

研究简报

岩牡蛎和长牡蛎的线粒体 DNA PCR-RFLP 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 266003)

摘要: 岩牡蛎(*Crassostrea nippona*)与长牡蛎(*Crassostrea gigas*)是世界上 2 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 PCR-RFLP 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 2 种牡蛎的线粒体 16S rDNA 与 COI 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 I* 对 PCR 产物进行酶切, 并用 2.0% 琼脂糖凝胶检测 PCR 产物的酶切结果。结果表明, 岩牡蛎与长牡蛎 PCR 产物经 *Alu I* 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 PCR-RFLP 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 DNA; PCR-RFLP; 物种鉴定

中图分类号: S968.3; Q179

文献标志码: A

文章编号: 1672-5174(2018)12 II-017-06

DOI: 10.16441/j.cnki.hdxh.20180091

引用格式: 刘凯凯, 李琪. 岩牡蛎和长牡蛎的线粒体 DNA PCR-RFLP 快速鉴定[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2018, 48(增 II): 17-22.

LIU Kai-Kai, LI Qi. Fast discrimination of *Crassostrea nippona* and *C. gigas* based on PCR-RFLP of mtDNA[J]. Periodical of Ocean University of China, 2018, 48(Sup. II): 17-22.

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。2016 年中国牡蛎养殖产量达 483 万 t, 居世界首位^[1]。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 5~8 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(Pterioidea)牡蛎科(Ostreidae), 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 8~9 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^[2]。

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-限制性片段长度多态性分析(PCR-RFLP)技术是一种常用的快速简便分析物种组成的方法^[3], 与 PCR 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 16S rDNA 与 COI 基因片段开发了一种快速高效的 PCR-RFLP 鉴定技术, 首次从分子生物学水平上鉴别区分这 2 种重要的经济贝类。

1 材料和方法

1.1 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 2~3 cm 的稚贝 18 个个体, 解剖取闭壳肌, 于 -80 °C 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(2016ZDJS06A06); 青岛市产业培育计划项目(17-3-3-64-nsh)资助

Supported by Science and Technology Program of Shandong Province(2016ZDJS06A06); Industrial Development Project of Qingdao (17-3-3-64-nsh)

收稿日期: 2018-03-05; 修订日期: 2018-05-23

作者简介: 刘凯凯(1992-), 男, 硕士生。E-mail: 1040039367@qq.com

** 通讯作者: E-mail: qili66@ouc.edu.cn

DNA。

1.2 PCR 扩增与测序

采用常规“酚—氯仿”抽提法提取样品基因组 DNA,用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测所提取的 DNA 质量,并用超微量分光光度计 (NanoDrop 2000) 测定 DNA 浓度,最终稀释至 50 ng/ μ L。参照 Palumbi 等^[4]设计的引物 (16Sar: 5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3', 16Sbr: 5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3'),以基因组 DNA 为模板,扩增岩牡蛎和长牡蛎的 16S rDNA 片段。根据岩牡蛎 (GenBank 登录号: HM015198) 与长牡蛎 (GenBank 登录号: AB033687) 线粒体 COI 的相对保守区域,利用 Premier 5.0 软件设计出一对引物序列 (COIY-F: 5'-CTATTAGAAATATGCGGTCTG-3', COIY-R: 5'-AACAAAGTAAGTATCGTGAAG-3'),用于扩增 2 种牡蛎的 COI 基因片段。PCR 反应体系为 10 μ L: 50 ng DNA, 0.25 U Taq DNA 聚合酶, 1 μ L 10 \times PCR buffer, 0.8 μ L dNTPs, 1 μ mol/L 上下引物, 5.15 μ L 灭菌超纯水。PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 56 $^{\circ}$ C (16S rDNA) 或 54 $^{\circ}$ C (COI) 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 32 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。取 2 μ L PCR 产物,经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳成像检测。随机挑选部分个体的 PCR 产物送至青岛华大基因生物有限公司进行测序。

1.3 PCR-RFLP 分析

测序得到的序列,运用软件 Clustal W 进行序列比对。使用软件 BioEdit 进行酶切位点的分析,最后选取同一种内切酶 *Alu I* 对 COI 与 16S rDNA 基因片段进行酶切。酶切反应体系为 10 μ L,包括 5 μ L 的 PCR 产物,0.5 μ L 的限制性内切酶 *Alu I* (5 U; Takara), 1 μ L 的 10 \times buffer 酶切缓冲液,3.5 μ L 的灭菌超纯水。酶切反应体系在 37 $^{\circ}$ C 反应过夜,酶切产物用 2.0% 琼脂糖凝胶电泳成像检测。

2 结果与分析

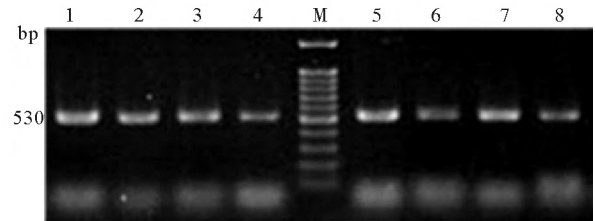
2.1 PCR 扩增结果

PCR 扩增结果如图 1 和图 2 所示,岩牡蛎和长牡蛎 16S rDNA 与 COI 均扩增出一条单一片段,未发现其片段长度多态性。16S rDNA 测序得到的片段大小为 530 bp (见图 1),COI 测序得到的片段大小为 614 bp (见图 2)。

2.2 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 16S rDNA 扩增产物中距多核苷酸序列 5' 端的第 457 和 458 位碱基之间的磷酸二酯键为限制性内切酶 *Alu I* 酶切位点 (AGCT),而岩牡蛎 16S rDNA 扩增产物有

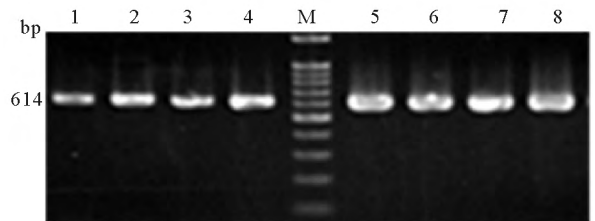
2 个 *Alu I* 酶切位点,分别在 370 和 371 碱基之间和 406 和 407 碱基之间 (见图 3)。在长牡蛎 COI 扩增产物中距多核苷酸序列 5' 端的第 102 和 103 位碱基间的磷酸二酯键与第 576 和 577 位碱基间的磷酸二酯键为内切酶 *Alu I* 酶切位点,岩牡蛎 COI 扩增产物只有 1 个 *Alu I* 酶切位点,在第 378 和 379 碱基之间 (见图 4)。



(1~4: 长牡蛎; 5~8: 岩牡蛎; M: 100 bp DNA marker. 1~4: *C. gigas*; 5~8: *C. nippona*; M: 100 bp DNA marker.)

图 1 长牡蛎和岩牡蛎 16S rDNA 片段 PCR 产物电泳图

Fig. 1 Electrophoretic profile of PCR products of 16S rDNA of *C. gigas* and *C. nippona*



(1~4: 长牡蛎; 5~8: 岩牡蛎; M: 100 bp DNA marker. 1~4: *C. gigas*; 5~8: *C. nippona*; M: 100 bp DNA marker.)

图 2 长牡蛎和岩牡蛎 COI 片段 PCR 产物电泳图

Fig. 2 Electrophoretic profile of PCR products of COI of *C. gigas* and *C. nippona*

2.3 酶切结果

限制性内切酶 *Alu I* 对岩牡蛎和长牡蛎的 PCR 扩增产物的酶切结果如图 5 和 6 所示,与预期酶切分析结果一致。岩牡蛎 16S rDNA 片段酶切后得到 36、124 和 370 bp 3 个片段,而长牡蛎 16S rDNA 扩增片段经 *Alu I* 酶切后得到 73 和 457 2 个片段 (见图 5)。COI 基因片段经 *Alu I* 酶切后,岩牡蛎产生 236 和 378 2 个片段,长牡蛎产生 38、102 和 474 bp 3 个片段 (见图 6)。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 2 种牡蛎直观地区分开来。

<i>C.gigas</i>	CGCCTGTTTATCAAAAACATCACTAGAAGATAAAGACTTTTAGCAATACC	50
<i>C.nippona</i>	CGCCTGTTTAAACAAAACATCACTAGAAGATAAAGACTTTTAGCAATACC	50
Consensus	cgcctgttta caaaaacat cact agaagat aaagact ttt agcaat acc	
<i>C.gigas</i>	CGCCAGTGCGAAATATTACTGTAAACGGCCGCCCTAGCGTGAGGGTGCT	100
<i>C.nippona</i>	TGCCAGTGCGAAATATTACTGTAAACGGCCGCCCTAGCGTGAGGGTGCG	100
Consensus	gcccagtgcgaaatattactgtaaacggccgccctagcgtgaggggtgc	
<i>C.gigas</i>	AAGGTAGCGAAATTCCTTGCCTTTTGATTGTGGCCTGCATGAATGGTTT	150
<i>C.nippona</i>	AAGGTAGCGAAATTCCTTGCCTTTTGATTGTGGCCTGCATGAATGGTTT	150
Consensus	aaggtagcgaaatccttgccttttgattgtggcctgc at gaat gg ttt	
<i>C.gigas</i>	AACGAGGGTTTGACTGTCTCTAAATTTTTATTGAAATTGTAAGGT	200
<i>C.nippona</i>	AACGAGGGTTTGACTGTCTCTAAATTTTTATTGAAATTGTAAGGT	200
Consensus	aacgagggtttgactgtctctaa ttttttattgaaattgta tgaaggt	
<i>C.gigas</i>	GAAGTACCTTCATTTAAAAGTTAGACAAAAAGACCCCGTCAACTTTGA	250
<i>C.nippona</i>	GAAGTACCTTCATTTAAAAGTTAGACAAAAAGACCCCGTCAACTTTGA	250
Consensus	gaagat accttcattt aaaaagtt agac aaaa agaccccg t gcaact t t ga	
<i>C.gigas</i>	AAATTAACCTTTATTAGGAGTAAAAGATTTTTAGGTGGGGCGCCTAGAAA	300
<i>C.nippona</i>	AAATTGGCTTTATTAGGAGTAAAAGATTTTTAGGTGGGGCGCCTAGAAA	300
Consensus	aaatt ctttattcag gtaaaagatttttaggtggggcgccctagaaa	
<i>C.gigas</i>	GCAAGTCTAACCTTTCTGAATAACTACTTTCCGGATTGACCCGATT	350
<i>C.nippona</i>	GTAAGTCTAACCTTTCTGAATAATTAGTTCTTTCCGGATTGACCCGATT	350
Consensus	g aagtctaaccctttctgaataa ta tctttccggatttgaccgatt	
<i>C.gigas</i>	ATATTCGATCATAGGAGAAGTACGCCGGGGATAACAGGCTAATCCTTTA	400
<i>C.nippona</i>	ATATTCGATCATAGGAGAAGTACGCCGGGGATAACAGGCTAATCCTTTA	400
Consensus	atattcgatcataggagaag tacgccggggataacaggc atcctfta	
<i>C.gigas</i>	GTAGAGTTCGATTTGGCTAAAGGGATTGGCACCTCGATGTTGAATCAGGG	450
<i>C.nippona</i>	GTAGAGTTCGATTTGGCTAAAGGGATTGGCACCTCGATGTTGAATCAGGG	450
Consensus	gtagag t cgtattggctaaagggattggcacctcgatgttgaatcaggg	
<i>C.gigas</i>	ATAATAGCTTCAAGGCGTAGAGGCTTTGAAAGTAGGTCTGTTTCGACCTTT	500
<i>C.nippona</i>	ATGACCTTCAAGGCGTAGAGGCTTTGAGAGTAGGTCTGTTTCGACCTTT	500
Consensus	at a a cttaaggcgt agaggtttga agtaggtctgttcgaccttt	
<i>C.gigas</i>	AATACCCTACGTGATCTGAGTTCAGACCGG	530
<i>C.nippona</i>	AATACCCTACGTGATTTGAGTTCAGACCGG	530
Consensus	aataccctacgtgat t g agttcagaccgg	

(下划线标出的为 *Alu* I 酶切位点。Sites of *Alu* I (AGCT) are underlined with single lines.)

图 3 长牡蛎和岩牡蛎 16S rDNA 序列比对结果及酶切位点

Fig. 3 Sequence alignment and restriction-site polymorphisms in 16S rDNA sequences of *C. gigas* and *C. nippona*

3 讨论

岩牡蛎是正在开展全人工繁育的牡蛎养殖新品种,具有较高的经济价值。在引种繁育阶段,牡蛎物种的鉴定十分重要。牡蛎品种出现混杂,会直接影响人工育苗效果。由于牡蛎外部形态特征(如贝壳形状)常随栖息环境的不同而发生很大的改变,依据传统形态分类的方法对其进行物种鉴定存在很大困难。随着科学技术的发展,分子生物学技术的广泛应用解决了此类难题。在以前的研究中,多种分子生物学技术已经应用到牡蛎的物种鉴别中,包括测序^[5],变性梯度凝胶电泳(GDDE)^[6],特异性多重 PCR^[7],高分辨率溶解曲线(HRM)^[8]等技术。上述方法通常成本较高,或操作繁琐,或设备昂贵,对操作人员技术要求较高。

PCR-RFLP 技术是在 PCR 和 DNA 序列分析基础上发展产生的 RFLP 技术,因方法简单、快捷、成本低,已广泛应用于水产经济物种的分析鉴定。例如,

Sumathi 等^[9]利用 PCR-RFLP 技术成功鉴定了 5 种石斑鱼;庄怡等^[10]利用 PCR-RFLP 技术成功鉴定鲫鱼 6 个不同品系;文菁等^[11]利用开发的 PCR-RFLP 方法成功鉴定了 16 种经济海参;Pie 等^[12]利用 PCR-RFLP 技术快速鉴定了巴西海岸 3 种重要的养殖牡蛎。

线粒体 DNA 作为真核细胞的核外遗传因子,结构简单,易于分离,进化速度比核 DNA 快,已广泛应用于水产动物的种类鉴别中^[13-14]。线粒体 DNA 中,16S rDNA 与 COI 基因片段保守性相对较高,引物可以种间通用,是种类鉴别中常用的基因片段。本研究选用 Palumbi 等^[4]开发的一对通用引物在 2 种牡蛎中成功扩增出一条 530 bp 的 16S rDNA 基因片段,同时设计筛选了一对特异性引物,在岩牡蛎与长牡蛎中成功扩增出一条长 614 bp 的线粒体 COI 片段,PCR 产物被限制性内切酶 *Alu* I 酶切后,经琼脂糖凝胶电泳成像显示出大小不同的酶切片段,成功将岩牡蛎与长牡蛎鉴别出来。随机挑选了岩牡蛎与长牡蛎各 8 个个体进行了

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 PCR-RFLP 鉴定方法的可行性与可靠性。

本研究基于线粒体 DNA PCR-RFLP 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 PCR

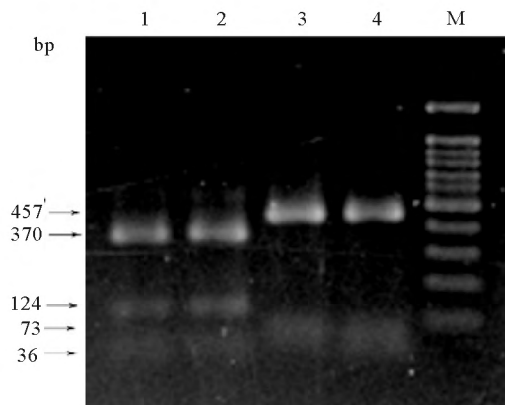
扩增目的基因片段,经特异性内切酶酶切、电泳后,即可有效鉴别岩牡蛎与长牡蛎。鉴定结果准确可靠,有利于节约成本,提高牡蛎样品的鉴定效率,同时为岩牡蛎养殖新品种的开发提供了技术手段。

<i>C.gigas</i>	CGATTAGAAATATGCGATCTGTTGGGGGCCATTACTAGCACTATTCCT	50
<i>C.nippona</i>	CTATTAGAAATATGCGGCTGTTGGCGGTCAATTTGCTGGCTCTGTTTCT	50
Consensus	c attagaaat atg cg fct gtt gg gg c attt ct gc ct tt cct	
<i>C.gigas</i>	TGATCTATTAAGGTTACTTCATTCTTGCTTTTGACTACTCTCCAGTGTT	100
<i>C.nippona</i>	TGATCAATTAAGTTACATCATTCTTACTTTAACTACTCTTCCGGTATT	100
Consensus	t gatc attaa gttac fcatt tt ctttt actactct cc gf tt	
<i>C.gigas</i>	<u>AGCT</u> GGAGGTCTTACTATACTTTTGACTGATCGTCATTTTAATACCTCTT	150
<i>C.nippona</i>	GGCTGGAGGTCTTACTATACTTCTAACTGATCGGCATTTTAACACATCTT	150
Consensus	gctggaggtcttactatactt t actgatcg cattttaa ac tctt	
<i>C.gigas</i>	TTTTTGACCCTGTCGGAGGGGGGACCCTGTCTTATTTT CAGCATTGTTT	200
<i>C.nippona</i>	TCTTTGATCCTGTTGGGGGTGGTGATCCTGTTTATTTT CAGCACTATTT	200
Consensus	t tttga cctgt gg gg gg ga cctgt ttatttcagca tt ttt	
<i>C.gigas</i>	TGATTTTTGGTACCCCTGAGGTGATATGTCCTTATTCTTCCAGGTTTTGG	250
<i>C.nippona</i>	TGATTTTTGGTACCCCTGAGGTATATGTTCTTATTCTTCTGGGTTCCGG	250
Consensus	t gat tttt gg t caccct gaggt fatgt cttattctctcc gg tt gg	
<i>C.gigas</i>	AATAATTTCTCATGTCCTTATGTTTTGGTCAAGTAAAAAGACTGCATATG	300
<i>C.nippona</i>	AATGATTTCTCACGTTTTTGTTTTGGTCAAGTAAAAAACTGCATACG	300
Consensus	aat atttctca gt tt tgtttt gg tcaagtaaaaa actgcata g	
<i>C.gigas</i>	GAAATATGGGAATGTTTTATGCAATACTTAATATTGGGTTCTTAGGGTTT	350
<i>C.nippona</i>	GAAATATAGGAATGTTTTATGCAATACTTAACATTGGATTTTTAGGGTTT	350
Consensus	gaaat at ggaat gtttt at gcaatacttaa attgg tt ttagggttt	
<i>C.gigas</i>	ATTGTCTGGGGGCATCACATGTTTGTGGCTGGAATGGATATTGATACGGG	400
<i>C.nippona</i>	ATTGTTGAGGACATCATATGTTTGTAGCTGGAATAGATATTGATACGGG	400
Consensus	attgt tg gg catca atgtttgt gctggaat gatattgat acgcg	
<i>C.gigas</i>	TGCTTATTTTAGTGCTGCCACCGTTATTATTGCAGTGCCAACTGGTATTA	450
<i>C.nippona</i>	TGCTTATTTTAGTGACGCCACCGTTATTATTGCAGTTCCAACCTGGTATTA	450
Consensus	t gctt atttt agtgc gccaccgtt attattgcagt ccaactggtatta	
<i>C.gigas</i>	AGGTGTTGCATGAATTAGCACAACTGCTAGGCTCTAAAGTTTCAACTCAA	500
<i>C.nippona</i>	AAGTATTCGCTGAATTAGGACAATACTAGGATCTAAAGTGTCAACTCAG	500
Consensus	a gt tt gc tgaattag acaat ctagg tctaaagt tcaactca	
<i>C.gigas</i>	GCACCTATGTTTGGTCTACCGGTTTTATTATTCTTTTTACAACAGGGGG	550
<i>C.nippona</i>	GCACCTATGTTTGGTCTACCGGTTTTATTATTCTTTTTACAACGGGGGG	550
Consensus	gcacctatgtt tggctctaccggttttattattctttttacaac gggggg	
<i>C.gigas</i>	TCTTACAGGACTTATTCTATCAAGAGCCTCAGTAGATGTGACGCTTCACG	600
<i>C.nippona</i>	CCTTACGGGCTAATTTTGTCAAGAGCCTCAGTTGACGTTACTCTTCACG	600
Consensus	cttac gg ct att t tcaagagc tcagt ga gt ac cttcacg	
<i>C.gigas</i>	ACACTATTTTGTG	614
<i>C.nippona</i>	ATACTTACTTTGTT	614
Consensus	a actta tttgt	

(下划线标出的为 *Alu* I 酶切位点。Sites of *Alu* I (AGCT) are underlined with single lines.)

图 4 长牡蛎和岩牡蛎 COI 序列比对结果及酶切位点

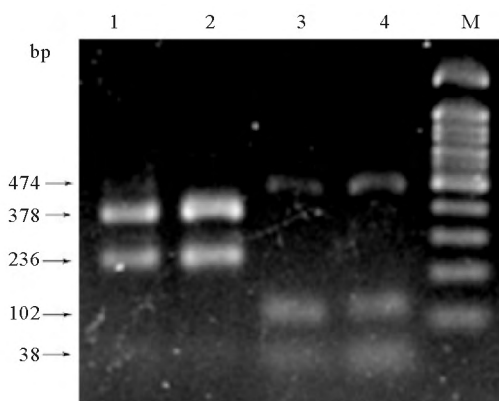
Fig. 4 Sequence alignment and restriction-site polymorphisms in COI sequences of *C. gigas* and *C. nippona*



(1~2:岩牡蛎;3~4:长牡蛎;M:100 bp DNA marker。1~2: *C. nippona*;3~4: *C. gigas*;M: 100 bp DNA marker。)

图 5 长牡蛎和岩牡蛎 16S rDNA 酶切结果

Fig. 5 RFLP patterns of 16S rDNA of *C. gigas* and *C. nippona* after digestion with *Alu I*



(1~2:岩牡蛎;3~4:长牡蛎;M:100 bp DNA marker。1~2: *C. nippona*;3~4: *C. gigas*;M: 100 bp DNA marker。)

图 6 长牡蛎和岩牡蛎 COI 酶切结果

Fig. 6 RFLP patterns of COI of *C. gigas* and *C. nippona* after digestion with *Alu I*

4 结语

本研究基于岩牡蛎与长牡蛎 16S rDNA 与 COI 基因片段开发了一种快速高效的 PCR-RFLP 鉴定方法。利用通用引物与本研究开发引物扩增 2 种牡蛎的线粒体 16S rDNA 与 COI 基因片段,应用同一种限制性核酸内切酶 *Alu I* 对 PCR 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 PCR-RFLP 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:

[1] 农业部渔业渔政管理局. 中国渔业统计年鉴 2016[M]. 北京: 中国农业出版社, 2016.
Fisheries and Fishery Administration, the Ministry of Agriculture.

China Fishery Statistical Yearbook 2016[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2016.

- [2] 李文姬. 岩牡蛎的生物学及其养殖[J]. 水产科学, 2007, 26(12): 689-690.
Li W J. Biology and cultivation of oyster *Crassostrea nippona*[J]. Fisheries Science, 2007, 26(12): 689-690.
- [3] Karl S A, Bowen B W, Avise J C. Global population genetic structure and male-mediated gene flow in the green turtle (*Chelonia mydas*): RFLP analyses of anonymous nuclear loci[J]. Genetics, 1992, 131(1): 163-173.
- [4] Palumbi S R, Martin A, Romano S, et al. The Simple Fool's Guide to PCR[M]. Honolulu: University of Hawaii Press, 1991.
- [5] Reece K S, Cordes J F, Stubbs J B, et al. Molecular phylogenies help resolve taxonomic confusion with Asian *Crassostrea* oyster species[J]. Marine Biology, 2008, 153(4): 709-721.
- [6] Yu H, Li Q. Denaturing gradient gel electrophoresis as a tool for the identification of commercially important *Crassostrea* oysters in China[J]. Fisheries Science, 2008, 74(6): 1354-1356.
- [7] Wang H, Guo X. Identification of *Crassostrea ariakensis* and related oysters by multiplex species-specific PCR[J]. Journal of Shellfish Research, 2008, 27(3): 481-487.
- [8] Jin Y L, Li Q, Kong L F, et al. High-resolution melting (HRM) analysis: A highly sensitive alternative for the identification of commercially important *Crassostrea* oysters[J]. Journal of Molluscan Studies, 2014, 81(1): 167-170.
- [9] Sumathi G, Jeyasekaran G, Shakila R J, et al. Molecular identification of grouper species using PCR-RFLP technique[J]. Food Control, 2015, 51: 300-306.
- [10] 庄怡, 刘必谦, 唐杰. 利用 PCR-RFLP 技术对鲫鱼 6 个不同品系的鉴定[J]. 生物技术通报, 2012(11): 144-149.
Zhuang Y, Liu B Q, Tang J. Identifying six strains of *Carassius auratus* by PCR-RFLP on mtDNA ND3/ND4L/ND4 gene[J]. Biotechnology Bulletin, 2012(11): 144-149.
- [11] 文菁, 胡超群, 张吕平, 等. 16 种商品海参 16S rRNA 的 PCR-RFLP 鉴定方法[J]. 中国水产科学, 2011, 18(2): 451-457.
Wen J, Hu C Q, Zhang L P, et al. PCR-RFLP identification of 16 commercial sea cucumber species on the basis of 16S rRNA gene [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2011, 18(2): 451-457.
- [12] Pie M R, Ribeiro R O, Boeger W A, et al. A simple PCR-RFLP method for the discrimination of native and introduced oyster species (*Crassostrea brasiliiana*, *C. rhizophorae* and *C. gigas*; Bivalvia: Ostreidae) cultured in Southern Brazil[J]. Aquaculture Research, 2006, 37(15): 1598-1600.
- [13] Bakke I, Johansen S D. Molecular phylogenetics of *gadidae* and related gadiformes based on mitochondrial DNA sequences[J]. Marine Biotechnology, 2005, 7(1): 61-69.
- [14] Klinbunga S, Khamnamtong N, Tassanakajon A, et al. Molecular genetic identification tools for three commercially cultured oysters (*Crassostrea belcheri*, *Crassostrea iredalei*, and *Saccostrea cucullata*) in Thailand[J]. Marine Biotechnology, 2003, 5(1): 27-36.

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

LIU Kai-Kai, LI Qi

(The Key Laboratory of Mariculture (Ocean University of China), Ministry of Education, Qingdao 266003, China)

Abstract: The Iwagaki oyster (*Crassostrea nippona*) and the Pacific oyster (*C. gigas*) are important species of shellfish in the world. *C. nippona* and *C. gigas* are similar in shell characteristics and difficult to discriminate morphologically. There was no quick and reliable method to discriminate these two oysters. In this study, we developed a PCR-RFLP assay for the rapid and effective identification of *C. nippona* and *C. gigas* at the molecular level for the first time. Amplifications of the 16S rDNA and COI genes were performed using the universal primers and the primers newly developed in this study, respectively. The amplified target fragments were sequenced and sequences were further analyzed for the selection of restriction enzymes using a software. The PCR product was digested by the selected restriction enzyme *Alu* I and the digestion result were examined through electrophoresis in 2% agarose gel. Digestion of 16S rDNA and COI with *Alu* I generated distinct restriction patterns for *C. nippona* and *C. gigas*, allowing a clear identification. In conclusion, this simple, reliable and cost-effective method can provide technical support for the development of *C. nippona*.

Key words: *Crassostrea nippona*; *Crassostrea gigas*; mtDNA; PCR-RFLP; species identification

责任编辑 朱宝象