

丰鲤及其双亲线粒体 DNA 限制性酶切图谱的研究

戴建华¹, 殷文莉²

(1. 南京师范大学生命科学学院 210097 江苏 南京)

(2. 南京林业大学森林资源与环境学院 210037 江苏 南京)

[摘要] 采用密度梯度离心及 RNase 消化法制备并纯化了丰鲤(*Feng carp*)、兴国红鲤(*Xingguo red carp*)及散鳞镜鲤(*Scatter scaled mirror carp*)的肝脏线粒体 DNA, 用 10 种限制性内切酶 *Hind* III、*Eco*R I、*Bam*H I、*Xba* I、*Xho* I、*Pst* I、*Bgl* II、*Sal* I、*Bgl* I、*Pvu* II 进行了分析。丰鲤 mtDNA 相对分子质量约为 9.88×10^6 , 大小约为 16.49 kb; 兴国红鲤 mtDNA 相对分子质量约为 9.89×10^6 , 大小约为 16.50 kb, 散鳞镜鲤 mtDNA 相对分子质量约为 9.87×10^6 , 大小为 16.48 kb。 *Hind* III、*Eco*R I、*Bgl* I、*Bam*H I、*Xba* I、*Xho* I、*Sal* I、*Bgl* II、*Pst* I 及 *Pvu* II 在丰鲤、兴国红鲤、散鳞镜鲤线粒体 DNA 分子上均分别有 6、4、3、3、3、1、1、0、1 和 4 个切点。根据单酶切及双酶切结果, 构建了丰鲤、兴国红鲤、散鳞镜鲤 mtDNA 9 种酶的限制性酶切图谱。结果表明丰鲤、兴国红鲤及散鳞镜鲤 mtDNA 间缺乏变异性。

[关键词] 丰鲤、兴国红鲤、散鳞镜鲤、线粒体 DNA、限制性酶切图谱

[中图分类号] Q953, **[文献标识码]** A, **[文章编号]** 1001-4616(2004)03-0066-04

动物线粒体基因组是一类相对独立的真核细胞遗传体系, 除少数低等真核生物的线粒体 DNA 是线状 DNA 分子外, 一般都是环状的 DNA 序列。mtDNA 的基因结构、遗传密码及复制与核 DNA 有显著差异。由于其基因的大小及结构在进化上十分保守, 具有遵循母系遗传、几乎不发生重组、进化速度快、突变率高以及不同的区域进化速度存在差异等特点, 已成为分子群体遗传学和分子系统学研究的重要的遗传标记, 并被作为一个相对独立的系统用于动物种质、遗传多样性、遗传育种、动物系统演化及动物分子地理学的研究^[1-6]。近年来以 mtDNA 为分子标记探讨动物的群体遗传结构与系统演化规律成为研究热点^[7-9], 在鱼类生物学研究中线粒体 DNA 分析也成为一个重要领域。对鱼类 mtDNA 酶切图谱的研究, 是深入研究 mtDNA 基因图谱、进行基因定位的基础工作, 可以为建立基因图库及核苷酸序列分析提供实验数据。

我国是世界上饲养鲤鱼历史最悠久的国家。长期以来, 由于人们的生产实践和不同地理自然条件的影响, 形成了许多鲤鱼品种。它们不仅在体形、外貌和体色上有许多不同, 在生理习性、抗病能力以及肉质等经济性状方面也有差异。利用这些具有不同特点的鲤鱼品种进行杂交, 经过选择能够培育出优良的杂交鲤。兴国红鲤及散鳞镜鲤杂交可培育出优良的丰鲤, 丰鲤又可作为亲本杂交产生更加优良的三交鲤(Three hybridized carp), 开展对它们的 mtDNA 的研究对其种质研究及育种工作具有重要的指导作用。以前对鲤、兴国红鲤、散鳞镜鲤等不同品种鲤的研究主要集中于形态方面, 在细胞遗传学、生化遗传学和分子遗传学等方面的研究较为欠缺^[10]。近些年在这些方面做了一些工作^[11-14], 但对丰鲤、兴国红鲤、散鳞镜鲤 mtDNA 酶切图谱及其多态性的研究还未见报道。本文采用 10 种限制性内切酶对这三个鲤品种的 mtDNA 进行了研究。

1 材料和方法

1.1 材料

丰鲤、兴国红鲤、散鳞镜鲤采自中国科学院水生生物研究所及武汉市东西湖渔场。

1.2 mtDNA 的提取纯化

丰鲤、兴国红鲤、散鳞镜鲤健康活鱼各 5 条取肝, 匀浆, 2 200 r/min 离心 10 min, 上清液 15 000 r/min 离心 30 min。沉淀用 TEK 悬浮, 加 20% NP-40 至终浓度 1%。用酚/氯仿/异戊醇抽提去蛋白, 再用氯仿/异戊醇(24:1, 体积比)抽提。水相加入 2 倍体积无水乙醇, -20℃保存 24 h。离心取沉淀, 样品干燥后用 TE 溶解, 加入 RNase 备用。

收稿日期: 2004-04-28。

基金项目: 湖北省自然科学基金资助项目(97J049)。

作者简介: 戴建华, 1964- , 南京师范大学生命科学学院副教授, 主要从事动物分子遗传学的教学与研究, E-mail: dai-jianhua@163.com

万方数据

1.3 mtDNA 酶切图谱的构建

方法详见文献^[18].

2 结果

2.1 丰鲤、兴国红鲤、散鳞镜鲤 mtDNA 酶切结果

Hind III、*EcoR* I、*Bgl* I、*BamH* I、*Xba* I、*Xho* I、*Sal* I、*Bgl* II、*Pst* I 及 *Pvu* II 在丰鲤、兴国红鲤及散鳞镜鲤 mtDNA 分子上均分别有 6、4、3、3、3、1、1、0、1 和 4 个切点.

表 1 丰鲤、兴国红鲤、散鳞镜鲤 mtDNA 单酶切片断大小

酶	丰鲤	总计	兴国红鲤	总计	散鳞镜鲤	总计
<i>Pst</i> I	16.49	16.49	16.50	16.50	16.48	16.48
<i>Xho</i> I	16.49	16.49	16.50	16.50	16.48	16.48
<i>Sal</i> I	16.49	16.49	16.50	16.50	16.48	16.48
<i>BamH</i> I	8.43 4.37 3.69	16.49	8.44 4.38 3.70	16.51	8.43 4.36 3.68	16.47
<i>EcoR</i> I	7.79 4.16 3.36 1.17	16.48	7.80 4.17 3.36 1.17	16.52	7.80 4.16 3.35 1.17	16.48
<i>Xba</i> I	7.27 6.7 2.50	16.48	7.27 6.72 2.51	16.50	7.26 6.71 2.50	16.47
<i>Bgl</i> I	7.09 6.22 3.17	16.48	7.10 6.21 3.17	16.48	7.10 6.21 3.16	16.47
<i>Pvu</i> II	5.86 5.01 2.98 2.64	16.49	5.87 5.02 2.99 2.63	16.52	5.86 5.01 2.97 2.62	16.46
<i>Hind</i> III	6.38 5.28 2.35 1.11 0.68 0.68	16.48	6.40 5.28 2.36 1.10 0.68 0.68	16.50	6.39 5.27 2.35 1.11 0.68 0.68	16.48
<i>Bgl</i> II	No site		No site		No site	

2.2 丰鲤、兴国红鲤、散鳞镜鲤 mtDNA 酶切图谱的构建

2.2.1 丰鲤 mtDNA 酶切图谱的构建

取 *Pst* I 切点为基因组的零点, *BamH* I 3 个切点位于基因组的 18.62%、69.74%、96.24% 处; *EcoR* I 4 个切点分别位于基因组的 5.09%、25.49%、32.58%、79.85% 处; *Xho* I 切点位于基因组的 70.47% 处; *Bgl* I 切点分别位于基因组的 7.34%、50.36%、69.60% 处; *Pvu* II 切点分别位于基因组的 0.86%、16.86%、47.24%、82.78% 处; *Sal* I 切点位于基因组的 88.23% 处; *Xba* I 切点分别位于基因组的 35.01%、75.73%、90.90% 处; *Hind* III 切点分别位于基因组的 16.38%、55.10%、61.83%、65.96%、80.22%、84.34% 处; *Bgl* II 无切点.

2.2.2 兴国红鲤 mtDNA 酶切图谱的构建

同样取 *Pst* I 切点为基因组的零点, *Sal* I 位于基因组的 88.48% 处; *Xho* I 切点位于 70.48% 处; *BamH* I 3 个切点分别位于基因组的 18.59%、69.71%、96.24% 处; *EcoR* I 4 个切点分别位于 5.14%、25.48%、32.57%、79.78% 处; *Xba* I 3 个切点分别位于基因组的 35.09%、75.82%、91.03% 处; *Bgl* I 3 个切点分别位于基因组的 7.40%、50.49%、69.72% 处; *Pvu* II 的切点分别位于 0.96%、16.89%、47.27%、82.80% 处; *Hind* III 6 个切点分别位于 16.30%、55.09%、61.76%、65.88%、80.18%、84.30% 处; *Bgl* II 无切点.

2.2.3 散鳞镜鲤 mtDNA 酶切图谱的构建

取 *Pst* I 切点为基因组的零点, *BamH* I 3 个切点位于基因组的 18.52%、69.70%、96.17% 处; *EcoR* I 4 个切点分别位于基因组的 5.04%、25.38%、32.47%、79.80% 处; *Xho* I 切点位于基因组的 70.41% 处; *Xba* I 3 个切点分别位于基因组的 35.03%、75.78%、90.95% 处; *Bgl* I 的 3 个切点分别位于基因组的 7.35%、50.45%、69.64% 处; *Pvu* II 4 个切点分别位于基因组的 0.91%、16.83%、47.27%、82.87% 处; *Sal* I 切点位于基因组的 88.28% 处; *Hind* III 切点分别位于基因组的 16.27%、55.01%、61.75%、65.87%、80.14% 及 84.27% 处; *Bgl* II 无切点.

丰鲤、兴国红鲤、散鳞镜鲤 mtDNA 限制性酶切图谱见图 1.

3 讨论

线粒体为半自主性细胞器,受核基因和线粒体基因双重调节.高等动物 mtDNA 为惟一的核外遗传物质,其基因组长度及组织结构排列方式表现出高度保守的特性.与细胞核 DNA 不同,mtDNA 具母性遗传特征,通过卵细胞质传递给后代,与核基因共同作用维持线粒体的正常功能.核质基因互作研究已成为分子生物学研究领域的热点.除少数几种无脊椎动物外,绝大多数动物线粒体基因组为单亲(系)遗传,不
万方数据

受父系线粒体基因组的“渗入”,没有像核基因存在的重组现象^[15]. Gyllensten 等人以两种亲缘关系较远、mtDNA 差异较大的小鼠为父本和母本进行了多代回交实验,他们检测了回交的第 6 代和第 8 代杂种的 mtDNA 后发现,虽然核基因已基本上被父本所取代,但回交杂种细胞质中仍检测不出父本的 mtDNA 分子,证明回交杂种的 mtDNA 表现出严格的母性特征^[16]. Giles 等研究了几个家系 mtDNA 的遗传情况,也证明 mtDNA 没有遵循孟德尔遗传方式,而是母系遗传^[17]. 另一方面,mtDNA 的核苷酸序列改变的速度很快,其突变频率比单拷贝核 DNA 高很多,并且这种突变缺乏修复能力,因而使分化着的物种之间的 mtDNA 同源性迅速缩小. mtDNA 核苷酸序列的迅速歧异现象不仅表现为种间歧异性,而且也可以表现为种内多态性. 线粒体基因组中的 12S rRNA、16S rRNA 等 rRNA 基因、Cyt b 及 ND4 等蛋白质编码基因常被用作分子标记. 16S rRNA 和 Cyt b 是动物种内个体间较为保守的序列,已被作为鱼类种内的分子遗传标记^[15].

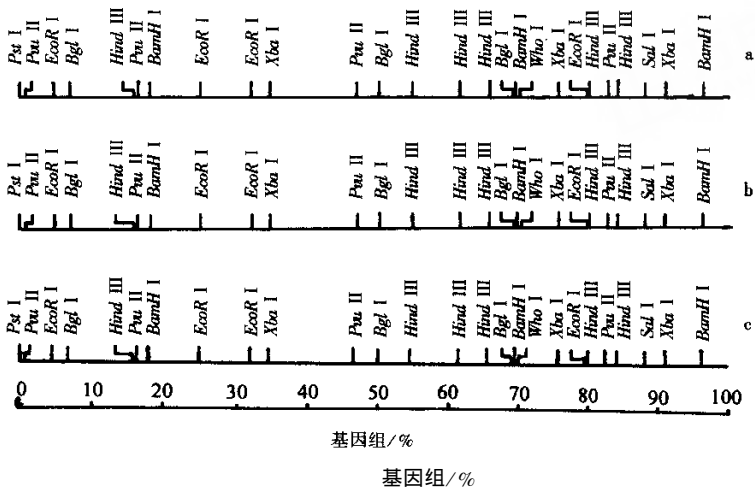


图 1 丰鲤(a)、兴国红鲤(b)、散鳞镜鲤(c)mtDNA 限制性酶切图谱

兴国红鲤是长体型鲤鱼中的一个优良养殖品种,在江西省兴国县有 1 300 多年的养殖历史,其体色呈红色而泛有金光,光泽耀目. 散鳞镜鲤属散鳞型,鳞片排列不规则,其体色为淡青色. 丰鲤是兴国红鲤(雌)与散鳞镜鲤(雄)杂交所得的子一代种鱼,其鳞型与母本兴国红鲤相同,全身披以规则的鳞片,体色呈青灰色. 丰鲤的体型介于双亲之间,体高、体宽均比亲本大,但头与吻则明显缩小,有较强的抗病能力,成为较好的养殖品种.

丰鲤、兴国红鲤、散鳞镜鲤均为鲤的不同品种. 比较三者的 mtDNA 分子大小及酶切图谱,表明三者 mtDNA 大小及结构几乎相同,10 种限制性内切酶在它们的 mtDNA 分子上的酶切位点位置非常接近,几无差异,没有发现多态现象. 将三者 mtDNA 限制性酶切图谱与鲤鱼(*Cyprinus Carpio*) mtDNA 的限制性图谱进行比较^[18],发现不同品种鲤鱼 mtDNA 分子间具有极高的遗传相似性. 这种现象也在其它鲤鱼(品种)中发现. 郑冰蓉对洱海四种鲤鱼(洱海鲤、春鲤、大眼鲤、杞麓鲤)28 个个体的 mtDNA 进行了研究,发现四种鲤鱼在种内和种间均缺乏 mtDNA RFLP. 其结果支持“种内缺乏多态”的观点^[19].

由于地理阻隔等原因,中国鲤某些品种不仅在体色上有异,在体形及其他特征上也有了变异. 然而在线粒体基因组或一些片段未能发现差异,这似乎有些意外. 童金苟等对野鲤、兴国红鲤及散鳞镜鲤线粒体 16S rRNA 和 Cyt b 基因片段序列进行了测定,发现 3 种测试鲤品种在多达 859 bp 无任何变异. 他们对可能的原因作了探讨,认为上述形态特征主要由核基因所控,线粒体基因组不参与这些变异;由于线粒体基因组缺乏突变修饰功能,因此突变一般会积累下来,从而使得它具有比核基因组更快的进化率. 可能在中国鲤中存在某种选择机制,例如稳定性选择,使得主导线粒体基因型在群体中保持绝对优势. 根据实验结果,他们认为野鲤、兴国红鲤及散鳞镜鲤可能在起源上是独立的一支,是从一个共同祖先在很近的时间才分化出来,品种间的分化程度相当低^[13]. 我们的实验结果亦支持这种观点.

[参考文献]

- [1] Broughton R E , Dowling T E . Length variation in mitochondrial DNA of the minnow , *Cyprinella spiloptera* [J] . Genetics , 1994 , 138 (1) : 179—190 .
- [2] Brown J R , Beckenbach A T , Smith M J . Mitochondrial DNA length variation and heteroplasmy in populations of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) [J] . Genetics , 1992 , 133 (1) : 221—228 .
- [3] Harrison R G . Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology [J] . Trend Ecol Evol , 1989 , (4) : 6—11 .
- [4] 戴建华 , 殷文莉 , 彭奎东 . 青鱼线粒体 DNA 限制性酶切图谱的研究 [J] . 南京师大学报(自然科学版) , 2002 , 25 (4) : 100—104 .
- [5] 殷文莉 , 戴建华 . 鳊及大眼鳊线粒体 DNA 比较研究 [J] . 水生生物学报 , 1998 , 22 (3) : 257—264 .
- [6] Broughton R E , Gold J R . Phylogenetic relationships in the North American cyprinid genus *Cyprinella* (Actinopterygii : Cyprinidae) based on mitochondrial ND2 and ND4L gene sequences [J] . Copeia , 2000 , 2000 (1) : 1—10 .
- [7] Broughton R E , Milam J E , Roe B A . The complete sequence of the zebrafish (*Danio rerio*) mitochondrial genome and evolutionary patterns in vertebrate mitochondrial DNA [J] . Genome Research , 2001 , 11 (11) : 1958—1967 .
- [8] Lenk P , Kalyabina S , Wink M , *et al* . Evolutionary relationships among the true vipers (Reptilia : Viperidae) inferred from mitochondrial DNA sequences [J] . Mol Phylogenet Evol , 2001 , 19 (1) : 94—104 .
- [9] Vences M , Chiari Y , Raharivoloniaina L , *et al* . High mitochondrial diversity within and among populations of Malaagasy poison frogs [J] . Mol Phylogenet Evol , 2004 , 30 (2) : 295—307 .
- [10] 楼允东 , 孙景春 . 江西三种红鲤起源与遗传多样性研究的进展 [J] . 水产学报 , 2001 , 25 (6) : 571—575 .
- [11] 李思发 , 蔡完其 , 赵金良 . 中国淡水主要养殖鱼类种质研究 [M] . 上海 : 上海科学技术出版社 , 1998 . 79—85 .
- [12] 梁利群 , 孙效文 , 闫学春 . RAPD 技术分析荷包红鲤抗寒品系与亲本的基因组变化 [J] . 中国水产科学 , 1998 , 15 (1) : 6—9 .
- [13] 童金苟 , 吴清江 . 三个鲤品种线粒体基因片段序列保守性 [J] . 水生生物学报 , 2001 , 25 (1) : 54—60 .
- [14] 魏东旺 , 楼允东 , 孙效文 , 等 . 鲤鱼微卫星分子标记的筛选 [J] . 动物学研究 , 2001 , 22 (30) : 238—241 .
- [15] Whitmore D H , Thai T H , Craft C M . The largemouth bass cytochrome *b* gene [J] . Fish Biol , 1994 , 44 (4) : 637 .
- [16] Gyllenstein U , Robb F , Leary , *et al* . Introgression between two cutthroat trout subspecies with substantial karyotypic [J] . Genetics , 1985 , 111 (4) : 905—915 .
- [17] Gils R E , Blanc H , Cann M , *et al* . Maternal inheritance of human mitochondrial DNA [J] . Proc Natl Acad Sci USA , 1980 , 77 (1) : 6715—6719 .
- [18] 戴建华 , 殷文莉 , 杨代淑 , 等 . 鲤鱼 mtDNA 酶切图谱的构建 [J] . 生物化学杂志 , 1996 , 12 (6) : 681—685 .
- [19] 郑冰蓉 , 张亚平 , 翁瑞光 . 洱海四种鲤鱼线粒体 DNA 遗传相似性的初步研究 [J] . 遗传 , 2001 , 23 (6) : 544—546 .

Study on Mitochondrial DNA of Feng Carp and Its Parents

Dai Jianhua¹ , Yin Wenli²

(1 . School of Life Science , Nanjing Normal University , 210097 , Nanjing , China)

(2 . College of Forest Resources and Environment , Nanjing Forestry University , 210037 , Nanjing , China)

Abstract : The mtDNA from liver of Feng carp , Xingguo red carp and Scatter scaled mirror carp has been isolated and purified by density gradient centrifugation and RNase digestion . They were analyzed with 10 kinds of restriction endonuclease , which were *Hind* III , *Eco*R I , *Bgl* I , *Bam*H I , *Xba* I , *Xho* I , *Sal* I , *Bgl* II , *Pst* I and *Pvu* II . The molecular weight of Feng carp mtDNA is 9.88×10^6 , about 16.49 kb ; and that of Xingguo red carp is 9.89×10^6 , about 16.50 kb ; and Scatter scaled mirror carp is 9.87×10^6 , about 16.48 kb . The digested sites of the enzymes are 6 , 4 , 3 , 3 , 1 , 1 , 0 , 1 and 4 , respectively . Based on results of single and double enzyme digestion , the restriction maps of Feng carp , Xingguo red carp and Scatter scaled mirror carp were established . The results showed that the genetic divergence among those 3 strains of common carp is exceptionally low .

Key words : Feng carp , Xingguo red carp , Scatter scaled mirror carp , mtDNA , restriction endonuclease map

[责任编辑 : 孙德泉]