

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, *EcoR* I, *BamH* 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, *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、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 单酶切片段大小

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

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].

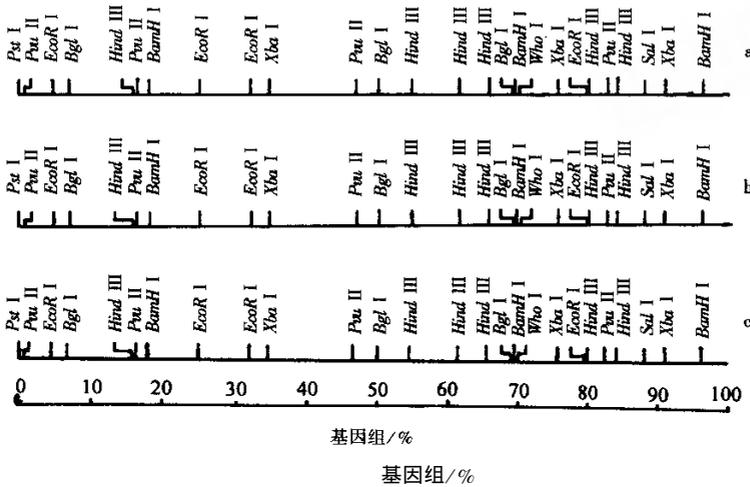


图 1 丰鲤(a)、兴国红鲤(b)、散鳞镜鲤(c)mtDNA 限制性酶切图谱

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. 董金苟等对野鲤、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 Malagasy 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 , 5 (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, 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]