物一样, 糙刺参的线粒体为双链闭合环状结构, 长 16257 bp, 含有 13 个蛋白编码基因, 22 个 tRNA 基因和 2 个 rRNA 基因(图 2 和表 2)^[1]. 糙刺参线粒体基因组长度在海参线粒体基因组长度范围内, 即 15841 bp (*Holothuria forskali*)~17538 bp (*Cucumaria miniata*)(表 3). 除了一

个蛋白编码基因 *nad6* 和 5 个 tRNA(*tRNA^{Ser(UCN)}*, *tRNA^{Gln}*, *tRNA^{Ala}*, *tRNA^{Val}*, *tRNA^{Asp}*)在轻链上编码, 其余 31 个线粒体基因都在重链上(表 2 和图 2). 重链的碱基组成为 30.8% A, 23.7% C, 16.2% G 和 29.3% T. 仿刺参和 *P. nigripunctatus* 的 GC 含量为 38.1%, *H. forskali* 的为 37.8%, *C. miniata* 的为 36.2%, 都比糙刺参线粒体的 GC 含量(39.9%)低. 5 种海参线粒体的 AT 碱基偏度均为正(0.010~0.119), GC 碱基偏度均为负(−0.271~−0.055), 说明海参线粒体有 A 和 C 偏好性. 糙刺参线粒体序列已递交到 GenBank, 登录号为 HQ000092.

2.3 蛋白编码基因

糙刺参线粒体 13 蛋白编码基因比其他 4 种海参的线粒体蛋白编码基因要长, 为 11397 bp(表 3). 13 个蛋白编码基因中, 最长的为 *nad5*, 有 1845 bp, 最短的

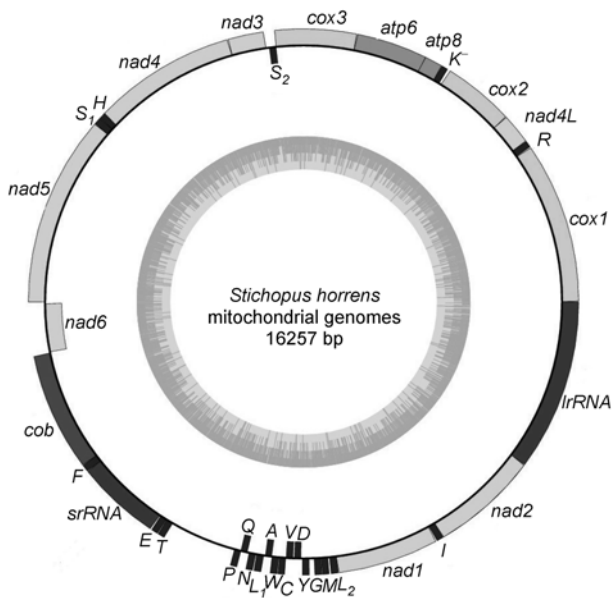


图2 糙刺参线粒体基因组图

在重链上编码的基因位于环形外, 在轻链上编码的基因位于环形内。
内环表示 GC 含量

为 *atp8*, 有 177 bp(表 2)。6 个蛋白基因有基因重叠现象: *nad4* 和 *tRNA^{His}* 有 10 核苷酸重叠, *atp8* 和 *atp6* 有

7 个核苷酸重叠, *cox3* 和 *tRNA^{Ser(UCN)}* 有 2 个核苷酸重叠, *tRNA^{Lys}* 和 *atp8* 有 1 个核苷酸重叠, *tRNA^{Leu(UUR)}* 和 *nad1* 有一个核苷酸重叠(表 2)。13 个蛋白编码基因的起始密码子均为 ATG。除 *nad3* 和 *nad4* 的终止密码子为 TAG, 其余 11 个蛋白编码基因(*atp6*, *atp8*, *cob*, *cox1-3*, *nad1-2*, *nad4L*, *nad5-6*)的终止密码子为 TAA(表 2)。13 个蛋白编码基因有 3799 个密码子。其中编码亮氨酸的密码子最多, 占 16.29%, 随后为编码丝氨酸, 异亮氨酸和苯丙氨酸的密码子, 分别占 10.34%, 9.61%和 8.37%。13 个蛋白编码基因的 GC 含量中, 最高为 43.7% (*nad3*), 最低为 32.8% (*atp8*) (表 5)。GC 碱基偏好均为负(−0.399~−0.105), 说明有 C 碱基偏好性。4 个蛋白编码基因(*atp8*, *nad4*, *nad5* 和 *nad6*)偏好 A 碱基, 其他 9 个蛋白编码基因偏好 T 碱基。

2.4 tRNA 和 rRNA

糙刺参线粒体有 22 tRNA, 长度在 65 bp (*tRNA^{Lys}*) 至 73 bp (*tRNA^{Leu(UUR)}*)之间。与 *A. japonicus* 线粒体一样^[12], *tRNA^{Pro}* 和 *tRNA^{Gln}* 之间有 4 个重叠核苷酸(表 2)。所有的 tRNA 基因都能折叠成三叶草二级结构。22 个 tRNA 的 GC 含量为 37.2%, 介于其他 4 种海参 tRNA

表 2 糙刺参线粒体基因组结构

基因	链	位置	大小(bp)	起始密码子	终止密码子	反密码子	间隔序列*
<i>cox1</i>	+	1~1554	1554	ATG	TAA		5
<i>tRNA^{Arg}</i>	+	1560~1627	68			TCG	0
<i>Nad4L</i>	+	1628~1924	297	ATG	TAA		0
<i>cox2</i>	+	1925~2614	690	ATG	TAA		20
<i>tRNA^{Lys}</i>	+	2635~2699	65			CTT	−1
<i>atp8</i>	+	2699~2875	177	ATG	TAA		−7
<i>atp6</i>	+	2869~3552	684	ATG	TAA		2
<i>cox3</i>	+	3555~4337	783	ATG	TAA		−2
<i>tRNA^{Ser(UCN)}</i>	−	4336~4406	71			TGA	32
<i>Nad3</i>	+	4439~4783	345	ATG	TAG		4
<i>Nad4</i>	+	4788~6158	1371	ATG	TAG		−10
<i>tRNA^{His}</i>	+	6149~6216	68			GTG	2
<i>tRNA^{Ser(AGN)}</i>	+	6219~6286	68			GCT	0
<i>ND5</i>	+	6287~8131	1845	ATG	TAA		12
<i>ND6</i>	−	8144~8632	489	ATG	TAA		8
<i>cob</i>	+	8641~9783	1143	ATG	TAA		0
<i>tRNA^{Phe}</i>	+	9784~9854	71			GAA	0
<i>srRNA</i>	+	9855~10674	820				0
<i>tRNA^{Glu}</i>	+	10675~10743	69			TTC	3
<i>tRNA^{Thr}</i>	+	10747~10816	70			TGT	0
假定控制区	+	10817~11491	675				0

续表 2

基因	链	位置	大小(bp)	起始密码子	终止密码子	反密码子	间隔序列*
<i>tRNA^{Pro}</i>	+	11492~11558	67			TGG	-4
<i>tRNA^{Gln}</i>	-	11555~11624	70			TTG	17
<i>tRNA^{Asn}</i>	+	11642~11710	69			GTT	8
<i>tRNA^{Leu(CUN)}</i>	+	11719~11790	72			TAG	14
<i>tRNA^{Ala}</i>	-	11805~11872	68			TGC	1
<i>tRNA^{Trp}</i>	+	11874~11943	70			TCA	3
<i>tRNA^{Cys}</i>	+	11947~12013	67			GCA	1
<i>tRNA^{Val}</i>	-	12015~12086	72			TAC	11
<i>tRNA^{Asp}</i>	-	12098~12165	68			GTC	13
<i>tRNA^{Tyr}</i>	+	12179~12246	68			GTA	50
<i>tRNA^{Gly}</i>	+	12297~12366	70			TCC	2
<i>tRNA^{Met}</i>	+	12369~12437	69			CAT	12
<i>tRNA^{Leu(UUR)}</i>	+	12450~12522	73			TAA	-1
<i>nad1</i>	+	12522~13493	972	ATG	TAA		7
<i>tRNA^{Ile}</i>	+	13501~13568	68			GAT	0
<i>nad2</i>	+	13569~14615	1047	ATG	TAA		0
<i>IrRNA</i>	+	14616~16257	1642				0

* 正数表示基因间间隔碱基数. 负数表示重叠碱基数

表 3 海参线粒体基因组的长度, 碱基构成和偏好性

物种	长度(bp)	A%	T%	G%	C%	GC%	AT 偏好性	GC 偏好性
基因组								
<i>H. forskali</i>	15841	31.4	30.8	16.4	21.4	37.8	0.010	-0.132
<i>P. nigripunctatus</i>	16122	31.7	30.1	18.0	20.1	38.1	0.026	-0.055
<i>A. japonicus</i>	16096	31.8	30.1	17.9	20.2	38.1	0.027	-0.060
<i>S. horrens</i>	16257	30.8	29.3	16.2	23.7	39.9	0.025	-0.188
<i>C. miniata</i>	17538	35.7	28.1	13.2	23.0	36.2	0.119	-0.271
蛋白编码基因								
<i>H. forskali</i>	11365	29.0	33.1	16.2	21.6	37.8	-0.066	-0.143
<i>P. nigripunctatus</i>	11379	29.0	32.4	18.1	20.5	38.6	-0.055	-0.062
<i>A. japonicus</i>	11379	29.1	32.3	18.0	20.6	38.6	-0.052	-0.067
<i>S. horrens</i>	11397	28.3	31.5	16.0	24.2	40.2	-0.054	-0.204
<i>C. miniata</i>	11339	32.7	29.6	14.0	23.7	37.7	0.050	-0.257
tRNA								
<i>H. forskali</i>	1513	33.0	27.7	19.6	19.7	39.3	0.087	-0.003
<i>P. nigripunctatus</i>	1518	31.9	30.1	19.0	19.0	38.0	0.029	0.000
<i>A. japonicus</i>	1518	32.1	30.1	18.8	19.0	37.8	0.032	-0.005
<i>S. horrens</i>	1521	33.1	29.7	18.7	18.5	37.2	0.054	0.005
<i>C. miniata</i>	1506	34.3	31	16.8	17.9	34.7	0.051	-0.032
rRNA								
<i>H. forskali</i>	2407	36.6	24.8	18.7	19.9	38.6	0.192	-0.031
<i>P. nigripunctatus</i>	2390	37.2	24.4	20.5	17.9	38.4	0.208	0.068
<i>A. japonicus</i>	2387	37.8	24.3	19.8	18.1	37.9	0.217	0.045
<i>S. horrens</i>	2462	35.9	24.3	18.6	21.2	39.8	0.193	-0.065
<i>C. miniata</i>	2200	41.2	23.9	15.5	19.5	35.0	0.266	-0.114

表 4 糙刺参线粒体 13 个蛋白编码基因的密码子使用情况

氨基酸	密码子	数目	频率(%)	氨基酸	密码子	数目	频率(%)
Phe	TTT	187	4.92	Tyr	TAT	43	1.13
	TTC	131	3.45		TAC	64	1.68
Leu	TTA	132	3.47	Term	TAA	11	0.29
	TTG	44	1.16		TAG	2	0.05
Leu	CTT	145	3.82	His	CAT	36	0.95
	CTC	111	2.92		CAC	54	1.42
	CTA	148	3.90	Gln	CAA	66	1.74
	CTG	39	1.03		CAG	19	0.50
Ile	ATT	130	3.42	Asn	AAT	36	0.95
	ATC	83	2.18		AAC	53	1.40
	ATA	155	4.08		AAA	116	3.05
Met	ATG	86	2.26	Lys	AAG	57	1.50
Val	GTT	59	1.55	Asp	GAT	21	0.55
	GTC	41	1.08		GAC	50	1.32
	GTA	92	2.42	Glu	GAA	80	2.11
	GTG	18	0.47		GAG	15	0.39
Ser	TCT	70	1.84	Cys	TGT	22	0.58
	TCC	92	2.42		TGC	19	0.50
	TCA	80	2.11	Trp	TGA	78	2.05
	TCG	19	0.50		TGG	20	0.53
Pro	CCT	51	1.34	Arg	CGT	8	0.21
	CCC	41	1.08		CGC	6	0.16
	CCA	68	1.79		CGA	44	1.16
	CCG	15	0.39		CGG	16	0.42
Thr	ACT	62	1.63	Ser	AGT	13	0.34
	ACC	71	1.87		AGC	25	0.66
	ACA	86	2.26		AGA	91	2.40
	ACG	16	0.42		AGG	3	0.08
Ala	GCT	48	1.26	Gly	GGT	41	1.08
	GCC	97	2.55		GGC	29	0.76
	GCA	81	2.13		GGA	97	2.55
	GCG	25	0.66		GGG	41	1.08

表 5 糙刺参线粒体蛋白编码基因的碱基组成及偏好性

基因	长度(bp)	碱基构成(%)					AT 偏好性	GC 偏好性
		A	C	G	T	GC		
<i>cox1</i>	1554	25.8	23.1	18.7	32.4	41.8	-0.113	-0.105
<i>nad4L</i>	297	28.3	24.2	10.4	37.0	34.6	-0.133	-0.399
<i>cox2</i>	690	30.0	24.3	14.9	30.7	39.2	-0.012	-0.240
<i>atp8</i>	177	35.6	20.9	11.9	31.6	32.8	0.060	-0.274
<i>atp6</i>	684	29.7	24	13.5	32.9	37.5	-0.051	-0.280
<i>cox3</i>	783	27.6	23.9	18.4	30.1	42.3	-0.043	-0.130
<i>nad3</i>	345	23.8	30.1	13.6	32.5	43.7	-0.155	-0.378
<i>nad4</i>	1371	31.7	24.2	13.6	30.5	37.8	0.019	-0.280
<i>nad5</i>	1845	33.2	24.9	14.5	27.4	39.4	0.096	-0.264
<i>nad6</i>	489	44.6	25.6	15.1	14.7	40.7	0.504	-0.258
<i>cob</i>	1143	28.0	26.6	16.1	29.3	42.7	-0.023	-0.246
<i>nad1</i>	972	25.8	23.9	17.8	32.5	41.7	-0.115	-0.146
<i>nad2</i>	1047	27.2	25.1	15.1	32.6	40.2	-0.090	-0.249
平均值	877	30.1	24.7	15.3	14.9	39.6		

的 GC 含量之间(表 3).

糙刺参线粒体的 *lrRNA* 和 *srRNA* 经过 NCBI 中 BLAST 确定. 这 2 个 rRNA 都是在重链上(表 2). *lrRNA* 位于 *nad2* 和 *cox1* 之间, 长 1642 bp. *srRNA* 位于 *tRNA^{Phe}* 和 *tRNA^{Glu}* 之间, 长 820 bp. 5 种海参中, 糙刺参线粒体 rRNA 的 GC 含量最高(39.8%).

2.5 非编码区

糙刺参线粒体非编码序列长 902 bp. 其中, 最长的一段非编码序列长 675 bp(表 2). 这段非编码序列位于含量较高(AT%=58.1%)而且和仿刺参线粒体基因组的假定控制区位置一致: 均在 *tRNA^{Thr}* 和 *tRNA^{Pro}* 之间, 因此, 这段序列为糙刺参线粒体的假定控制区. 第二长的非编码序列位于 *tRNA^{Tyr}* 和 *tRNA^{Gly}* 之间, 长 50 bp, AT 含量为 60%.

2.6 基因重排

分析线粒体基因排列顺序是研究进化的一种重要方法^[15]. 在过去数十年间, 有一些棘皮动物线粒体基因排列顺序的报道^[5,1,8,11,12]. 线粒体基因排列顺序相同的生物来源于同一个祖先^[11]. 线粒体基因重排的机制有倒置(inversion), 转换(transposition), 反转换(reverse transposition)和串联复制随机丢失(tandem-duplication-random-loss, TDRL)^[8].

本研究对目前已有的 5 个海参线粒体基因组序列排列顺序进行分析. 仿刺参、*P. nigripunctatus* 和 *H. forskali* 线粒体基因排列顺序一致. 将这种排列顺序暂定参照顺序(图 3). *C. miniata* 的线粒体基因排列在参照顺序的基础上发生了 TDRL 事件^[5]. 糙刺参在参照顺序的基础上发生转换事件: *tRNA^{Met}* 基因(M)从 *tRNA^{Val}* 基因(V)的 3' 末端转换到 *tRNA^{Gly}* (G)的 3' 末端(图 3). 这进一步验证在线粒体基因组中, tRNA 基因可能是最活跃的元件. 在海参线粒体中, 糙刺参线粒体基因排列顺序是一种新的排列方式. Shen 等人^[12]对已有的 21 个棘皮动物线粒体基因序列顺序进行了比对. 基于 Shen 等人^[12]的研究结果, 发现糙刺参的线粒体基因顺序在棘皮动物中也是唯一的. 同时获得另一种刺参属海参的基因组全长序列, 其基因排列顺序和糙刺参的一致(数据未提供). 因此, 这种基因排列顺序很可能是刺参属专有的. 不过, 还需要更多的海参线粒体基因组序列来验证这个假设.

3 结论

本研究对糙刺参线粒体全长进行了描述和分析, 并发现了海参纲中一种新的线粒体基因排列顺序. 这个结果为海参乃至棘皮动物的进化研究提供了新的数据.

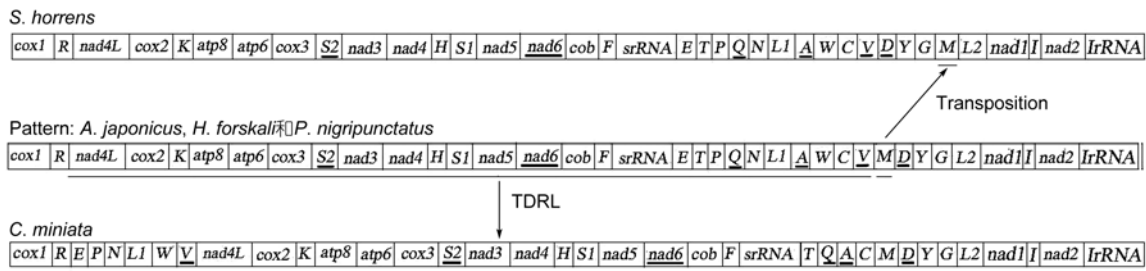


图 3 5 种海参的线粒体基因排列顺序

下画线表示在轻链上编码的基因

参考文献

- Boore J. Animal mitochondrial genomes. Nucl Acids Res, 1999, 27: 1767–1780
- Cuore J, Kocher T. Mitogenomics: digging deeper with complete mitochondrial genomes. Trends Ecol Evol, 1999, 14: 394–398
- Cohen B, Ameiziane N E, leaume M, et al. Crinoid phylogeny: a preliminary analysis (Echinodermata: Crinoidea). Mar Biol, 2004, 144: 605–617
- Kerr A, Janies D A, Clouse R M, et al. Molecular phylogeny of coral-reef sea cucumbers (Holothuriidae: Aspidochirota) based on 16S mitochondrial ribosomal DNA sequence. Mar Biotechnol, 2005, 7: 53–60

- 5 Arndt A, Smith M. Mitochondrial gene rearrangement in the sea cucumber genus *Cucumaria*. *Mol Biol Evol*, 1998, 15: 1009–1016
- 6 Ren Z M, Zhu B, Ma E, et al. Complete nucleotide sequence and gene arrangement of the mitochondrial genome of the crab-eating frog *Fejervarya cancrivora* and evolutionary implications. *Gene*, 2009, 441: 148–155
- 7 Sankoff D, Leduc G, Antoine N, et al. Gene order comparisons for phylogenetic inference: Evolution of the mitochondrial genome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 6575–6579
- 8 Perseke M, Fritzsche G, Ramsch K, et al. Evolution of mitochondrial gene orders in echinoderms. *Mol Phylogenet Evol*, 2008, 47: 855–864
- 9 Smith M, Arndt A, Gorski S, et al. The phylogeny of echinoderm classes based on mitochondrial gene arrangements. *J Mol Evol*, 1993, 36: 545–554
- 10 Smith M, Banfield D K, Doteval K, et al. Gene arrangement in sea star mitochondrial DNA demonstrates a major inversion event during echinoderm evolution. *Gene*, 1989, 76: 181–185
- 11 Scouras A, Smith M J. A novel mitochondrial gene order in the crinoid echinoderm *Florometra serratissima*. *Mol Biol Evol*, 2001, 18: 61–73
- 12 Shen X, Tian M, Liu Z H, et al. Complete mitochondrial genome of the sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Echinodermata: Holothuroidea): The first representative from the subclass Aspidochirotacea with the echinoderm ground pattern. *Gene*, 2009, 439: 79–86
- 13 Smiley S. Holothuroidea. In: Harrison F W, Chia F S, eds. *Microscopic Anatomy of Invertebrates*, Vol 14, Echinodermata. New York: Wiley-Liss, 1994. 401–471
- 14 Lacey K, McCormack G P, Keegan B F, et al. Phylogenetic relationships within the class holothuroidea, inferred from 18S rRNA gene data. *Mar Biol*, 2005, 147: 1149–1154
- 15 Boore J, Brown W. Big trees from little genomes: mitochondrial gene order as a phylogenetic tool. *Curr Opin Genet Dev*, 1998, 8: 668–674
- 16 Massin C, Zulfigar Y, Hwai T S, et al. The genus *Stichopus* (Echinodermata: Holothuroidea) from the Johore Marine Park (Malaysia) with the description of two new species. *Bulletin de l'Institut Royal des Sciences Naturelles de Belgique. Biologie*, 2002, 72: 73–99
- 17 Hearn A, Pinillos F. Baseline information on the warty sea cucumber *Stichopus horrens* in Santa Cruz, Galapagos, prior to the commencement of an illegal fishery. *Beche-de-Mer*, 2006, 24: 3–10
- 18 Chen J. Overview of sea cucumber farming and sea ranching practices in China. *SPC Beche-de-mer*, 2003, 18: 18–23
- 19 Liao Y L. *Fauna Sinica Phylum Echinodermata Class Holothuroidea*. Beijing: Science Press, 1997
- 20 Arndt A, Marquez C, Lambert P, et al. Molecular phylogeny of eastern Pacific sea cucumbers (Echinodermata: Holothuroidea) based on mitochondrial DNA sequence. *Mol Phylogenet Evol*, 1996, 6: 425–437
- 21 Boore J, Macey J, Medina M. Sequencing and comparing whole mitochondrial genomes of animals. *Methods Enzymol*, 2005, 395: 311–348
- 22 Cheng S, Chang S Y, Gravitt P, et al. Long PCR. *Nature*, 1994, 23: 685–685
- 23 Lowe T M, Eddy S R. tRNAscan-SE: A program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucl Acids Res*, 1997, 25: 955–964
- 24 Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*, 2007, 24: 1596–1599
- 25 Perna N, Kocher T. Patterns of nucleotide composition at fourfold degenerate sites of animal mitochondrial genomes. *J Mol Evol*, 1995, 41: 353–358
- 26 Lohse M, Drechsel O, Bock R. OrganellarGenomeDRAW (OGDRAW): a tool for the easy generation of high-quality custom graphical maps of plastid and mitochondrial genomes. *Curr Genet*, 2007, 52: 267–274
- 27 Scouras A, Beckenbach K, Arndt A, et al. Complete mitochondrial genome DNA sequence for two ophiuroids and a holothuroid: the utility of protein gene sequence and gene maps in the analyses of deep deuterostome phylogeny. *Mol Phylogenet Evol*, 2004, 31: 50–65
- 28 Byrne M, Rowe F, Uthicke S. Molecular taxonomy, phylogeny and evolution in the family Stichopodidae (Aspidochirotida: Holothuroidea) based on COI and 16S mitochondrial DNA. *Mol Phylogenet Evol*, 2010, 3: 1068–1081