

淺談粒線體 DNA 之特性及其在生物分類上的應用

賴竹蘭¹、蕭聖代¹、曾福生²

¹水產試驗所海洋漁業組、²水產養殖組

前言

生物分類方法的研究發展，從傳統的形態構造，到數值分析與親緣關係架構，乃至基因相似度等，其目的在建立完善的鑑定系統及分類標準，幫助我們了解生物之間的異同。分類學家可藉由完善的系統鑑定及生物分類的標準來檢定各種生物之間的親緣關係，重建生物進化的脈絡。目前的生命科學研究，許多領域已深入到極為核心的遺傳分子層次，進行其本質規律的探討，例如將分子生物學與其他學科相結合，產生一系列新的分支學科，如分子遺傳學、分子細胞學和分子分類學等。

為了提高種群分析的精準度，1950 年代發展出以同工異構酶 (isozyme) 分析種群遺傳結構的方法，但此種分子生物技術有諸多限制因素，例如標本蛋白的新鮮度是影響分析結果正確性的關鍵因素，因此樣本的取得及保存便成為最主要的限制因子之一。近年來分子生物操作技術突飛猛進，例如聚合酶鏈鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 技術，號稱可將百萬年的自然演化過程縮短至 4 小時內。這種在短時間內可大量擴增微量的核酸分子的技術，被廣泛的應用在考古領域，用以分析遠古生物的核苷酸序列，並和現存的生物進行比對，以瞭解其是否仍繼

續演化及其演化趨勢。利用微量的樣本取材，大量擴增具差異性之遺傳分子，提供了另一種有效的生物分類及個體鑑別方法。本文即以粒線體 DNA 為對象，論述其在水產生物分類上的應用。

什麼是粒線體

從低等的酵母菌乃至於號稱萬物之靈的我們（靈長類）等真核生物都有粒線體（圖 1）存在，它是位於細胞質內的胞器之一，呈粒狀或桿狀雙層膜構造，其長徑約 1.5—3.0 μm ，短徑約 0.5—1 μm ，主要功能為提供細胞所需的能量。粒線體被認為是原核生物藉由「內共生」(endosymbiosis) 形成模式進入真核細胞，因而具有原核生物的特性，其轉錄 (transcription) 和轉譯 (translation) 基因的方式和原核生物相同，增殖方式也和原核生物一樣採二分法 (binary fission)。對動物細胞而言，它是除了細胞核外，唯一具備遺傳訊息的胞器。每個細胞中約有數百至數千個粒線體，而每個粒線體則帶有 2—10 套 (copy) 的粒線體 DNA。DNA 分布在粒線體的內膜間，其基因結構、大小及遺傳特性均與細胞核的體染色體基因不同。瞭解粒線體及其 DNA 之特性，是建立粒線體 DNA 資料庫的先決條件。

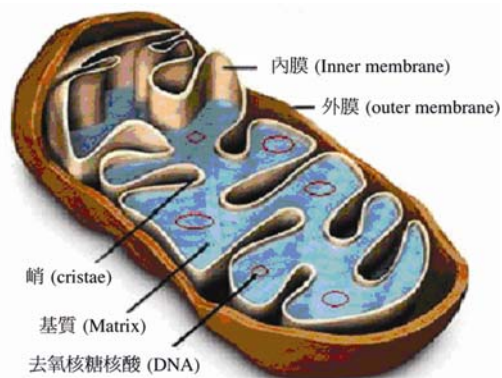


圖 1 一般動物細胞內的粒線體內部構造圖

外膜：粒線體最外層；內膜：高度摺疊，有氧呼吸在此進行，從而釋放能量；嵴：內膜高度摺疊而形成，以增加粒線體的表面積；基質：內膜以內的空間，可供 mtDNA 在此複製、轉錄與轉譯；去氧核糖核酸：存在於粒線體之環狀核酸物質，可自行複製、轉錄與轉譯 (Michael W. Davidson, <http://micro.magnet.fsu.edu/cells/mitochondria/mitochondria.html>)

粒線體 DNA 的構造

動物的粒線體基因體絕大部分為環狀分子結構 (圖 2)，其長度約含 14000—40000 鹼基對。大多數的粒線體 DNA，可分成兩部分：一為編碼區 (coding region)，又分成：(1) 蛋白質編碼區，負責編碼 13 個參與氧化磷酸化 (oxidative phosphorylation) 的酵素；(2) 核糖體 RNA 基因區，產生 12S 及 16S 核糖體次單元 (subunits) 及(3)轉運子 RNA (tRNA) 基因區，產生 22 種胺基酸轉運子。另一部分為非編碼區 (non-coding region)，又稱為控制區 (control region)，此區為控制粒線體基因的複製及轉錄的重要區段，在脊椎動物稱為 displacement loop (D-loop) (Avise et al., 1987)，在無脊椎動物則因此區段的核苷酸組成以 A 及 T 為主，故又稱為 AT-rich 區域 (Okimoto et al., 1992)；無論脊椎或無脊椎動物，此區段的核苷酸組成變異均頗大，具有

兩個較高的多型性變異區 (Hypervariable region, HV) 稱為 HV-1 及 HV-2。HV-1 位於第 16,000—16,400 鹼基之間；而 HV-2 則位於第 50—400 鹼基之間 (Bender et al., 2000)。

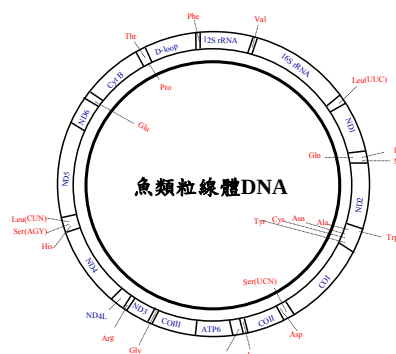


圖 2 魚類粒線體基因之環狀分子結構

粒線體 DNA 的特性

當受精作用 (fertilization) 發生時，精子只有精核進入卵細胞，其餘則殘留在卵細胞外。因此，受精卵的粒線體皆由卵子提供。也就是說，來自同一母體的子代，皆含有相同的母系遺傳粒線體 DNA。

雙股環狀的粒線體 DNA 不同於受組織蛋白 (Histone) 保護的體基因組 DNA。粒線體 DNA 裸露於自由基中，容易受到氧化還原反應的影響而發生突變，再加上粒線體 DNA 在複製時，參與的聚合酵素 γ 缺乏有效率的校讀機制 (proof-reading) 及修補機制 (repair mechanism)，以致於複製的忠實性 (fidelity) 較差 (Simon et al., 1994)。所以，粒線體 DNA 很容易發生突變及缺損。

體染色組於複製時會有聯會 (synapsis) 動作而有基因互換及重組等現象，但是粒線體 DNA 則無此種現象，只有單純的模版雙股複製，因而容易發生核苷酸誤植或缺失。同時，粒線體基因體相對較小 (以人類而言，

為 1.6×10^4 比 3×10^9 鹼基對)，所以，一般而言，粒線體 DNA 之核苷酸變異速度比體染色組 DNA 快 (Saccone et al., 2000)。另一個特性是不同的基因片段之變異速度，在不同分類階層的生物也會不同 (Motiyama et al., 1992)。此外，粒線體基因體的基因組成和排列方向隨不同物種而異，分類階層愈接近者相似度愈大。

粒線體 DNA 的應用

粒線體基因體中的 13 個蛋白質基因座，無論是脊椎動物 (人類)，或無脊椎動物

中的昆蟲 (蜜蜂、瘧蚊及果蠅)、枝角類 (水蚤)、葉足類 (豐年蝦)、蝦類 (泰國蝦、草蝦、斑節蝦及南極蝦) 及貝類 (鮑魚及牡蠣) 等，雖然其基因的數量及種類在各物種間的差異不大，但各基因的順序及其間隔區 (intergenic spacer, IGS) 的特徵在生物的分類階層上就產生了『門』的差異，例如圖 3 中的節肢動物門 (從蜜蜂到南極蝦) 和軟體動物門 (鮑魚和牡蠣) 所示。又如，昆蟲類、枝角類、葉足類及蝦類的基因順序不因物種的不同而有所差異，但 12S 和 ND2 基因間的基因間隔區及 t-RNA 的數量及排列則有所不同，可作為鑑別的目標位置。同理，這些粒

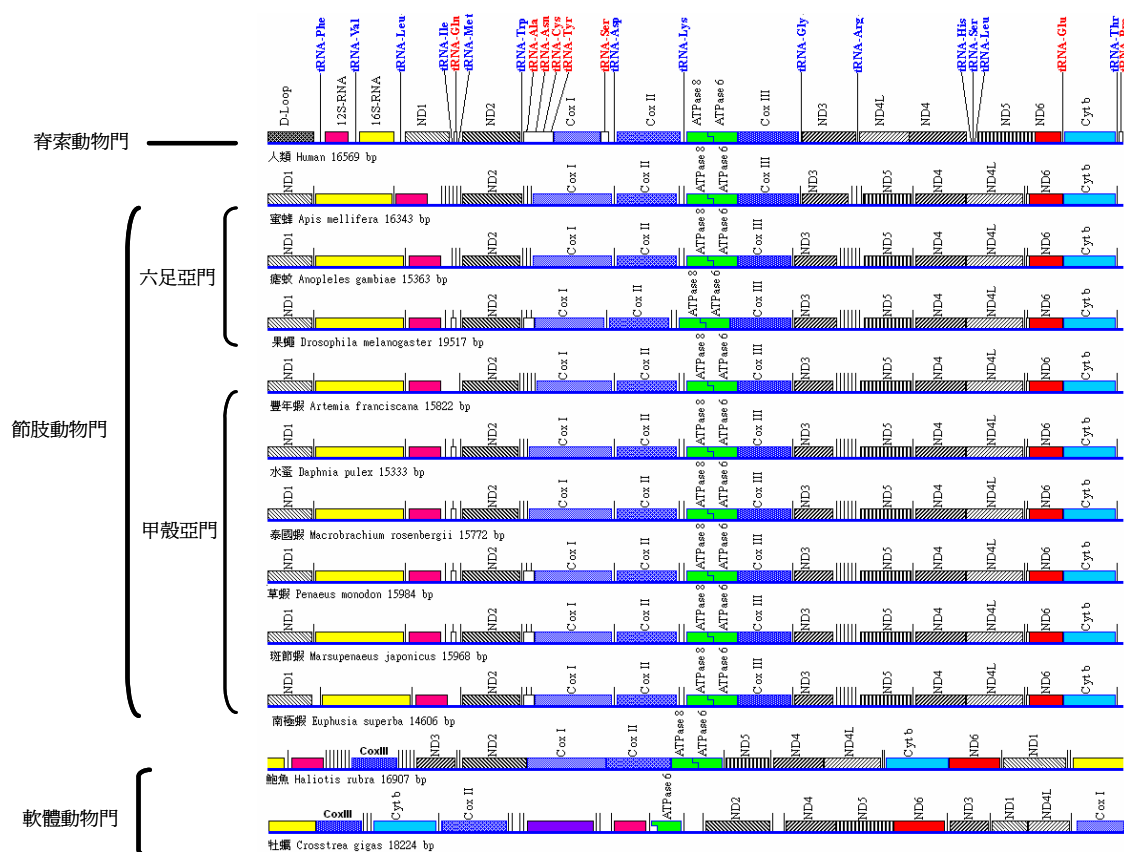


圖3 選取12種生物粒線體DNA數據資料繪製而成，圖中包含13個蛋白質基因座，12S及ND2基因間的基因間隔區和t-RNA的數量及排列。(資料來源：Machida et al., 2004；NCBI web 2006)

線體基因體的各蛋白質編碼、22 種的 tRNA 及 16S、12S 的核苷酸序列的基因編碼區，或者基因間隔區，其核苷酸組成及排列都各有其特性，如圖 4 所示，以本所已完成定序之蝦類的 16S rRNA 核苷酸序列為例，從不同種類的保守區（核苷酸種類及順序，不因種別而有差異）及非保守區（核苷酸種類及順序有目、科、屬及種的差異）的差異程度經量化後，可依據定義作為分類的依據。同理，其他的基因序列在有所特殊定義之下，也可作為鑑種、遺傳分化或系統分化等之目標基因。

粒線體 DNA 中的 CoxI、II、III、Cyt b、16SrRNA、12SrRNA 及 tRNA 基因序列常被作為研究對象 (Calhoun et al., 1994)，根據其核苷酸序列的相似程度，透過數量化的遺傳距離分析方法，已普遍應用於生物分類階層的『科』及『目』之親緣關係研究上。此法有利於追溯物種演化的分歧點。在取材方面，高保守性之蛋白質基因適用於『科』及『屬』之親緣關係分析，變異性較高之蛋白

質基因則適用於生物分類階層的『屬』及『種』之親緣關係分析。基因體的控制區（有變異區及非變異區）具有遺傳多型性，可據以分析母系的親子關係及族群基因結構 (Bender et al., 2000)。

結論

分子生物技術日新月異，粒線體基因體的解碼速度與日激增，已完成建檔之種類正快速增加（目前本所已建立 66 種經濟魚類粒線體細胞色素 b(Cyt b) 基因核苷酸序列資料庫），透過進一步比對各物種的基因順序及核苷酸序列的共通性及差異性，未來可廣泛的應用在水產物鑑定及類緣關係、生物地理及族群結構等研究。因此，本所正積極的針對經濟性魚介貝類，建立適用的技術平台，加速累積更多的資料，未來將其應用於微陣列模式，發展生物晶片，以提高鑑定的速度及準確性。

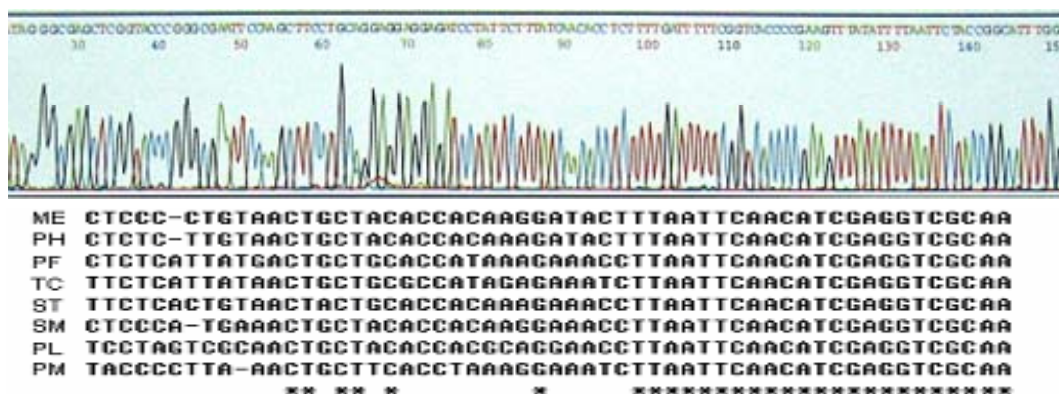


圖 4 已完成定序之蝦類的序列圖譜(部分)；從 8 種經濟蝦類所得 16S rRNA 序列分析片段結果，比較不同的蝦類保守區(星號)與非保守區(無星號)之間的差異程度。

對蝦科 Penaeidae：劍角新對蝦(沙蝦)*Metapenaeus ensis* ME；長角仿對蝦(劍蝦)*Parapenaeopsis hardwickii* PH；長縫側對蝦(尖仔)*Parapenaeus fissuroides* PF；彎角鷹爪對蝦(厚殼蝦)*Trachypenaeus curvirostris* TC；長足側對蝦 *Parapenaeus longipes* PL；草對蝦(草蝦)*Penaeus monodon* PM；櫻蝦科 Sergestidae：日本櫻蝦(花殼王)*Sergia talismani* ST；管鞭蝦科 Solenoceridae：突額管鞭蝦(大頭蝦)*Solenocera melantho* SM