

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2010.00369

核糖体转录间隔子 2 应用于鱼类种属的鉴别

袁万安^{1,2}

1. 重庆文理学院生命科技学院, 永川 402160;
2. 汕头大学医学院法医室, 汕头 515041

摘要: 为了防止珍稀鱼类的非法捕捞和销售, 鱼类种属的鉴别就成为非常关键的问题, 特别是形态学方法无法区分的样品(如鱼苗、鱼鳞、鱼卵、鱼肉及其加工产品等)。为了帮助珍稀鱼类资源的管理和保护, 文章报道了一种利用核糖体基因的转录间隔子 2 鉴别鱼类种属的分子遗传学方法: (1) 利用同一目鱼类 5.8S rRNA 和 28S rRNA 基因的保守性, 设计出扩增鲤形目鱼类这两个基因间转录间隔子 2 DNA 片段, 测序获得它们的碱基排列顺序; (2) 再根据不同鱼类转录间隔子 2 序列的差异, 设计出每种鱼的种属特异引物、种属鉴别标准物, 构建鱼类分子分类图谱, 利用 PCR 复合扩增技术鉴别鱼类种属。通过对国内不同地方采集的 5 种鲤形目鱼类的 210 个单一品种样本和 40 个混合样本的鉴别检验, 该方法能够准确、灵敏和快速鉴别这 5 种鱼, 可用于鱼类资源保护和评估、管理和开发, 特别是在渔业管理人员渔业执法、海关打击珍稀鱼类走私、防止商业欺诈和外来有害生物入侵等方面非常有用。

关键词: 鱼类; 转录间隔子 2(ITS2); 分子分类学; 种属鉴定; 资源保护

Identification of fish species based on ribosomal DNA ITS2 locus

YUAN Wan-An^{1,2}

1. College of Life Sciences and Technology, Chongqing University of Arts and Sciences, Yongchuan 402160, China;
2. Department of Forensic Medicine, Shantou University Medical College, Shantou 515041, China

Abstract: To prevent illegal fishing and sale, the most difficult problem is identification of marketed fish species, especially the parts that are difficult to be differentiated with morphological method (e.g., larval, eggs, scales, meat, products etc). To assist conservation and management of fishery resources, this paper reported a molecular genetic approach based on ribosomal internal transcribed spacer 2 locus. The method includes two steps: (1) the order general primers were designed according to the conservative nature of 5.8SrRNA and 28SrRNA genes within an order, and the DNA ribosomal internal transcribed spacer 2 locus fragment were then amplified and sequenced. (2) The species-specific ladders and the species-specific primers for each species were designed according to the sequencing results. The map of molecular taxonomy was constructed. This approach employs multiplex PCR that is formatted for fish species identification. We tested 210 single-species samples and 40 mix-species samples from different regions of China. The approach distinguished accurately and sensitively samples from each of the five species. This genetic and molecular approach will be useful for fish conservation, assessment, management and exploitation, strengthen in law enforcement of fishery manager, combat rare and endangered fish smuggling, and prevent commercial fraud and biological invasion by harmful nonnative species.

Keywords: fish; internal transcribed spacer 2 (ITS2); molecular taxonomy; species identification; resources conservation

收稿日期: 2009-08-13; 修回日期: 2009-11-04

基金项目: 中国博士后科学基金项目(编号: 20080430853)和广东省自然科学基金项目(编号: 8451503102000600)资助

作者简介: 袁万安(1965-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 分子遗传学、法医鱼类学、动物资源保护。E-mail: 110ywa@163.com

致谢: 感谢云斌武、汪大林、刘成兵、张凡博士所做的实验室分析工作; 感谢刘海明、张巧、王晓琳、杨远斌、刘本祥、解琦、李昆玲提供样本。

由于过去多年的鱼类无节制的捕捞,导致许多鱼种濒临灭绝。如何防止它们的灭绝,切实保护、有效管理和开发珍稀鱼类资源已经成为全世界关心的问题^[1-3]。岩原鲤(*Procypris rabaudi*)、四川白甲鱼(*Varicorhinus angustistomatus*)、重口裂腹鱼(*Schizothorax davidi*)、胭脂鱼(*Myxocyprinus asieticus*)、华鲮(*Sinilabeo rendahli*)属于鲤形目珍稀鱼类,其中胭脂鱼已属于极度珍稀濒危鱼种。我们必须采取措施,防止这些鱼种消失。近年来,内陆渔业的管理主要关注于保护鱼类的多样性和鱼类资源的可持续性开发^[4]。虽然我们对淡水鱼类资源已经采取了一系列保护措施,例如:调整开发强度,设置自然保护区,人工放流,设置禁渔期等,但这些方法都没有达到保护鱼类的预期效果,鱼类资源仍然受到各种各样的威胁。提到鱼类资源保护,很多人就会想到恢复水体生态环境到原始状态。要真正恢复到原始状态,这几乎是不可能的^[5]。目前,鲤形目鱼类鉴别主要采用形态学方法,由于生态和地理位置的差异,种内和种间杂交,形态学差异变得非常复杂,完全通过形态学的差异来进行种属鉴别是非常困难的,有时甚至是不可能的^[6]。特别是对于一些微量检材和形态学特征不完整的检材,用传统的方法根本不能进行鱼类种属鉴定,于是不法商贩和非法捕捞人员,就利用这个特点进行非法捕捞和销售。

对于珍稀鱼类的保护,我们除了禁止捕捞和销售外,更应实行以养促保的保护政策。要养殖珍稀鱼类,必须了解它们的生物学特性(产卵习性,摄食种类,鱼苗生长环境,栖息环境等),这就要求我们对各种鱼类生活史中各个时期的栖息位置进行准确定位,而鱼类种属准确鉴别的困难,使得鱼类栖息位置准确定位变得十分困难,这就大大削弱了珍稀鱼类的保护和管理的努力^[7,8]。已经证实,真核生物DNA链上编码核糖体18S rRNA、5.8S rRNA和28S rRNA基因之间含有转录间隔子1(Internal transcribed spacer 1, ITS1)和转录间隔子2(Internal transcribed spacer 2, ITS2),在物种进化过程中相对保守。基因查找发现,同一目鱼类编码5.8S rRNA基因的碱基序列完全一致,而编码28S rRNA的序列也比较稳定。编码ITS1和ITS2基因座的种内变异较小,而种间变异大,可以区分不同物种,已应用于其他动物的种属鉴别^[9,10]。目前形态学无法区分的鱼类

种属鉴别研究主要集中在DNA测序方法,但花费高、耗时长,条件要求高,不适于批量的种属鉴别。本文报道了一种利用鱼类ITS2位点快速、准确、简便的鉴别方法,这种方法能够解决形态学方法无法进行的鱼类种属鉴别问题。

1 材料和方法

1.1 鱼类样本的收集

选择5种鲤形目鱼类作为研究对象,分别是岩原鲤、四川白甲鱼、重口裂腹鱼、胭脂鱼、华鲮。在长江、嘉陵江、雅江鱼类资源调查时收集这几种鱼的组织作为标准样本,用于DNA测序,测序结果作为种属特异引物设计的参考序列。另外在长江、嘉陵江和雅江以及国内其他地方的捕捞渔船、餐馆酒店、商场收集30种鱼类样本作为对照样本。在餐馆酒店和商场收集40个鱼类加工产品和废弃物作为验证样本。标准、对照和验证样本大小和地理位置见表1。

标准和对照样本取鱼类尾柄肌肉提取DNA;验证样本取鱼片、鱼卵、鱼鳞、腌腊制品、血斑、粘液和加工废弃的混合物。血斑和粘液涂抹在消毒纱布上,自然风干,4℃保存。其余样本用95%酒精浸泡,-20℃保存备用。

1.2 方法

1.2.1 DNA提取和测序

取样本1 mg用300 μL TEK消化液(50 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L EDTA, 50 mmol/L KCl, pH 7.5)加100 μL 10% SDS和2 μL蛋白酶K(1 mg/mL),56℃水浴24 h,用酚/氯仿法提取DNA^[11], -20℃备用。血斑、粘液和鱼鳞提取方法同前。用本实验室设计的鲤形目通用引物(上游引物: C5.8SF: 5'-CGGTGGA TCACTCGGCTCGT-3'; 下游引物: C28SR: 5'-CGG GTTGTCTCGCCTGACCT-3')对标准样本DNA进行PCR,扩增编码核糖体5.8S rRNA和28S rRNA基因间ITS2序列,PCR产物经琼脂糖凝胶电泳,目的条带用DNA凝胶回收试剂盒(TaKaRa Anarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0, 宝生物工程(大连)有限公司)纯化回收,并将其构建到pMD18-T载体送宝生物工程(大连)有限公司测序,测序引物为通用引物M13,全部采用双向测序。

表 1 鱼类标准、对照和验证样本采集地点和采集样本数量表

种类	采样地点(数量)	种类	采样地点(数量)
标准样本			
胭脂鱼(<i>Myxocyprinus asicyticus</i>)	重庆万洲(5)	华鲮(<i>Sinilabeo rendahli</i>)	四川武胜(5)
重口裂腹鱼(<i>Schizothorax davidi</i>)	四川雅安(5)	四川白甲鱼(<i>Varicorhinus angustistomatus</i>)	重庆万洲(5)
岩原鲤(<i>Procypris rabaudi</i>)	四川武胜(5)		
对照和验证样本			
胭脂鱼(<i>Myxocyprinus asicyticus</i>)	重庆万洲(5)	四川白甲鱼(<i>Varicorhinus angustistomatus</i>)	四川泸州(5)
	四川武胜(5)		重庆武隆(5)
	四川成都(5)		四川成都(5)
	四川泸州(5)	大口黑鲈(<i>Micropterus salmoides</i>)	重庆江北(5)
重口裂腹鱼(<i>Schizothorax davidi</i>)	四川阿坝(5)	鳊(<i>Siniperea chusatsi</i>)	重庆江北(5)
	西藏拉萨(5)	牙鲮(<i>Paralichthys olivaceus</i>)	山东青岛(5)
岩原鲤(<i>Procypris rabaudi</i>)	四川武胜(5)	大菱鲆(<i>Scophthatmus maximus</i>)	山东青岛(5)
	重庆万洲(5)	黄鲢(<i>Monopterus albus</i>)	重庆丰都(5)
	四川宜宾(5)	食蚊鱼(<i>Gambusia affiuis</i>)	重庆荣昌(5)
华鲮(<i>Sinilabeo rendahli</i>)	四川武胜(5)	鲤(<i>Cyprinus carpio</i>)	四川乐山(5)
	重庆万洲(5)		贵州都匀(5)
	重庆大足(5)	三角鲤(<i>Cyprinus multitaeniata</i>)	四川宜宾(5)
斑点叉尾鲷(<i>Ictalur spunctatus</i>)	四川成都(5)	草鱼(<i>Ctenopharyngodon idellus</i>)	四川郫县(5)
泉水鱼(<i>Semilabeo prochilus</i>)	贵州乌江(5)	鳙(<i>Aristichthys nobilis</i>)	重庆涪陵(5)
南方大口鲈(<i>Silurus soldatovi meridionalis</i>)	重庆江北(5)		四川温江(5)
黄颡鱼(<i>Pseudobagrus fulvidraco</i>)	四川武隆(5)	团头鲂(<i>Megalobrama</i>)	四川成都(5)
多鳞白甲鱼(<i>Onychostoma macrolepis</i>)	四川兰草坪(5)	鲫(<i>Carassius auratus</i>)	重庆荣昌(5)
南方白甲鱼(<i>Onychostoma gerlachi</i>)	广东东莞(5)	日本白鲫(<i>Carassius cuvieri</i>)	重庆合川(5)
鲮(<i>Cirrhinus molitorella</i>)	广东佛山(5)	鲢(<i>Acanthobranma simoni</i>)	重庆江津(5)
长吻鮠(<i>Leiocassis longirostris</i>)	四川宜宾(5)		四川成都(5)
麦穗鱼(<i>Pseudorasbora parva</i>)	四川内江(5)	混合样本	四川(20)
匙吻鲟(<i>Polyodon spathala</i>)	重庆荣昌(5)	混合样本	重庆(20)

1.2.2 种属特异引物设计和复合 PCR 扩增体系的建立

比对 5 种鱼 ITS2 的测序结果, 根据核酸序列的不同, 设计种属特异引物, 每种鱼设计 4 条。每条引物都用不同地理位置的样本进行测试其可靠性。测试时, 用鲤形目鱼类一对通用引物加一条种属特异引物, 详见图 1、图 2。

在进行 3 条引物的 PCR 扩增时, 同时测试、筛选出特异引物最严谨的复性温度。PCR 扩增体系为 20 μL: 2 μL DNA, 每种引物(6 pmol/L)2 μL, 4 μL 10×buffer, 1 mmol/L dNTP 6 μL, 1 U *Taq* 酶(TaKaRa 公司), 其余为超纯水。PCR 扩增条件: 95 预变性 6 min; 95 变性 40 s, 60~70 复性 1 min, 72 延伸 1 min, 32 个循环; 最后 72 延伸 7 min, 4 保存。扩

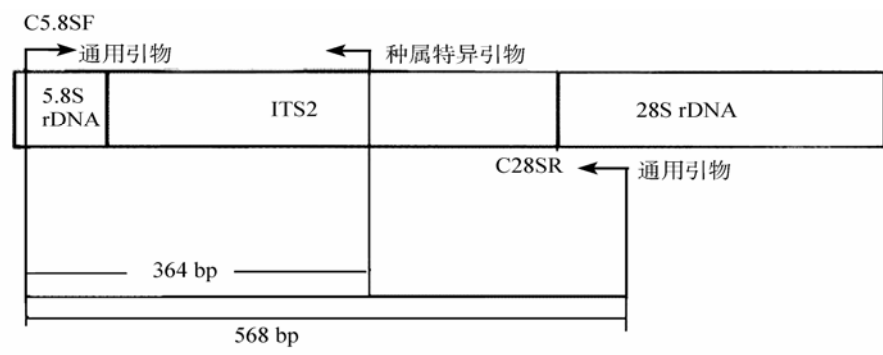


图 1 鲤形目鱼类通用和特异引物设计图

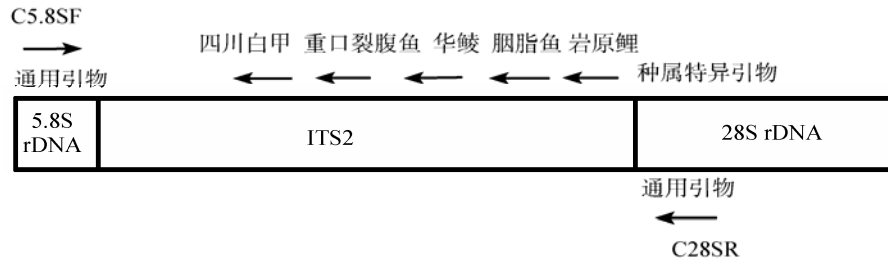


图 2 5 种鱼种属特异引物复合扩增示意图

扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。用四川和重庆的样本进行验证扩增体系的分辨能力, 同时用亲缘关系较近的非目标鲤形目鱼类和非鲤形目鱼类样本检测引物的特异性。根据以下标准, 选择 3 引物扩增体系中 5 种鱼的最佳特异引物: (1) 5 种鱼的特异引物在选定的复性温度下, 扩增效果最好; (2) 该引物在鉴别扩增中只产生一种属于该种鱼的扩增产物。

为了进一步加快鉴别速度和简化鉴别步骤, 我们把筛选出来的特异引物和通用引物, 做成 7 引物扩增体系, 即在一个扩增管中同时完成 5 种鱼的鉴别。用 7 引物复合扩增系统检查 40 个从餐馆和渔业执法中收集的混合样本和从全国各地收集的 210 个单一样本。

1.2.3 鱼类分类标准物的制备

用鲤形目通用引物和通用引物上游引物加种属特异引物对目标鱼类样本 DNA 的扩增产物(即通用引物扩增得到阳性对照产物, 通用引物上游引物加种属特异引物扩增得到每种鱼的特异产物)分别进行纯化, 纯化产物按照 1: 1 的比例混合作为这 5 种鱼种属鉴别的种属特异分类标准物。

2 结果与分析

2.1 3 引物复合扩增体系中检测种属特异引物

用鲤形目通用引物进行 PCR 扩增标准样本 DNA, 岩原鲤、重口裂腹鱼、胭脂鱼、华鲮获得约 568 bp 的 DNA 片段, 四川白甲获得约 900 bp 的 DNA 片段, 为阳性对照扩增产物, 包含 120 bp 5.8S 和 80 bp 28S 侧翼序列和完整的 ITS2 序列。这个位点的 5 种鱼类测序结果已登录在 GenBank, 登录号分别为: 胭脂鱼 DQ994144, DQ994155; 重口裂腹鱼 DQ994156, DQ994157, DQ994158; 岩原鲤 DQ994159, DQ994160; 华鲮 DQ994161, DQ994161, DQ994163;

四川白甲 DQ994164, DQ994165, DQ994166。在引物分析中, 对 210 个样本进行检验, 每种鱼的种属特异引物在复性温度 68 °C 时完全表现出种属特异性, 扩增效果最好。筛选出 5 种鱼的种属特异引物: 胭脂鱼: 5'-GGGCAACAGGAGGGCGTACC-3'; 华鲮: 5'-GCACACAACGTCCCCGAACC-3'; 岩元鲤: 5'-GGCCTTAAGCGAGCGGGTTC-3'; 重口裂腹鱼: 5'-AGCGCGGAGGGGAGGAC-3'; 四川白甲: 5'-GACGAGGCGCCGGGAGGAAG-3'。

用鲤形目的一对通用引物和一条特异引物对鱼类进行扩增时, 对于目标鱼类, 扩增产物电泳同时产生两条带, 一条是由通用引物扩增产生的阳性对照条带, 一条是种属特异引物扩增产生的种属特异条带; 非目标鲤形目鱼类, 只产生由通用引物扩增产生的阳性对照条带; 非鲤形目鱼类没有条带。3 引物的扩增结果见图 3。

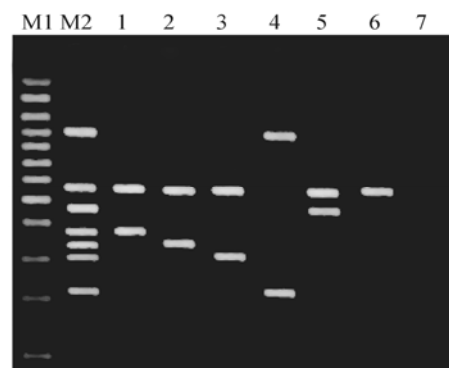


图 3 种属特异引物和通用引物的扩增结果

1: 胭脂鱼(568 bp、364 bp); 2: 华鲮(568 bp、332 bp); 3: 重口裂腹鱼(568 bp、304 bp); 4: 四川白甲鱼(900 bp、245 bp); 5: 岩原鲤 (568 bp、467 bp); 6: 鲤鱼(568 bp); 7: 南方大口鲶。1~5 为目标鱼类, 6、7 为非目标鱼类。M1: 100 bp 分子量标准; M2: 自制鱼类分类标准物(分子量大小为从下往上: 245, 304, 332, 364, 467, 568, 900 bp)。

2.2 7 引物复合扩增体系检测

用 5 种鱼的种属特异引物和鲤形目通用引物构

成 7 引物复合扩增体系, 在复性温度为 68 的情况下, 对 250 个样本进行检验, 不管是单一品种样本还是混合样本, 5 种鱼的鉴别无一例假阴性和假阳性出现。混合样本的检测结果见图 4。

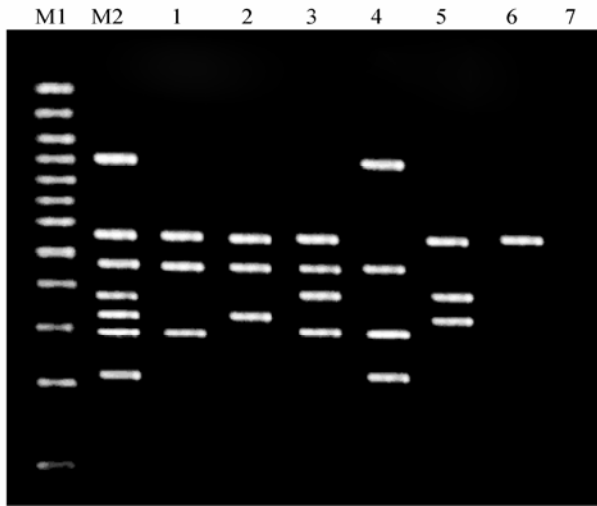


图 4 7 引物复合扩增体系对混合样本的检测结果

1: 重口裂腹鱼、岩原鲤混合样本; 2: 华鲮、岩原鲤混合样本; 3: 重口裂腹鱼、胭脂鱼、岩原鲤混合样本; 4: 四川白甲、重口裂腹鱼、岩原鲤混合样本; 5: 胭脂鱼、华鲮混合样本; 6: 鲤鱼; 7: 黄鳝。1~5 含有目标鱼类, 6、7 不含目标鱼类。M1: 100 bp 分子量标准物; M2: 自制鱼类分类标准物(分子量大小从下往上: 245, 304, 332, 364, 467, 568, 900 bp)。

3 讨论

在生态学、物种保护管理和法医学遇到脊椎动物微量检材的种属鉴定时, 最常用的方法就是对物种 DNA 特殊位点进行 PCR 扩增, 运用限制性内切酶技术和构建系统进化树的方法来分析未知的和已知的样本种属。系统进化树的方法虽然准确可靠, 但是要花费大量时间和金钱, 并且涉及许多下游分析(如内切酶剪切和 DNA 测序)^[12~14], 一次只能鉴定一种鱼, 不能鉴定混合样本。我们研究的方法在进行种属鉴定时, 只需

要对 PCR 扩增产物进行电泳, 不需要其他的操作, 一次能够鉴别几种鱼, 特别是能够鉴别混合样本。从所得的结果可以看出, 这种方法能够鉴定形态学无法鉴别的鱼类组织, 如鱼片、鱼卵、鱼鳞、血斑、粘液、稚鱼、腌腊制品、加工产品和废弃物。

应用 ITS2 作为鱼类种属鉴别的特殊位点, 是在我们近几年的工作(6 种鲟形目鱼类, 4 种鲇形目鱼类, 10 种鲈形目鱼类)和总结其他人的研究成果的基础上确定的^[15, 6]。这个位点在种内相当保守, 而种间即使亲缘关系非常近也有足够的变异来满足特异引物的设计需要。对鲤形目样本检测发现, 同一目、不同种的鱼用通用引物扩增 DNA 样本产生的片段长度不完全一致, 除四川白甲为 900 bp 外, 其他鲤形目鱼类的扩增产物片段大小都在 568 bp。另外, ITS2 具有很多简单重复序列, 以提供大量引物设计和结合的位置, 增强了 PCR 扩增效率^[17]。

应用鱼类分类标准物, 使得鱼类种属鉴别更直观、标准。通过要鉴别鱼类的扩增产物与分类标准物的电泳, 电泳图谱与鱼类分子分类图谱比对直接就可以鉴别鱼类种属。与传统的形态学鉴别方法相比, 它不受环境、鱼体表现特征及个体发育阶段等影响, 同时还能鉴别是否存在杂交, 品质是否纯正, 因为如果是种间杂交, 同一个样本 PCR 电泳检测就会产生 3 条电泳条带, 一条是通用引物扩增产生的阳性对照条带, 两条由雄性和雌性亲鱼 DNA 模板与两种鱼种属特异引物结合扩增产生的种属特异条带。如果用线粒体检测技术就不能检测品质的纯度, 因为线粒体是单性遗传, 只能检测到母本的种属。原来需要具有鱼类分类学专业知识的专业技术人员才能完成的鱼类种属鉴别工作, 现在非专业人员都能完成(图 5)。

这些种属特异引物已经被我们应用于珍稀鱼类的保护和管理。我们之所以研究这几种鲤形目鱼类,

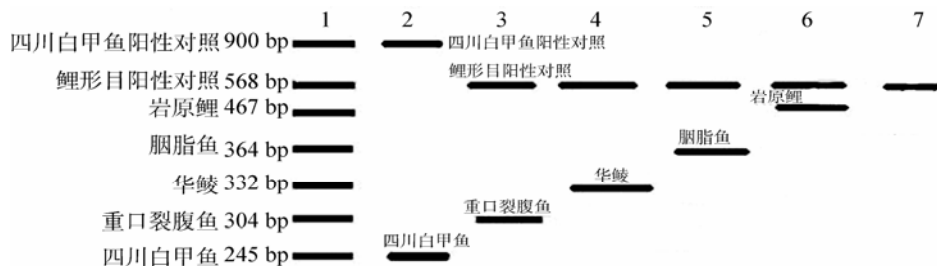


图 5 鲤形目种属鉴别分类标准物鉴别鱼类示意图(自制鱼类分子分类图谱)

是因为这几种鱼在江河渔业、农副产品市场、餐馆酒店很容易遇到,而这几种鱼又属于珍稀鱼类,市场价位高,人们对它们的捕捞强度大,它们的数量正在逐渐减少,如果不迅速加以保护和研究,有的鱼种可能会在短时间内灭绝^[18,19]。

我们用 30 种在江河渔业和鱼类销售市场常遇到的鲤形目鱼类和非鲤形目鱼类进行验证,验证结果是这种方法能准确、快速、灵敏的鉴别目标鱼类;验证样本来自全国各地,说明为这 5 种鱼设计的种属特异引物都能准确的与目标鱼类 DNA 结合,引物结合部位 DNA 序列非常保守,没有地理差异。我们没有对所有能够在中国遇到的鲤形目鱼类用这 5 种鱼的特异引物进行验证,是因为 ITS2 位点在种间变异比较大而种内高度保守^[20,21]。随着我们研究鱼的种类的增加,能够鉴别的鱼类种属就会不断加大,将来还可以把多种种属特异引物制成基因芯片,样本的检测速度将大大提高,操作将变得更加标准和规范,使鱼类种属的鉴定变得更加快速、简单,科学准确。这种方法可用于渔业保护和管理,收集珍稀鱼类的销售和捕捞数据,以确定相应的鱼类管理政策;如果用于涉及鱼类非法捕捞和销售、走私、商业欺诈案件的调查,可以为被告提供有罪或无罪的强有力证明;用于进出口管理的动植物检验,还可以检测外来有害生物的入侵。

参考文献(References):

- [1] Neisar M, Arlinghaus R, Rennart B, Mehner T. Coupling insights from a carp, *Cyprinus carpio*, angler survey with feeding experiments to evaluate the composition, quality and phosphorus input of ground bait in coarse fishing. *Fish Manag Ecol*, 2004, 11(3-4): 225-235. [\[DOI\]](#)
- [2] Czech B, Angermeier P, Daly H. Fish conservation, sustainable fisheries, and economic growth: no more fish stories. *Fisheries*, 2004, 29(8): 36-37.
- [3] Winfield IJ, Durie C. Fish introductions and their management in the English Lake District. *Fish Manag Ecol*, 2004, 11(3-4): 195-201. [\[DOI\]](#)
- [4] Arlinghaus R, Mehner T, Cowx IG. Reconciling traditional inland fisheries management and sustainability in industrialised countries, with emphasis on Europe. *Fish Fisheries*, 2002, 3(4): 261-316. [\[DOI\]](#)
- [5] Cowx IG, Gerdeaux D. The effects of fisheries management practices on freshwater ecosystems. *Fish Manag Ecol*, 2004, 11(3-4): 145-151. [\[DOI\]](#)
- [6] Shivji M, Petersen C. Genetic identification of pelagic shark body parts for conservation and trade monitoring. *Conserv Biol*, 2001, 16(4): 1036-1047. [\[DOI\]](#)
- [7] Hoelzel AR, Seeb LW, Weck RG. Shark fishing in fin soup. *Conserv Genet*, 2001, 2(1): 69-72.
- [8] Smith M, Bencon N. Biochemical identification of shark fins and fillets from the coastal fisheries in New Zealand. *Fish Bull*, 2001, 99(1): 351-355. [\[DOI\]](#)
- [9] Young I, Coleman AW. The advantages of the ITS2 region of the nuclear rDNA cistron for analysis of phylogenetic relationships of insects: a *Drosophila* example. *Mol Phylogenet Evol*, 2004, 30(1): 236-242.
- [10] Gomulskil M, Meiswinkel R, Delecolle JC, Goffepredo M, Gasperi G. Phylogeny of the subgenus *Culicoides* and related species in Italy, inferred from internal transcribed spacer 2 ribosomal DNA sequences. *Med Vet Ent*, 2006, 20(2): 229-238. [\[DOI\]](#)
- [11] Maniatis T, Fritsch E F, Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982.
- [12] Yamasaki N, Tachihara K. Reproductive biology and morphology of eggs and larvae of *Stiphodon percnopterygionus* (Gobiidae: Sicydiinae) collected from Okinawa Island. *Ichthyological Res*, 2006, 53 (1): 13-18. [\[DOI\]](#)
- [13] Asensio L, González I, Fernández A. Identification of Nile perch (*Lates niloticus*), grouper (*Epinephelus guaza*), and wreck fish (*Polyprion americanus*) fillets by PCR amplification of the 5S rDNA gene. *JAOAC Int*, 2001, 84(3): 777-778.
- [14] Gharrett AJ, Gray AK, Heifetz J. Identification of rockfish (*Sebastes* spp.) by restriction site analysis of the mitochondrial ND-3/ND-4 and 12S/16S rRNA gene regions. *Fish Bull*, 2001, 99(1): 49-62.
- [15] Pank M, Stanhope M, Natanson L. Rapid and simultaneous identification of body parts from the morphologically similar sharks *Carcharhinus obscurus* and *Carcharhinus plumbeus* (Carcharhinidae) using multiplex PCR. *Man Biotechnol*, 2001, 3(3): 231-240. [\[DOI\]](#)
- [16] 袁万安. 通过核基因 ITS2 片段研究四种鲈形目鱼类进化. *淡水渔业*, 2008, 38(5): 15-21.
- [17] Lewin B. Gene VII. New York: Oxford University Press, 2000.
- [18] 吕彤, 郭乔羽, 王丁. 为长江上游的珍稀和特有鱼类保持生态流. *世界环境*, 2009, (1): 88-89.
- [19] 王亚民. 亟待保护的长江濒危鱼类. *大自然*, 2007, (3): 24-26.
- [20] Miller BR, Crabtree MB, Savage HM. Phylogeny of fourteen *Culex* mosquito species, including the *Culex pipiens* complex, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Insect Mol Biol*, 1996, 5(2): 93-107. [\[DOI\]](#)
- [21] Harris DJ, Crandall KA. Intragenomic variation within ITS1 and ITS2 of freshwater crayfishes (*Decapoda: Cambaridae*): implications for phylogenetic and microsatellite studies. *Insect Mol Biol*, 2001, 17(2): 284-291.