

# 岩牡蛎和长牡蛎的线粒体 \* \$' !G@SFS7RG 快速鉴定#

刘凯凯, 李! 琪##

(海水养殖教育部重点实验室(中国海洋大学), 山东 青岛 /44110)

摘! 要: 岩牡蛎(*Crassostrea nippona*)与长牡蛎(*Crassostrea gigas*)是世界上 / 种重要的海产双壳经济贝类。两种牡蛎形态相似, 较易混淆, 目前没有快速准确的鉴别方法。本研究采用 G@SFS7RG 技术首次从分子水平上鉴定了岩牡蛎与长牡蛎。利用通用引物与本研究开发引物扩增 / 种牡蛎的线粒体 24H; \* \$' 与 @#( 基因片段, 并对扩增出的目的基因片段进行了测序。对测序结果进行限制性内切酶特异性位点分析, 选取了同一种限制性核酸内切酶 *Alu*( 对 G@S 产物进行酶切, 并用 1% 琼脂糖凝胶检测 G@S 产物的酶切结果。结果表明, 岩牡蛎与长牡蛎 G@S 产物经 *Alu*( 酶切后产生了大小不同的酶切片段, 根据酶切图谱可有效鉴别岩牡蛎与长牡蛎。这种简单、可靠、经济的 G@SFS7RG 鉴定方法, 能够为岩牡蛎养殖新品种的开发提供技术支撑。

关键词: 岩牡蛎; 长牡蛎; 线粒体 \* \$' ; G@SFS7RG; 物种鉴定

中图分类号: H 46V; ] 25 ! ! ! ! ! 文献标志码: ' ! ! ! ! ! 文章编号: 245/F3259/(126)2/ II F12514

DOI: 21 V24992MNH?VPD\_ZV12611. 2

引用格式: 刘凯凯, 李琪. 岩牡蛎和长牡蛎的线粒体 \* \$' !G@SFS7RG 快速鉴定[ ]V中国海洋大学学报(自然科学版), /126, 96(增II): 25//V

R!&!&F!&?, R! ]?V7-EODEN? ?-CK-KY! *Crassostrea nippona*!<-D C. *gigas*Z-EBDK=G@SFS7RGKY: C\* \$' [ ]VGB?KDF N!KY!#AB=!&=>XBEQ!KY!@P=<, /126, 96(HB VI): 25//V

!! 牡蛎是世界性广布种类, 是我国乃至世界最重要的海产经济贝类之一。/124 年中国牡蛎养殖产量达 90 万 t, 居世界首位<sup>[2]</sup>。长牡蛎(*Crassostrea gigas*) 又称太平洋牡蛎, 是我国北方沿海最主要的养殖种类。在北方海域长牡蛎的繁殖期在每年的 3~6 月, 此时体内大部分营养用于繁殖后代, 体内糖原大量消耗, 软体部重量急剧减少, 口感差, 不宜供应市场。因此, 牡蛎养殖业亟需引进优良牡蛎新品种来供应夏季市场。

岩牡蛎(*Crassostrea nippona*), 又称夏牡蛎, 属珍珠贝目(GSKD)牡蛎科(#EC8D8), 主要分布在日本、韩国等东亚地区, 具有抗病能力强、适应范围广、生长速度快、产量高等特点。岩牡蛎产卵期在 6~ 月, 且有多批次放精产卵的特点, 夏季体内糖原含量仍保持在较高水平, 味道较好, 弥补了长牡蛎夏季产卵不能上市的空缺, 深受市场欢迎<sup>[1]</sup>。

为了丰富我国牡蛎的养殖种类, 我们从日本引进岩牡蛎进行人工育苗和良种选育。在引种繁育中发现, 岩牡蛎与长牡蛎成体区别明显, 但稚贝不易区分。

由于牡蛎的外壳可塑性较强和分布区域的重叠性, 仅仅依据外部形态学特征鉴定牡蛎种类存在很强的主观因素, 这给牡蛎新品种的选育与养殖带来极大困难。因此, 迫切需要一种快速有效的鉴别岩牡蛎与长牡蛎的技术方法。

聚合酶链式反应 F 限制性片段长度多态性分析(G@SFS7RG) 技术是一种常用的快速简便分析物种组成的方法<sup>[3]</sup>, 与 G@S 产物测序的序列对比鉴定方法相比, 其操作简单、快捷, 节约成本。本研究基于岩牡蛎与长牡蛎 24H; \* \$' 与 @#( 基因片段开发了一种快速高效的 G@SFS7RG 鉴定技术, 首次从分子生物学水平上鉴别区分这 / 种重要的经济贝类。

## 2! 材料和方法

### 2.1 实验材料

实验所用的岩牡蛎与长牡蛎取自山东荣成养殖基地。每种牡蛎各取壳高 / ~ 0N 的稚贝 26 个个体, 解剖取闭壳肌, 于 F 61 i 超低温冰箱保存, 用于提取

! #! 基金项目: 山东省科技发展计划项目(/124 \*' H14' 14); 青岛市产业培育计划项目(250049-FP)资助

HB | K GDZ! HNB-NB <-DA8NP4KK^! GK^ < ! K! H R = DK = V G KX = NB / 124 \*' H14' 14); (=DHC?<! \* 88K : 8CG KMBCKY! ]?<DK (250049-FP)

收稿日期: /1261013; 修订日期: /12613/0

作者简介: 刘凯凯(2./F), 男, 硕士生。; F: &: 219110 045@LLWK

! ##! 通讯作者:; F: &: L244@KBN8DBW+

\*\$'。

2V G@S 扩增与测序

采用常规“酚—氯仿”抽提法提取样品基因组\*\$'，用2Mg琼脂糖凝胶电泳检测所提取的\*\$'质量，并用超微量分光光度计(\$<K\*;K! /111)测定\*\$'浓度，最终稀释至31 =^/μR。参照G<B: Z'等[9]设计的引物(24H; : 3n@@@A%AAA A@ ' ' ' ' @ AF On 24Z : 3n@@@A@A% ' @A@ % A@ @A@FOn)，以基因组\*\$'为模板，扩增岩牡蛎和长牡蛎的24H; \*F \$' 片段。根据岩牡蛎(%8- <=J 登录号:" T1232 6)与长牡蛎(%8- <=J 登录号:' -10045)线粒体@#(的相对保守区域，利用G8 78!3M 软件设计出一对引物序列(@#() F7: 3n@A' AA' % ' ' A' A%@@%A@A%FOn @#() FS: 3n' ' @ ' ' %A' %A' A@A% ' %FOn)，用于扩增/种牡蛎的@#( 基因片段。G@S 反应体系为21 μR:31 =^!\*\$'，1V3 & TaqI\*\$' 聚合酶，2 μR 21 j G@S!ZBY8，1V6 μR D\$AGE，2 μ: K>R 上下引物，3V23 μR 灭菌超纯水。G@S 反应程序为: 9 i 预变性 O: ?=: 9 i 变性 O1 E, 34 i (24H; \*\$') 或 39 i (@#()) 退火 9BE, 5' i 延伸 2: ?=, 共 O' 个循环; 5' i 延伸 3: ?=, 9 i 保存。取 / μR G@S 产物，经 2V3g 的琼脂糖凝胶电泳成像检测。随机挑选部分个体的 G@S 产物送至青岛华大基因生物有限公司进行测序。

2V G@SFS7RG 分析

测序得到的序列，运用软件 @BC>!O 进行序列比对。使用软件 -K, DC 进行酶切位点的分析，最后选取同一种内切酶 Alu( 对 @#( 与 24H; \*\$' 基因片段进行酶切。酶切反应体系为 21 μR，包括 3 μR 的 G@S 产物，1V3 μR 的限制性内切酶 Alu( (3 & ;A<J< < )，2 μR 的 21 j ZBY8 酶切缓冲液，OVB μR 的灭菌超纯水。酶切反应体系在 O5 i 反应过夜，酶切产物用 /Mg 琼脂糖凝胶电泳成像检测。

/! 结果与分析

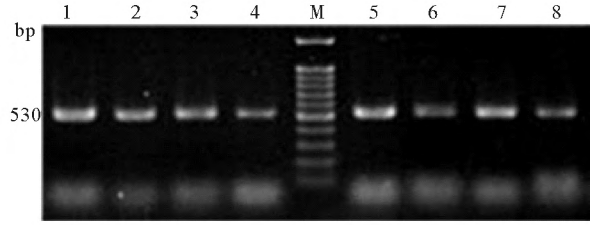
/V2 G@S 扩增结果

G@S 扩增结果如图 2 和图 / 所示，岩牡蛎和长牡蛎 24H; \*\$' 与 @#( 均扩增出一条单一片段，未发现其片段长度多态性。24H; \*\$' 测序得到的片段大小为 301 Z (见图 2)，@#( 测序得到的片段大小为 429 Z (见图 /)。

/V 序列比对结果与酶切位点

序列比对及酶切位点分析后发现，在长牡蛎 24H; \*\$' 扩增产物中距多核苷酸序列 3n 端的第 935 和 936 位碱基之间的磷酸二酯键为限制性内切酶 Alu( 酶切位点(' %@A)，而岩牡蛎 24H; \*\$' 扩增产物有

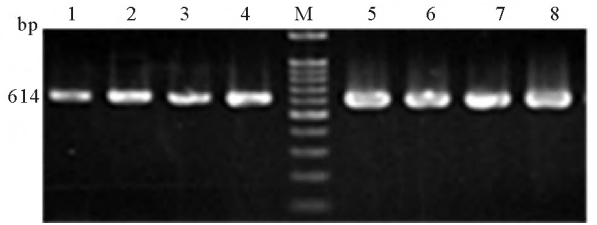
/ 个 Alu( 酶切位点，分别在 O51 和 O52 碱基之间和 914 和 915 碱基之间(见图 O)。在长牡蛎 @#( 扩增产物中距多核苷酸序列 3n 端的第 21/ 和 210 位碱基间的磷酸二酯键与第 354 和 355 位碱基间的磷酸二酯键为内切酶 Alu( 酶切位点，岩牡蛎 @#( 扩增产物只有 2 个 Alu( 酶切位点，在第 O56 和 O5 碱基之间(见图 9)。



(2~9:长牡蛎;3~6:岩牡蛎;T: 211 Z!\*\$' !: <J8。2~9: C. gigas; 3~6: C. nippona;T: 211 Z!\*\$' !: <J8 V

图 2! 长牡蛎和岩牡蛎 24H; \*\$' 片段 G@S 产物电泳图

7^V! , >8CK FK 8NI; K?8KY!G@S!; KDBE KY 24H; \*\$' !KY C. gigas <=D C. nippona



(2~9:长牡蛎;3~6:岩牡蛎;T: 211 Z!\*\$' !: <J8。2~9: C. gigas; 3~6: C. nippona;T: 211 Z!\*\$' !: <J8 V

图 /! 长牡蛎和岩牡蛎 @#( 片段 G@S 产物电泳图

7^V! , >8CK FK 8NI; K?8KY!G@S!; KDBE KY @#(!KY C. gigas <=D C. nippona

/V O 酶切结果

限制性内切酶 Alu( 对岩牡蛎和长牡蛎的 G@S 扩增产物的酶切结果如图 3 和 4 所示，与预期酶切分析结果一致。岩牡蛎 24H; \*\$' 片段酶切后得到 O4、2/9 和 O51 Z!O 个片段，而长牡蛎 24H; \*\$' 扩增片段经 Alu( 酶切后得到 50 和 933 / 个片段(见图 3)。@#( 基因片段经 Alu( 酶切后，岩牡蛎产生 /O4 和 O56 / 个片段，长牡蛎产生 O6、21/ 和 939 Z!O 个片段(见图 4)。虽然有些酶切片断因为太小在琼脂糖凝胶成像中显示模糊，但这并不影响将这 / 种牡蛎直观地区分开来。

牡蛎和长牡蛎的线粒体

720

一条长40  
制性内切酶

测序,测序结果与酶切实验结果一致,未发现酶切位点突变个体,验证了本研究 *G@SfS7RG* 鉴定方法的可行性与可靠性。

本研究基于线粒体 \* \$' !G@SfS7RG 技术开发出的岩牡蛎与长牡蛎鉴定方法操作简单,仅仅需要 *G@S*

扩增目的基因片段,经特异性内切酶酶切、电泳后,即可有效鉴别岩牡蛎与长牡蛎。鉴定结果准确可靠,有利于节约成本,提高牡蛎样品的鉴定效率,同时为岩牡蛎养殖新品种的开发提供了技术手段。

(下划线标出的为 *Alu* 酶切位点。HCBK Alu ( ' %@A) < 8B-DB?-8Da7RE-^8?-8EV

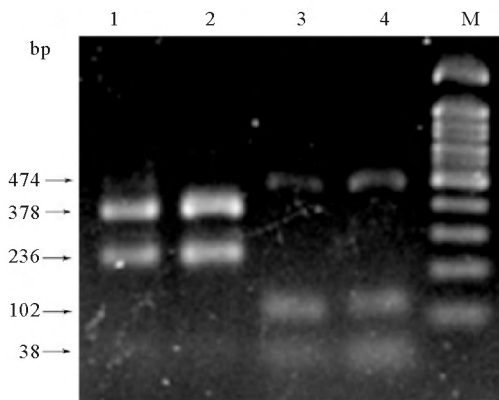
图 9 长牡蛎和岩牡蛎 @#( 序列比对结果及酶切位点

7^v9! HBBNB<^=: 8C<=<D; 8C7NK=7CBI K[: K| PE: E?=@#(IEBBNBK| C. gigas<=<D C. nippona

2~9:岩牡蛎;10~9:长牡蛎;T:211 Z!\*\$' !: <J8. 2~/: C. nippona;10~9: C. gigas;T: 211 Z!\*\$' !: <J8 V

图 3! 长牡蛎和岩牡蛎 *cytb*; \*\$' 酶切结果

7^V! S7RG! <CS=EKY!24H; \*\$' !KY! C. gigas!<D C. nippona <CS!D^BCK=IaCP! Alu I



2~9:岩牡蛎;10~9:长牡蛎;T:211 Z!\*\$' !: <J8. 2~/: C. nippona;10~9: C. gigas;T: 211 Z!\*\$' !: <J8 V

图 4! 长牡蛎和岩牡蛎 *cytb* 酶切结果

7^V! S7RG! <CS=EKY!@#(KY! C. gigas!<D C. nippona <CS!D^BCK=IaCP! Alu I

9! 结语

本研究基于岩牡蛎与长牡蛎 *cytb*; \*\$' 与 @#( 基因片段开发了一种快速高效的 *cytb* 鉴定方法。利用通用引物与本研究开发引物扩增 / 种牡蛎的线粒体 *cytb*; \*\$' 与 @#( 基因片段,应用同一种限制性核酸内切酶 Alu( 对 *cytb* 产物进行酶切,并对酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳。根据酶切图谱可有效鉴别岩牡蛎与长牡蛎。这种简单、可靠、经济的 *cytb* 鉴定方法,能够为岩牡蛎养殖新品种的开发提供技术支撑。

参考文献:

[2]! 农业部渔业渔政管理局V中国渔业统计年鉴/124[T]V北京: 中国农业出版社, /124V 7EP8:BN <D 7EP8[! D. ?AC<K=, CP8T?AC[IKY! ?NBK8V

@P<1 7EP8[!HGCCN<4) 8; ZKKJ/124[T]V-8V^: @P<1 ? 7EP8:BN <D 7EP8[! D. ?AC<K=, CP8T?AC[IKY! ?NBK8V /124V  
[7]! 李文姬V岩牡蛎的生物学及其养殖[V]水产科学, /115, /4(2): 46 F4 1V R!O! V-7KK^! <DNBCX<K=KY!KES! Crassostrea[nippona [ V 7EP8:BN <D 7EP8[! HNB:NB, /115, /4(2): 46 F4 1V  
[O]! \<?H' , -Ka8- !O, ' XEB' !@V%KZ<I K B<K^!8<8NIECBN CB8<D: <8: 8D<ED^8-8YKa?4CP8^; 8B!CB8 (Chelonia mydas): S7RG <<[EBB KY! <K=]: KEB =BN8; KY! [ V^8<8NE, 2. /, 202(2): 240230V  
[9]! G<B: ZIHS, T<C=!' , SK: <KIH: 8D<VAP8IF. I>8 7KK8E %BDBKIG@S[T]V" K<KBB: &?8EQ!KY!" <a??G8E, 2. 2V  
[3]! S888\!H, @K D88! 17, HCBZE' !-, 8D<VTK8NB< I! P!K^8?8E P8!; 8K>8G<K<K: ?NINK=EEK! aCP! E<I Crassostrea! K!ES B 8N8E [ V]T<?8-7KK^, /116, 23(9): 51. F5/2V  
[4]! )BI" , R! V\*8<CB=?^! <DB<^8! 88CK! FK; 8EB <I<K^KYK CP8DB<ONCK=KYNK: : 8N>[! ? I K G<C Crassostrea! K!ES E?=@P< [ V]7EP8:BN <D 7EP8[! HNB:NB, /116, 59(4): 2092034V  
[5]! O<^! , %BK+V(DB<ONCK=KY Crassostrea[ariakensis <D 8<G 8DK!ESBZ! : BQ >8! B 8N8E 8NNG@S [ V] KB =>KY!TK>EF YEP!S88; NP, /116, /5(O): 92925V  
[6]! '?! IR, R! , \K=^IR7, 8D<V" ?^P; 8K8CK=I: 8C^ (" ST) <<[EE: ' ! P^P! EB<E>8 <CS=<88 YK! CP8 DB<ONCK= KY NK: : 8N>[! ? I K G<C Crassostrea! K!ES E [ V] KB =>KY!TK>EF N=HCBDE, /129, 62(2): 245251V  
[ ]! HB <CP!%, '8<EB< <I%, HPJ?<I S' , 8D<VTK8NB< !DB<ONCK=KY! K! B 8! B 8N8E E?^! G@SFS7RG CNP<LEB [ V] 7KK @<CK>, /123, 32: 011014V  
[21]! 庄怡, 刘必谦, 唐杰V利用 G@SFS7RG 技术对鲫鱼 4 个不同品系的鉴定[V]生物技术通报, /12(22): 29929 V ! FB<^! , RB- !] . A<^! V(DB<ONCK=?^! E [ EC<E! KY Carassius auratus [ I G@SFS7RGK=I: C\* \$' ! \$\*O / \$\*9R / \$\*9^88! ] V-7 KGNP<KK^! -B>8=, /12(22): 29929 V  
[22]! 文菁, 胡超群, 张吕平, 等V24 种商品海参 *cytb*; S\$' 的 G@SFS7RG 鉴定方法[V]中国水产科学, /122, 26(7): 932935V CBH' , " B@! ! P<^!RG<8D<VCG@SFS7RG!DB<ONCK=KY!24 NK: : 8N>[! EB!N8B: Z8! B 8N8E K= CP8Z<EKY!24H; S\$' !^88 [ V] KB =>KY! 7EP8[! HNB:NB KY! @P<, /122, 26(7): 932935V  
[2]! GBT!S, SZ8 KIS!#, -K88!O! , 8D<V! E? I>8G@SFS7RG : 8PKOY!CP8DEN? ?<K=KY=<CB<D?<CKDBNK!ES! B 8 N8E (Crassostrea[brasiliiana, C. rhizophora<D C. gigas; -7 X>R<: #EC8D8) NBCB 8D?4 HCB8 =-; <D [ V] LB!NBCB 8 S88; NP, /114, 05(23): 23 62411V  
[20]! -<J8 (' KR<EB!H \* VTK8NB< I! P!K^8<8NE KY gadida <D ; 8<ED ^DYK: 88 Z<8D K=I: ?BNK<D?< \* \$' ! EB, B8NE [ V] T<?8-7KGNP<KK^, /113, 5(2): 424 V  
[29]! \?ZB<^H, \P: <: K=^!S, A<E<JAK=!' , 8D<VTK8NB >^!8<8NDB<ONCK=KX8YK!CP 8NK: : 8N>[! INCB 8DK!EF C8E (Crassostrea[belcheri, Crassostrea[iredalei, <D Saccostrea cucullata) ?4 AP?<D [ V]T<?8-7KGNP<KK^, /110, 3(2): /504V

Fast Discrimination of *Crassostrea nippona* and *C. gigas* Based on PCR-RFLP of mtDNA

R&\ \? \?, R! ]?

(APB\B! IR-ZK<K [!KY!T<?NBCB8 (#NB=!&=>BEC!KY!@P<), T?EC[!KY!, DBNC<, ]?>DK/44110. @P<)

Abstract: APB(a<^?K[ES (Crassostrea nippona) <DPCBGVYNK[ES (C. gigas) <B?: I K G<OE B NBIKY!EPB>YEP?>CPBaK>DVC. nippona <D C. gigas< SE?: ?<! ?>EPB>NR< NBTONE <D DYYNBCK DEN?: ?<B: K I RKK^N>[ VAPB8a<E =K LBN! <D; S<ZB: SPKDK DEN?: ?<B CPB8CaK K[ES EV (=CPHECB], a8DBSK BD<G@SfS7RG<E<[YK!CPB; <D <D8Y8C87DB<YNCK=<KY! C. nippona <D C. gigas<CPB: KSB<!>SBYK!CPBY; EC: SV' : I YNCK=<E KY!CPB 2H; \* \$' ! <D @#(!^8<E! a88 I 8YK : 8DBE?>1CPB B>8E<I ; ?> 8E <D CPB I ; ?> 8E =Ea>[! DBSK BD?>CPHECB], ; E 8C8[ VAPB <: I Y8DG; ^CY<^: 8<E! a88EB BBND<DEB BBNE! a88YB CPB! <=<[ 8DYK! CPB88CK=<KY! ; ECN CK=<8Q : EBE?>1<EKCa< 8VAPBG@S!! ; KBQa<E D^8C8Z[! CPB88CB, ECNK=<8Q : 8Alu(!<D CPB D^8CK=< ; EBCa888< : ?>8DP, KB^88CK! PK; EEP?>/g <^< KEB^8V\*?^8CK=<KY! 2H; \* \$' ! <D @#(!a?> Alu(!^8<8<EDEC=N< ; ECNK=<I <CB =YK! C. nippona <D C. gigas, <Ka?>1<NB; !?DB< YNCK=<V(=NK=NEK<, CPHE? : I>8; S<ZB<DNEC8Y8C8: SPKDN=<I ; KYDBCNP=>N>EB I K CYK CPBDBSK : 8<KY C. nippona V

Key words: Crassostrea nippona ; Crassostrea gigas ; C\* \$' ; G@SfS7RG; E 8Y87DB<YNCK=

责任编辑! 朱宝象