

鬱金香芋螺全粒線體基因之探討

陳柏瑋^{1,3}、蕭聖代²、陳高松¹、黃登福³、曾振德¹

¹水產試驗所企劃資訊組、²海洋漁業組、³國立臺灣海洋大學食品科學系

前言

芋螺 (*Conus*) 分類上屬於軟體動物門 (Mollusca)，腹足綱 (Gastropoda)，前鰓亞綱 (Prosobranchia)，新腹足目 (Neogastropoda)，芋螺科 (Conidae)，全世界皆有分布，目前約有 500—700 種，為夜行性動物，並依捕食對象分為食蟲類 (vermivorous)、食軟體動物類 (molluscivorous) 及食魚類 (piscivorous)。鬱金香芋螺 (*Conus tulipa*) (圖 1) 為食魚類芋螺，以齒舌作為捕食攻擊及防禦的武器，呈中空魚叉狀，可注滿具神經毒之毒液，其毒性強烈，可能使人致命，但不常見。主要棲地包括臺灣、中國、印尼等地之潮間帶至潮下帶。

動物體內之遺傳物質可區分成兩類，大部分的遺傳物質包含在細胞核內，即所謂的染色體 DNA，而另有一小部份核酸物質存在於核外的粒線體胞器內，稱為粒線體 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA)。一般來說，蛋白質、核 DNA (nuclear DNA)、mtDNA 和 RNA 等分子的胺基酸或鹼基序列之分子生物資料，可用來比較分類群間的分子特徵 (molecular character) 差異。

由於 mtDNA 本身擁有一套獨立的遺傳物質，結構大小與遺傳特性有別於 genomic



圖 1 鬱金香芋螺 (*Conus tulipa*)

DNA，且 mtDNA 之組成型態較為單純，因此近來廣泛利用 mtDNA 來探討親緣關係、物種演化、族群結構與生物地理等。動物 mtDNA 有一些共同的特徵，包括：非編碼控制區、2 個 ribosomal RNA 基因 (12S 與 16S rRNA)、22 個 transfer RNA 基因、13 個蛋白質基因 (包括 7 個 NADH dehydrogenase 之次單位體、2 個 ATP synthetase、3 個 cytochrome oxidase 之次單元體及 cytochrome b gene)。

基因體定序工程浩大，傳統的生物技術是遙不可及的，由於定序技術與電腦科技的發展，使分子生物學技術與生物資訊分析隨科技進步，基因體之定序朝向低成本與高通量 (high-throughput) 的方向發展，被稱之為

次世代定序 (next-generation sequencing, NGS)。次世代定序的發展，加快了 DNA 定序的速度，以多樣本定序反應等方式，來縮短並減少定序反應所需時間與成本。

國外在芋螺的研究上，長期以來已有一定的發展，而四面環海的臺灣雖具備先天地利，但利用生物技術辨識芋螺物種之研究則尚未成形，故芋螺物種的鑑定仍多以形態特徵為依據。然而在野外採集時會發現許多芋螺殼上覆蓋碳酸鈣沉澱或其他物質，可能難以依外部形態特徵判斷其物種，甚至因螺體在幼貝及成貝上的個體差異或因演化快速，棲地重疊的關係，產生隱蔽種 (cryptic species) 或新種，而發生誤判。由此可知，單靠芋螺之形態特徵來進行物種鑑定是不足的。

有鑑於芋螺的演化變異研究，除了傳統以型質特徵作為分類依據外，多以粒線體 DNA 部分片段，如 *COI*、12S 及 16S rRNA 作為研究目標，而國內尚未針對其全粒線體基因進行完整定序，並進一步建立以分子生物技術鑑別芋螺類的資料庫，故本研究利用次世代定序技術組裝出鬱金香芋螺的完整粒線體基因組，進而討論其各基因之組成與註解其基因。

材料與方法

一、材料

本研究之鬱金香芋螺樣本取自基隆市外木山海岸。以水肺潛水採集，將活體樣品直接帶回實驗室，由中央研究院生物多樣中心軟體動物研究室專家進行外觀鑑定。量取樣本之殼長及殼寬並照相記錄後，再解剖取出

肌肉組織進行 DNA 粗萃，並保存於 99.5% 乙醇中以 -20°C 凍藏備存。

二、DNA 萃取與純化

使用 KingFisher (Thermo LabSystems, Waltham, MA, USA) 萃取儀配合 Chemagic DNA Tissue 10 Kit (Chemagen AG, Baesweiler, Germany) 自動萃取純化 DNA。以芋螺腹足組織 10 mg 加入 100 μl 裂解液 (lysis buffer) (含 proteinase K) 於 56°C 乾浴震盪 (600 rpm) 至完全分解。取 50 μl 的離心上清液，於 96 孔盤混合 38 μl 的磁珠 (magnetic beads) 與 132 μl 的連結緩衝液 (binding buffer)，透過磁棒吸附已連結核酸之磁珠，搬動磁珠至其他位置進行純化及清洗的動作。最後以沖提緩衝液 (elution buffer) 將核酸析出。純化後 DNA 濃度以核酸測定分光光度計 Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Delaware, USA) 測量，在 UV 下 A260/A280 比值介於 1.7–2.0 間；A260 介於 0.1–1.0 之間，以得到最佳純化後 DNA 濃度。

三、膠電泳觀察結果

取 5 μl 之 DNA 粗萃取液，混合 1 μl loading dye，載入 2% 瓊脂凝膠 (agarose gel) 膠電泳片 (以 agarose 溶入 1X TBE buffer，其中 TBE buffer 含有 0.089 M Tris、0.089 M boric acid、0.002 M、pH 8.0 的 EDTA)。在 TBE buffer 的環境下，以 100 伏特電壓電泳約 40 分鐘。將膠片置入濃度約 10 $\mu\text{g/ml}$ 溴化乙錠 (ethidium bromide, EtBr) 溶液中染色約 20 分鐘，取出後以清水退染 10 分鐘。以紫外燈照相系統 (Hitachi Image VDS System, Hitachi Co., Tokyo) 照相並存檔，以確定粗萃 DNA 片段大小。

四、建置 library 及 Illumina MiSeq 高通量定序

委託生技公司將 QC 過的鬱金香芋螺 total DNA 利用超音波將 DNA 片段化為 200 – 500 bp 的大小，並在片段兩端加上轉接子形成 Illumina DNA library。DNA library 建置好後，將帶有轉接子的 DNA 片段通過 MiSeq flowcell 晶片 (Illumina, San Diego, CA)，晶片裡含有互補序列，可與 DNA 片段兩端的轉接子互補配對。再透過橋式聚合酶連鎖反應進行增幅以達到定序所需的訊號強度。接著置入依不同鹼基而標記特定且可移除螢光分子的 dNTP 材料與反應試劑，如此反覆進行螢光標記移除、試劑置換與偵測，以快速讀取大量之定序結果。

五、參考序列比對及 *de novo* assembly

將下機後去掉轉接子的 clean data 利用資訊軟體 Geneious (Geneious V8.1, Auckland, New Zealand) contig，以 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 網站上發表的三種已知芋螺 (*C. textile*, *C. borgesi*, *C. consors*) 粒線體全

基因組作為參考基因序列 (reference genome) 進行比對與 *de novo* assembly 組裝。

六、對鬱金香芋螺組裝完成之序列進行註解

將組裝好的鬱金香芋螺粒線體全基因組序列，以線上分析平台 DOGMA, ARWEN 及 tRNAscan-SE 做 protein-coding, rRNA 及 tRNA 基因的分析預測。

結果與討論

本研究以 Illumina MiSeq 次世代定序平台，成功定序出鬱金香芋螺之 total DNA 基因組約 2 Gb 的序列量，並得到 8,087,402 條 reads (圖 2)。其中經比對為 mtDNA 基因組之序列共 1,199 條 reads，佔總 reads 的 0.01%，平均定序深度約為 25.2 倍覆蓋度。將取得的 1,199 mtDNA reads 透過生物資訊軟體拼接組裝得到鬱金香芋螺完整粒線體環狀全基因組為 16,599 bp。其鹼基組成為腺嘌呤 (adenine, A) 者佔 28.7%，胞嘧啶 (cytosine, C) 佔 15.2%，鳥糞嘌呤 (guanine, G) 佔 18.4%，

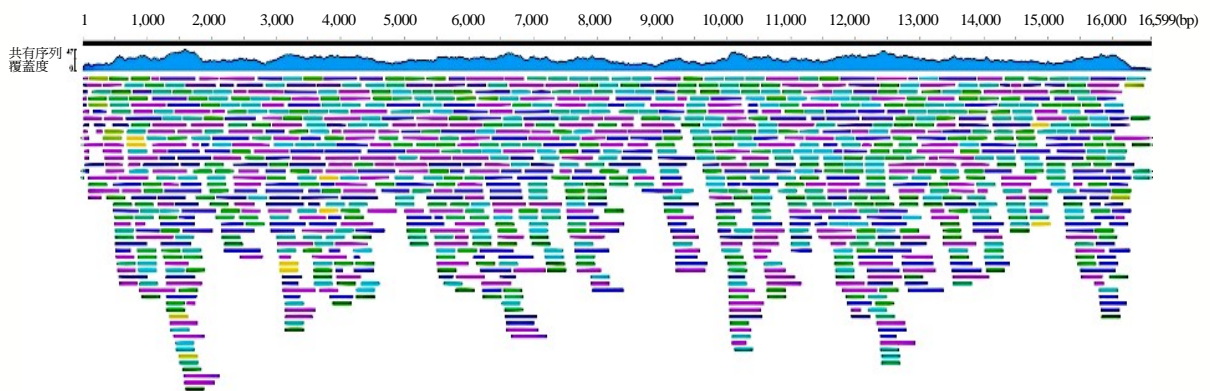


圖 2 鬱金香芋螺粒線體序列組裝

胸腺嘧啶 (thymine, T) 佔 37.7%。鬱金香芋螺粒線體基因組的為 16,599 bp 雙股環狀 DNA 組成 (圖 3)，含有 13 個 protein-coding gene、2 個 ribosomal RNA 及 22 個 tRNA (如表)。最後本研究將次世代定序技術分析所得之結果，於 NCBI GenBank 上註冊，取得首次發表的鬱金香芋螺全粒線體基因組之核酸 accession number，KR006970。

目前，國內外學者多著重於脊椎動物粒線體基因組的研究，許多脊椎動物粒線體基

因組結構已被分析及發表，然而軟體動物，尤其是芋螺，種類繁多卻少被探討。本研究以次世代定序方法建立出芋螺之全粒線體基因組，並利用比較基因組學和生物資訊學之方法，對全粒線體基因組成結構進行分析。未來將進一步與國際間已發表之物種進行比較，探討芋螺的種間差異，以作為芋螺分子生物學及親緣關係的基礎資料和依據，進而建立臺灣芋螺全粒線體基因之資料庫。

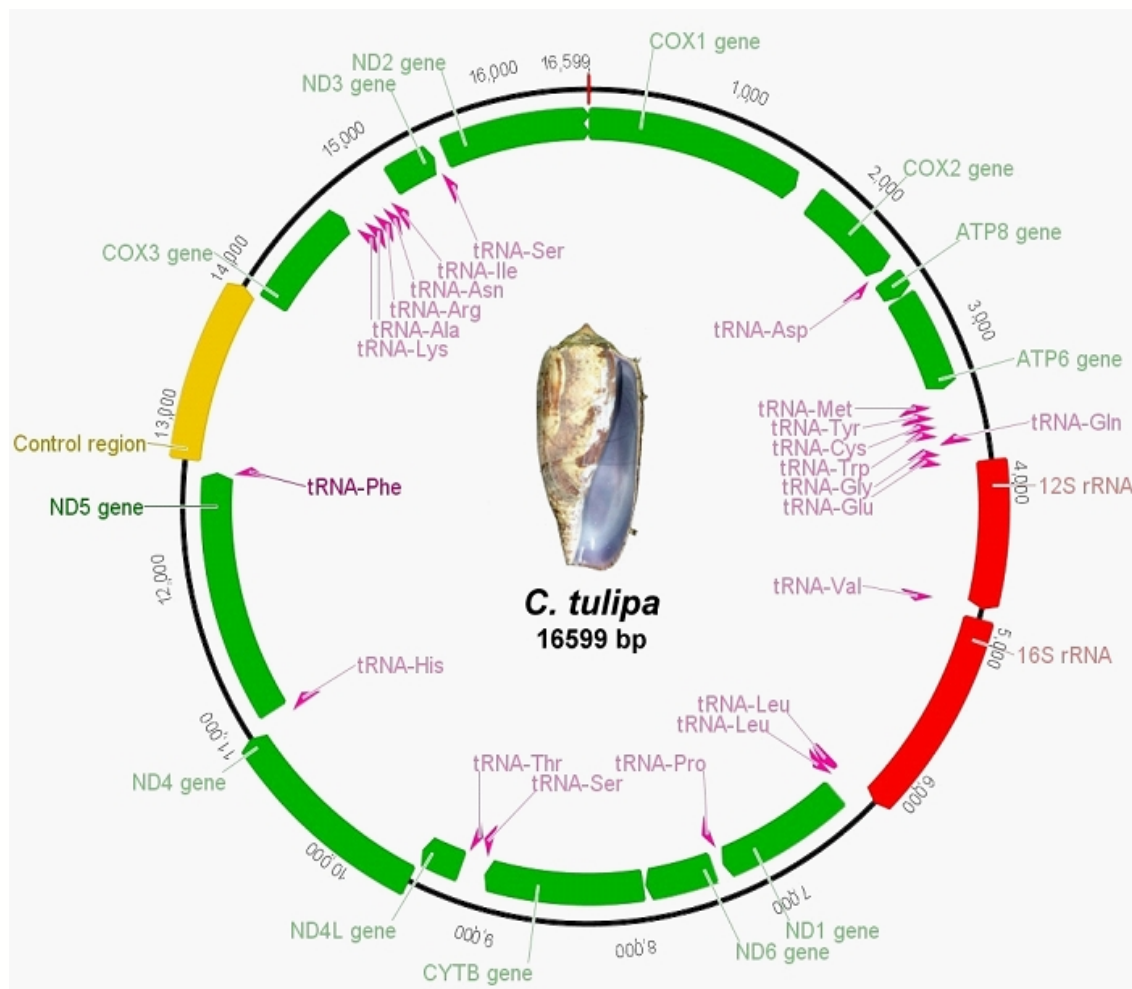


圖 3 鬱金香芋螺環狀粒線體基因組

鬱金香芋螺全粒線體基因註解

基因 Gene	起始序列 From	終點序列 To	長度 Length(bp)	起始密碼子 Start codon	終止密碼子 Stop codon	反密碼子 Anticodon	股 Strand
<i>COX1</i>	1	1,548	1,548	ATG	TAA		H
<i>COX2</i>	1,702	2,388	687	ATG	TAA		H
tRNA-Asp	2,390	2,455	66			GTC	H
<i>ATP8</i>	2,456	2,617	162	ATG	TAA		H
<i>ATP6</i>	2,624	3,319	696	ATG	TAA		H
tRNA-Met	3,358	3,425	68			CAT	L
tRNA-Tyr	3,437	3,505	69			GTA	L
tRNA-Cys	3,507	3,572	66			GCA	L
tRNA-Trp	3,573	3,638	66			TCA	L
tRNA-Gln	3,636	3,702	67			TTG	L
tRNA-Gly	3,709	3,774	66			TCC	L
tRNA-Glu	3,775	3,842	68			TTC	L
12S rRNA	3,843	4,801	959				H
tRNA-Val	4,802	4,868	67			TAC	H
16S rRNA	4,869	6,232	1,364				H
tRNA-Leu	6,233	6,304	72			TAG	H
tRNA-Leu	6,310	6,378	69			TAA	H
<i>NAD1</i>	6,379	7,320	942	ATG	TAG		H
tRNA-Pro	7,326	7,391	66			TGG	H
<i>NAD6</i>	7,392	7,892	501	ATG	TAA		H
<i>CYTB</i>	7,903	9,042	1,140	ATG	TAA		H
tRNA-Ser	9,055	9,119	65			TGA	H
tRNA-Thr	9,128	9,197	70			TGT	L
<i>NAD4L</i>	9,218	9,514	297	ATG	TAG		H
<i>NAD4</i>	9,508	10,890	1,383	ATG	TAG		H
tRNA-His	10,890	10,958	69			GTG	H
<i>NAD5</i>	10,959	12,677	1,719	ATG	TAA		H
tRNA-Phe	12,677	12,742	66			GAA	H
Control region	12,743	13,917	1,175				H
<i>COX3</i>	13,918	14,697	780	ATG	TAG		H
tRNA-Lys	14,720	14,790	71			TTT	H
tRNA-Ala	14,801	14,868	68			TGC	H
tRNA-Arg	14,883	14,951	69			TCG	H
tRNA-Asn	14,963	15,032	70			GTT	H
tRNA-Ile	15,042	15,114	73			GAT	H
<i>NAD3</i>	15,118	15,471	354	ATG	TAA		H
tRNA-Ser	15,477	15,544	68			GCT	H
<i>ND2</i>	15,545	16,599	1,055	ATG	TA		H