

文章编号: 1000-0615(2000)06-0489-05

## 异源四倍体鲫鱼肝组织线粒体 DNA 的研究

黎双飞, 刘少军, 张轩杰, 罗琛, 周工建, 刘筠\*

(湖南师范大学生命科学学院, 湖南长沙 410081)

**摘 要:**用密度梯度离心和 DNase I、RNase 消化法从异源四倍体鲫鱼( $F_8$ )和鲫鱼  $F_2$  肝组织中提取和纯化线粒体 DNA(mtDNA)。用 9 种限制性内切酶对异源四倍体鲫鱼和鲫鱼  $F_2$  的 mtDNA 进行了分析, 结果表明 Xba I 和 Bgl II 两种限制性内切酶在异源四倍体鲫鱼 mtDNA 上存在酶切位点多态性。通过凝胶电泳测得异源四倍体鲫鱼 mtDNA 相对分子量平均约  $10.29 \times 10^6$  道尔顿, 分子大小为 16.20kb; 鲫鱼  $F_2$  mtDNA 相对分子量为  $10.18 \times 10^6$  道尔顿, 分子大小为 16.02kb。根据单酶解和双酶解的片段数目和分子大小, 构建了异源四倍体鲫鱼 mtDNA 的 7 种限制性内切酶(Kpn I、Pst I、Sal I、Xho I、Bgl II、BamH I 和 Xba I)酶切图谱。

**关键词:**异源四倍体鲫鱼; 线粒体 DNA; 限制性内切酶

中图分类号: Q959.468

文献标识码: A

### Study on the mtDNA from liver of allotetraploid hybrids of red crucian carp(♀) × common carp(♂)

LI Shuang-fei, LIU Shao-jun, ZHANG Xuan-jie, LUO Chen, ZHOU Gong-jian, LIU Yun  
(College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, China)

**Abstract:** The mitochondrial DNA(mtDNA) from liver of allotetraploid  $F_8$  hybrids of red crucian carp(*Carassius auratus* red var.)(♀) × common carp(*Cyprinus carpio* L.)(♂) and from liver of  $F_2$  hybrids were respectively isolated by means of the density gradient centrifugation and nuclease digestion, and analysed by 9 kinds of restriction endonucleases. The Xba I and Bgl II showed restriction site polymorphisms in the mtDNA from allotetraploid hybrids. The molecular weight of mtDNA of allotetraploid hybrids and  $F_2$  hybrids were respectively  $10.29 \times 10^6$  daltons with  $16.20 \times 10^3$  base pairs and  $10.18 \times 10^6$  daltons with  $16.02 \times 10^3$  base pairs, the data were estimated by using agarose gel electrophoresis. Based on the number and size of the restriction fragments obtained by single and double digestion, the mtDNA of allotetraploid hybrids physical map of 7 kinds of restriction endonucleases Xba I, BamH I, Kpn I, Pst I, Sal I, Xho I and Bgl II was constructed.

**Key words:** allotetraploid hybrids of red crucian carp(♀) × common carp(♂); mitochondrial DNA(mtDNA); restriction endonuclease

动物线粒体 DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)是闭合环状双链 DNA 分子,能进行自主复制的核外遗传物质,具有分子量小(15.2~19.8kb)、遵循母系遗传方式、基因组结构简单、一级结构进化速度快和易于分离、纯化等特点<sup>[1,2]</sup>。目前 mtDNA 分析已广泛应用于动物进化遗传学、分子分类学和生物地理学等研究领域,该技术在鱼类生物学研究中的应用已成为一个十分活跃的领域,亦取得了显著成

收稿日期:2000-04-14

资助项目:湖南省自然科学基金重点资助项目(湘科技字 199737)

作者简介:黎双飞(1975-),男,湖南浏阳人,硕士,从事鱼类繁殖生理和发育生物学研究。

通讯作者:刘筠(1929-),男,湖南武冈人,教授,从事鱼类生殖生理和育种学研究。电话:0731-8872450, E-mail:liuyun@hunnu.edu.cn

绩<sup>[3-9]</sup>。

湖南师范大学生命科学学院鱼类发育生物学研究室与湖南湘阴县东湖渔场合作,在红鲫(*red crucian carp*)(♀)×湘江野鲤(*common carp*)(♂)的杂交后代(鲫鱼 F<sub>1</sub>)中发现部分雄性可育<sup>[10]</sup>,并检测出鲫鱼 F<sub>1</sub>、F<sub>2</sub>是异源二倍体(2n = 100),鲫鱼 F<sub>3</sub>以后是可育的、并能稳定遗传的异源四倍体(4n = 200)<sup>[11,12]</sup>。目前在湖南师范大学建成了一个异源四倍体种质资源保护基地,并已顺利通过国家生物工程研究中心的验收。异源四倍体鲫鱼新种群的形成,使大批量培育快速生长的三倍体鱼在生产中得到广泛应用成为可能,并在生产实践中产生了显著的经济效益<sup>[13]</sup>,同时也为生产安全的转基因鱼提供了保证。湖南师范大学生命科学学院鱼类发育研究室已在异源四倍体鲫鱼的形态、受精生物学、性腺发育及核型等方面做了大量的工作<sup>[11,12]</sup>。为进一步研究异源四倍体鱼的遗传与进化,作者对异源四倍体鲫鱼和鲫鱼 F<sub>2</sub>的 mtDNA 进行了分析,并构建了异源四倍体鲫鱼 mtDNA 的 7 种限制性内切酶酶切图谱。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验用异源四倍体鲫鱼(F<sub>8</sub>)均取自湖南师范大学四倍体基因库种质资源保护基地,鲫鱼 F<sub>2</sub>由湘阴县东湖渔场提供。限制性内切酶酶购自北京华美生物工程公司。

### 1.2 mtDNA 的分离及纯化

实验鱼饥饿 1~2 d 后放血取新鲜肝组织,在 4℃ 条件下匀浆,差速离心得到线粒体,再用 DNase I 消化后离心得到纯净的线粒体。加 10% SDS 至终浓度为 1% 破膜,用已饱和的酚/酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)分别抽提 1、2 次后,再用氯仿/异戊醇(24:1)抽提 1 次,上清加预冷 2 倍体积无水乙醇沉淀得 mtDNA 粗品。用处理过的 RNase 在 37℃ 消化 1~2 h 后,重复上述抽提过程,沉淀 mtDNA,沉淀溶于适量 TE (0.01 mol·L<sup>-1</sup> Tris·HCl, 0.001 mol·L<sup>-1</sup> EDTA, pH 8.0) 中。

### 1.3 限制性内切酶酶解条件

单酶解反应总体积为 25 μL,其中含适量 mtDNA, 2.5 μL 相应的 10× buffer, 10~15U 限制酶, 37℃ 条件下水浴 3~4h。双酶切酶解反应总体积为 30μL, 对应的 10× buffer 分别加 2μL, 其它条件与单酶酶解相同。酶解后立即加酶解反应终止兼加样缓冲液。

### 1.4 琼脂糖凝胶电泳分析

采用水平板电泳,胶浓度为 1% (含溴化乙锭 0.5mg·L<sup>-1</sup>),电泳缓冲液为 TBE,电压 6~8V·cm<sup>-1</sup>,置于 4℃ 冰箱电泳 3~4 h。以 λDNA/Hind III 完全酶解片段作为相对分子量标准,电泳完毕用凝胶电泳图像分析仪(Gel-Pro Analyzer)摄影,并计算出各酶切片段和 mtDNA 的大小。

## 2 结果

### 2.1 mtDNA 单酶解片段分析

异源四倍体鲫鱼和鲫鱼 F<sub>2</sub> 的 mtDNA 用 9 种内切酶完全单酶解,由于 mtDNA 来源于多条鱼,我们在几次不同的酶切检测中发现 Bgl II 和 Xba I 在异源四倍体鲫鱼 mtDNA 上存在限制性酶切位点的多态性,其余 7 种酶均表现为完全的单态性,而鲫鱼 F<sub>2</sub> 表现为酶切位点的完全单态性,见表 1,图 1(A 和 B)。

### 2.2 异源四倍体鲫鱼 mtDNA 双酶解片段分析

异源四倍体鲫鱼 mtDNA 经双酶酶切后出现的片段数较多,并在 Xho I/Xba I、Pst I/Kpn I、Sal I/Xho

I、BamH I/Xho I、BamH I/Xho I 和 BamH I/Kpn I 共 6 条双酶切电泳带中出现了不完全酶切片段。结果见表 2,图 1(C 和 D)。

表 1 异源四倍体鲫鲤和鲫鲤 F<sub>2</sub> mtDNA 单酶切片段大小(kb)

Tab.1 Restriction fragments length(kb) of mtDNA of allotetraploid hybrids and F<sub>2</sub> hybrids with single enzyme

酶		片 段 长 度						总计
		1	2	3	4	5	6	
Pst I	A	12.85	3.30					16.15
	B	13.00	2.95					15.95
EcoR I	A	7.30	7.30	1.10	0.6**			16.30
	B	7.10	7.10	1.10	0.7**			16.00
Kpn I	A	9.60	6.60					16.20
	B	9.80	6.25					16.05
BamH I	A	12.50	3.80					16.30
	B	12.70	3.40					16.10
Hind III	A	6.80	5.05	2.25	1.40	0.6**		16.10
	B	6.95	5.10	2.10	1.20	0.6**		15.95
Bgl II	A(I)	14.70	1.40					16.10
	A(II)	16.20						16.20
	B	15.90						15.90
Xho I	A	16.20						16.20
	B	16.10						16.10
Sal I	A	16.15						16.15
	B	16.10						16.10
Xba I	A(I)	9.20	4.90	2.0				16.10
	A(II)	11.70	4.50					16.20
	B	11.50	4.55					16.05

注:\*\* 示该片段在紫外光下未能检出,根据相关片段的长度推算。A:异源四倍体鲫鲤[A(I)、A(II)表示多态性];B:鲫鲤 F<sub>2</sub>。

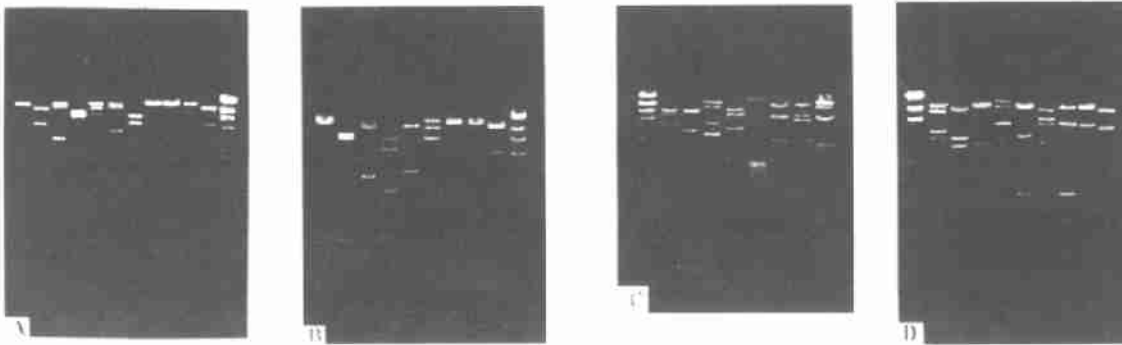


图 1 异源四倍体鲫鲤 mtDNA 单(A)、双(C 和 D)酶切和鲫鲤 F<sub>2</sub> mtDNA 单酶切(B)电泳图谱

Fig.1 Agarose gel electrophoretic patterns of the fragments of mtDNA from allotetraploid hybrids

(A: single digested, C and D: double digested) and F<sub>2</sub> hybrids (B: single digested).

A: a. Bgl II(I), b. Xba I(I), c. Pst I, d. EcoR I, e. Kpn I, f. BamH I, g. Hind III, h. Bgl II(II), i. Sal I, j. Xho I, k. Xba I(II), m.  $\lambda$ DNA/Hind III;

B: a. Sal I, b. EcoR I, c. Pst I, d. Hind III, e. BamH I, f. Kpn I, g. Xho I, h. Bgl II, i. Xba I, m.  $\lambda$ DNA/Hind III;

C: m.  $\lambda$ DNA/Hind III, a. Xho I/Kpn I, b. Sal I/Pst I, c. Bgl II/BamH I, d. Bgl II/Pst I, e. Bgl II/Sal I, f. Xba I/Sal I, g. Xho I/Xba I, h. Kpn I/BamH I;

D: m.  $\lambda$ DNA/Hind III, a. Xho I/BamH I, b. Sal I/BamH I, c. Xho I/Pst I, d. Xho I/Sal I, e. Xho I/Bgl II, f. Kpn I/Pst I, g. Kpn I/Sal I, h. Bgl II/Kpn I, i. Bgl II/Xba I

## 2.3 异源四倍体鲫鲤 mtDNA 酶切图谱的构建

Xho I 和 Sal I 单酶完全酶解均只有一个切点,以 Xho I 在异源四倍体鲫鲤 mtDNA 分子上的唯一切点作为线粒体基因组的零点(0kb 处)。Pst I 具有 2 个切点,Xho I/Pst I 双酶切时产生 3 个片段,这 3 个

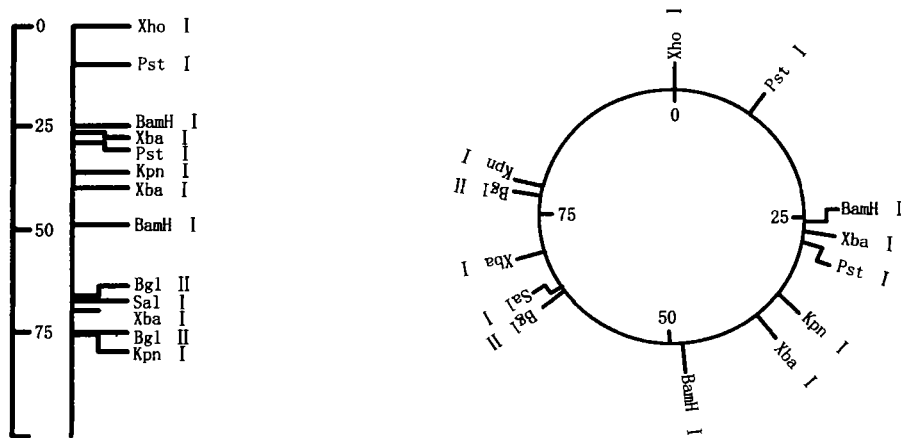
片段只有一种连接方式,但可以取1-2-3或3-2-1两种不同的方向。任取Xho I/Pst I 3-2-1为基因组的顺时针方向,根据双酶切结果可以确定Pst I的2个切点分别位于1.4kb及4.7kb处。同理,根据Xho I与有关酶的双酶切及其它酶的双酶切结果可以确定Sal I的酶切位点位于10.9kb处;Kpn I 2个酶切位点分别位于5.9kb处及12.4kb处;Bgl II 2个酶切位点分别位于10.8kb处及12.3kb处。BamH I 2个酶切位点分别位于4.1kb处及7.9kb处;Xba I 3个酶切位点分别位于4.3kb处、6.5kb处及11.4kb处。根据单、双酶切结果,构建了异源四倍体鲫鱼 mtDNA 7种酶 13个酶切位点的酶切图谱(图2)。

表2 异源四倍体鲫鱼 mtDNA 双酶酶切片大小(kb)

Tab.2 Restriction fragments length(kb) of mtDNA of allotetraploid hybrids with double enzyme

酶	片段长度							总计
	1	2	3	4	5	6	7	
Xho I/Xba I	9.10*	4.90	4.80	4.30	2.20			16.20
Xho I/Pst I	11.40	3.30	1.40					16.15
Pst I/Kpn I	9.60*	6.30	5.20	3.30	1.20			16.20
Xho I/Kpn I	6.50	5.90	3.70					16.20
Xho I/Bgl II	10.80	3.90	1.40					16.10
Bgl II/Kpn I	9.80	5.00	1.30	0.2**				16.30
Bgl II/Pst I	6.20	5.30	3.40	1.40				16.30
Bgl II/Xba I	8.20	4.30	2.20	1.0**	0.6**			16.30
Bgl II/Sal I	14.70	1.30	0.2**					16.20
Sal I/Xho I	16.10*	10.90	5.20					16.10
Sal I/Kpn I	9.60	5.0	1.50					16.30
Sal I/Pst I	6.60	6.40	3.25					16.25
Sal I/Xba I	9.10	4.50	2.20	0.2**				16.20
Sal I/BamH I	9.30	3.80	3.0					16.10
BamH I/Xho I	12.30*	8.30	4.10	3.80				16.20
BamH I/Bgl II	12.30*	8.00	3.80	2.80	1.40			16.00
BamH I/Kpn I	12.30*	7.80	4.40	2.0	1.90			16.40

注: \* 示该片段为不完全酶切片段, \*\* 示该片段在紫外光下未能检测到,根据相关片段的长度推算。



(A)线形图谱

(B)环形图谱

图2 异源四倍体鲫鱼 mtDNA 的限制性酶切图谱

Fig.2 The restriction map of mtDNA from liver of allotetraploid hybrids

### 3 讨论

从已构建的异源四倍体鲫鱼 mtDNA 酶切图谱中可以看出,7种内切酶 13个切点中的9个(69.2%)位于图距25~75范围内,表现出酶切位点分布的不均匀性。由于有些切点位置很接近,双酶切时一些小片段跑出胶外,或是紫外摄影灵敏度不够高的缘故,有些片段未能检出,这些片段的分子量只能根据

单、双酶切的片段长度推算出。作者用凝胶图像分析仪测得异源四倍体鲫鲤 mtDNA 分子量为  $10.29 \times 10^6$  道尔顿,分子大小为 16.20kb,鲫鲤  $F_2$  mtDNA 分子量为  $10.18 \times 10^6$  道尔顿,分子大小为 16.02kb,两者在 mtDNA 分子大小上并没有明显差异,与有关文献报道的动物 mtDNA 分子大小在 15.2~19.8kb 之间相符<sup>[2]</sup>。同时作者测得异源四倍体鲫鲤原始父本湘江野鲤 mtDNA 分子大小为 16.61kb,分子量为  $10.55 \times 10^6$  道尔顿<sup>[9]</sup>;原始母本红鲫的 mtDNA 分子大小为 16.19kb,分子量为  $10.29 \times 10^6$  道尔顿。从几个品系的 mtDNA 分子大小比较来看,异源四倍体鲫鲤和鲫鲤  $F_2$  的 mtDNA 分子大小与其原始母本红鲫更为接近。本研究室采用常规的肾细胞直接制片法,已检测出异源四倍体鲫鲤  $F_3 \sim F_9$  的染色体数目为 200,染色体组型结果表明它是异源整四倍体;并用流式细胞仪测得异源四倍体鲫鲤血液组织和肌肉组织的 DNA 含量是红鲫、湘江野鲤及其杂种鲫鲤  $F_1$ 、 $F_2$  的 2 倍,是异源三倍体湘云鲫、湘云鲤的 1.5 倍<sup>[11,12]</sup>。异源四倍体鲫鲤产生的原因可能是由于有些鲫鲤  $F_2$  的雌、雄个体能分别产生二倍体的卵子、精子,两者的结合产生了四倍体<sup>[14]</sup>。从本文实验结果来看,鲫鲤  $F_2 \sim F_3$  染色体加倍过程并未使异源四倍体鲫鲤线粒体 DNA 的分子大小产生加倍影响,说明了 mtDNA 母系遗传的特性,即 mtDNA 的遗传特性在精、卵结合以前就已经由卵子细胞质中的 mtDNA 决定。因此,作者认为异源四倍体鲫鲤种群可以作为研究脊椎动物线粒体 DNA 母系遗传的模式动物。

异源四倍体鲫鲤目前已稳定繁殖到鲫鲤  $F_{10}$ ,本实验用的材料均为鲫鲤  $F_8$ ,作者用 9 种限制性内切酶酶切异源四倍体鲫鲤 mtDNA,其主要类型(大约占 80%)的单酶切共有 22 个限制性酶切位点,而次要类型 20 个。由于 mtDNA 来源于多条异源四倍体鲫鲤,有些 Bgl II 和 Xba I 酶切带同时出现两种不同酶切位点的酶切片段结果,可以根据酶切片段的长度和亮度不同分辨出。异源四倍体鲫鲤在繁衍不到 10 年的时间内就出现了 Bgl II 和 Xba I 两种内切酶的限制性酶切位点多态性,说明了 mtDNA 一级结构进化速度快的特点。同时作者用 9 种限制性内切酶酶切鲫鲤  $F_2$ (二倍体)mtDNA,检测出 Bgl II 和 Xba I 分别具有 1 个(15.9kb)和 2 个(11.5+4.55kb)切点,与异源四倍体鲫鲤的次要类型中 Bgl II 和 Xba I 的酶切结果一致,而其它 7 种限制性内切酶的酶切结果除长度有较小差异外,片段数目保持一致。从酶切结果分析来看,异源四倍体鲫鲤 mtDNA 酶切位点的多态性有可能是由于 mtDNA 突变率不一致或回复突变的结果。异源四倍体鲫鲤作为一种经定向培育而得到的新的种群,目前在生产上的应用已产生显著的经济效益。在研究了其肝组织 mtDNA 后,为今后进一步分析异源四倍体鲫鲤的遗传、进化和动物 mtDNA 的母系遗传奠定了基础,同时对鲫鲤  $F_2$  染色体自然加倍到异源四倍体鲫鲤的机理研究将对了解自然界多倍体存在提供很重要的遗传学证据。

## 参考文献

- [1] 张亚平,施立明. 动物线粒体 DNA 多态性的研究概况[J]. 动物学研究,1992,13(3):289-298.
- [2] 吕国庆,李思发. 鱼类线粒体 DNA 多态研究和应用进展[J]. 中国水产科学,1998,5(3):94-103.
- [3] 张四明,龙 华,张兴忠. 方正银鲫、白鲫与鲫线粒体 DNA 限制性内切酶酶切比较[J]. 水产学报,1992,16(2):120-129.
- [4] 张 辉,董新红,叶玉珍,等. 三个三倍体鲫鱼品系及野鲫 mtDNA 的比较研究[J]. 遗传学报,1998,25(4):330-336.
- [5] 宋 平,李小迎,熊全沫. 鳊鲫线粒体 DNA 的九种限制性内切酶酶切图谱的比较[J]. 水产学报,1994,18(3):221-230.
- [6] Jaime R, Alvarado B, Liang Z, et al. A polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) assay for the discrimination of mitochondrial DNA from the Florida and Northern subspecies of Largemouth Bass[J]. Tran Am Fish Soc, 1999, 127;507-511.
- [7] Kenji Saitoh, Masaru Tanaka, Rei Ueshima, et al. Preliminary data on restriction mapping and detection of length variation in Japanese flounder mitochondrial DNA[J]. Aquac, 1995, 136:109-116.
- [8] Christiane D, Nathalie S, Celine D, et al. The complete nucleotide sequence of the mitochondrial DNA of the dogfish, *Scyliorhinus canicula*[J]. Genetics, 1998, 150:331-344.
- [9] 黎双飞,刘少军,刘 筠,等. 鲤鱼肝组织线粒体 DNA 的限制性内切酶分析[J]. 生命科学研究,2000,4(2):178-182.
- [10] 刘 筠,周工建. 红鲫(♀)×湘江野鲤(♂)杂交一代生殖腺的细胞学研究[J]. 水生生物学报,1996,10(2):101-108.
- [11] 刘少军,冯 浩,刘 筠,等. 四倍体鲫鲤  $F_3 \sim F_4$ 、三倍体湘云鲫、湘云鲤及有关二倍体的 DNA 含量[J]. 湖南师范大学学报(自然科学版),1999,22(4):61-68.
- [12] 何晓晓. 四倍体基因库及三倍体湘云鲫、湘云鲤的染色体研究[D]. 湖南师范大学研究生硕士论文,1999.
- [13] 刘少军. 优质高产养殖鱼类—工程鲫[J]. 内陆水产,1993,1:17.
- [14] Shaojun LIU, Yun LIU, Gongjian ZHOU, et al. The formation of tetraploid stocks of red crucian carp × common carp hybrids as an effect of interspecific hybridization[J]. Aquac Zool, 1992:171-186.