

鲢鳙线粒体 DNA 的九种限制性 内切酶酶切图谱的比较

宋平 李小迎 熊全沫

(武汉大学生命科学学院, 430072)

提 要 以十一种限制性内切酶对鲢鱼 mtDNA 进行单酶完全酶解的切点数: Sal I 和 Bgl I 为0; Pst I, Xho I, Kpn I 和 Sac I 为1; Hpa I 和 Xba I 为2; BamH I 为3; Bgl I 和 EcoR I 为4。以九种限制性内切酶对鳙鱼 mtDNA 进行单酶完全酶解, 其切点数: Pst I, Xho I, Sal I, Kpn I, Bgl I 均为1; Hpa I 和 Xba I 为2; Sac I 为3; Bgl I 为4。采用琼脂糖凝胶电泳法测得鲢鱼 mtDNA 分子量为 15930 ± 220 碱基对(bp); 鳙鱼 mtDNA 分子量为 16650 ± 150 碱基对(bp)。用单、双酶解法和部份酶解法构建了鲢鱼九种酶18个切点和鳙鱼九种酶16个切点的限制性内切酶酶切图谱。另外, 对这两种鱼的酶解位点数, 片段大小和限制酶图谱进行了比较。

关键词 鲢鱼, 鳙鱼, mtDNA, 限制性内切酶图谱

动物线粒体 DNA (mtDNA) 分子量大小约为16500碱基对[Brown, 1983], 易于纯化分析。mtDNA 为严格的母性遗传[张亚平等, 1990; Gyllensten 等, 1985], 一个个体代表一个群体, 便于取材分析, 是较好的动物(包括鱼类)种质鉴定的遗传标记物。mtDNA 基因组结构相对稳定, 但一级结构变异较大[王钢锋和吴乃虎, 1991; 兰宏和施立明, 1993; Brown 等, 1979; Brown, 1980, 1983], 有利于进行种间和种内的进化遗传学研究。另外, mtDNA 限制性内切酶分析方法较简单, 结果重复性好, 实验条件要求不高。因此, mtDNA 的限制性内切酶酶切分析方法不失为遗传育种、种群遗传和分子进化等方面研究的好手段, 国外有许多相关的报道[Brown 等, 1979; Brown, 1980, 1983; Beckwitt, 1987; Gyllensten 等, 1985; Yonekawa 等, 1988]。国内在哺乳动物和鱼类方面也有一些报道[王钢锋和吴乃虎, 1991; 兰宏和施立明, 1993; 劳为德等, 1981; 张四明等, 1992; 张亚平等, 1989; 张亚平, 1991]。

鲢鱼(*Hypophthalmichthys molitrix*)和鳙鱼(*Aristichthys nobilis*)是我国著名的淡水养殖鱼类, 正面临着品种退化和复壮问题, 因此, 对它们进行分子水平的遗传标记和系统演化研究非常必要。为此, 作者构建了鲢鱼和鳙鱼的限制性内切酶酶切图谱, 并且对它们进行了初步地比较。

一、材料与方 法

1. 材料与试剂 实验用鲢鱼、鳙鱼购自武昌东湖渔场。有关试剂均系国产。

收稿日期: 1993-07-05。

2. mtDNA 制备 本工作所有实验除特别说明外,均在4℃下进行。将去结缔组织肝按1:10的重量体积比加入STE缓冲液0.25M蔗糖,10mM Tris·HCl,1mM EDTA,pH8.0,置DS200高速组织捣碎器匀浆(慢挡)。匀浆液以1000xg离心15分钟,去沉淀,上清以15000xg离心30分钟。沉淀线粒体悬浮于适量的缓冲液B(0.25M蔗糖,0.05M Tris·HCl,7mM MgCl₂,pH7.5)中,以15000xg离心30分钟用缓冲液B洗数次,沉淀悬浮于缓冲液B中,加入DNase I至终浓度,50μg/ml,25℃反应30分钟,冰浴冷却,加入DNase I反应终止液(0.25M蔗糖,0.01M EDTA,pH8.0),15000xg离心30分钟,所得沉淀即为纯线粒体。

线粒体悬浮于缓冲液C(0.05M Tris·HCl,0.1M NaCl,0.01M EDTA,pH8.5),加入SDS至终浓度1%,37℃水浴保温15分钟,冰浴冷却。加入等体积苯酚/氯仿/异戊醇(25/24/1)反复抽提至两相面无蛋白为止。水相加入氯仿/异戊醇(24/1)抽提二次后其水相再加入0.2倍体的1M NaAc混匀,再加入2倍体积的无水乙醇-38℃过夜。15000xg离心30分钟,沉淀(mtDNA粗品)真空干燥后溶于缓冲液TE(10mM Tris·HCl,1mM EDTA,pH8.0)中。

3. 线粒体DNA的纯化 将mtDNA粗品用适量的TE稀释,加入外理过的RNase使其终浓度为50μg/ml,37℃水浴1小时,再按提取mtDNA粗品的方法去蛋白质,沉淀、干燥mtDNA,所得mtDNA(纯品)溶于TE中保存。

4. mtDNA 限制性内切酶酶解 单酶完全酶解反应总体积30μl,含适量的mtDNA和适量的酶,37℃水浴2小时;单酶部分酶解仅将保温时间缩短为10分钟。双酶完全酶解将两种酶同时加入,总体积40μl,其它反应条件同单酶完全酶解,65℃10分钟终止反应后,立即冰浴。

5. mtDNA 酶切片段琼脂糖凝胶电泳分析 采用无桥水平板电泳装置。胶板为10×13.5cm。胶浓度为0.7%含适量的溴化乙锭,65V,室温下电泳10小时,紫外灯下拍照。

以λ-DNA/EcoR I·Hind III或λ-DNA/Hind III完全酶解片段作分子标准。据标准片段的相对迁移率的倒数与分子量的对数值作标准曲线,测得各个酶切片段的分子量。

二、结 果

1. mtDNA 单酶完全酶解(图1、2;表1)

Sal I和Bgl II对鲢鱼mtDNA均无切点。

因技术原因,EcoR I单酶完全酶解的最小的一个片段(0.71Kb)在鲢鱼中不易检测出来,在图1(A)中未能见到,但通过适当减少或不用溴酚兰指示剂和减少电泳时间可以检测出来[图1(B)]。

2. 鲢鱼 mtDNA 单酶(Bgl I)部分酶解及双酶完全酶解(图3;表2)。

3. mtDNA 双酶完全酶解(图4、5;表3、4) 有少数双酶解片段很小,因技术原因在凝胶电泳中未能检出,但可根据单酶和双酶解片段的分子量确定漏检片段大小。

4 鲢、鳙 mtDNA 限制性内切酶酶切图谱(图6) 鲢、鳙 mtDNA 分子量以 mtDNA 双酶完全酶解测定结果为依据。鲢鱼 mtDNA 分子量为15930±220碱基对(bp),鳙鱼 mtDNA 分子量为16650±150碱基对(bp)。

以鲢鱼为例简述 mtDNA 限制性内切酶酶切图谱的构建。

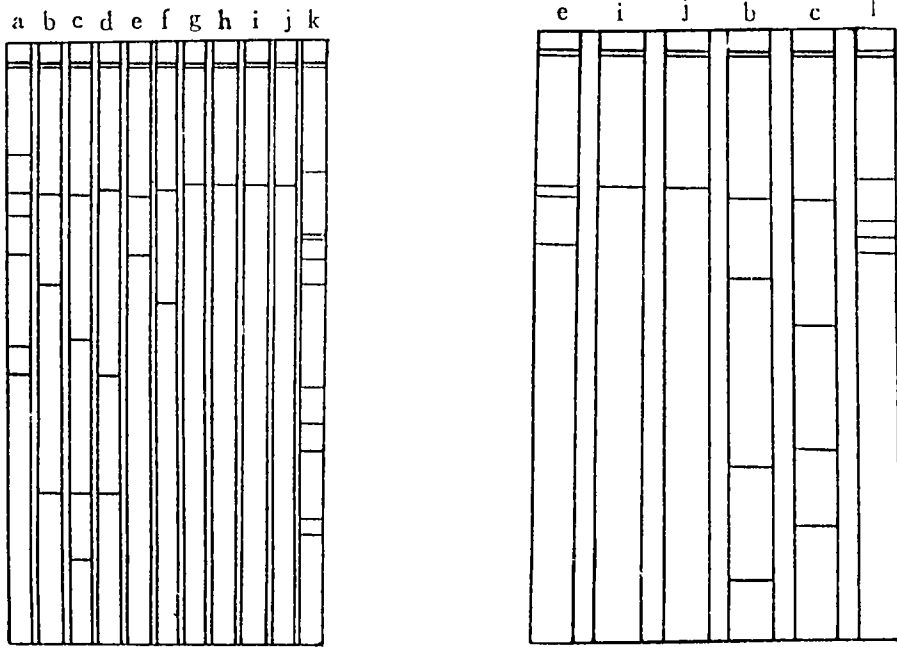


图1 鲢单酶完全酶解 mtDNA 片段电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis pattern of restriction digests of mtDNA
 a. λ -DNA/Hind III; b. EcoR I; c. Bgl I; d. BamH I; e. Xba I; f. Hpa I; g. Sac I;
 h. Kpn I; i. Xho I; j. Pst I; k. λ -DNA/EcoR I•Hind III; l. λ -DNA/EcoR I.

表1 鲢、鳙单酶完全酶解 mtDNA 片段大小(Kb)

Table 1 Molecular weights(Kb) of restriction fragments of mtDNA

鱼名	酶	酶解片段大小	合计
鲢	Pst I; Xho I	15.77	15.77
	Kpn I; Sac I	12.56; 2.95	15.51
	Hpa I	11.12; 4.67	15.79
	Xba I	12.53; 2.07; 1.10	15.70
	BamH I	11.27; 2.69; 1.25; 0.96	16.17
	Bgl I	11.63; 3.30; 1.13; 0.71	16.77
	EcoR I	16.85	16.85
鳙	Pst I; Xho I; Kpn I	13.67; 3.08	16.75
	Sal I; Bgl II	11.81; 4.82	16.63
	Hpa I	10.23; 4.88; 1.69	16.80
	Xba I	8.53; 3.72; 3.30; 1.21	16.76
	Sac I		

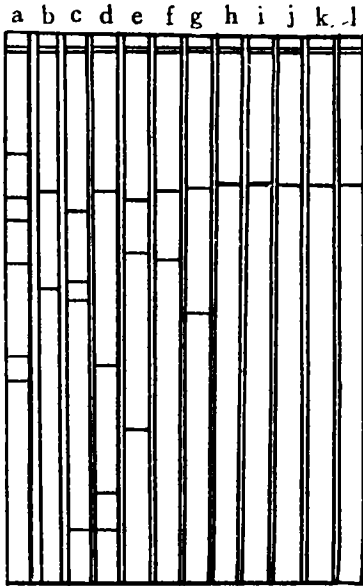


图2 鲮单酶完全酶解 mtDNA 片段电泳图
Fig. 2 Agarose gel electrophoresis pattern of restriction digests of mtDNA

a. λ -DNA/Hind III; b. 未用; c. Bgl I; d. BamH I; e. Sac I; f. Xba I; g. Hpa I; h. Bgl II; i. Kpn I; j. Sal I; k. Xho I; l. Pst I.

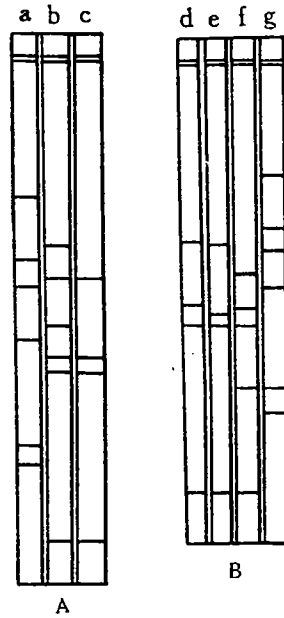


图3 鲮 mtDNA 单酶(Bgl I)部份酶解(A)及双酶完全酶解(B)

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis pattern of restriction digests of mtDNA by Bgl I partial digestion (A) and double enzyme digestion (B)
a. g. λ -DNA/Hind III; b. Bgl I 部分酶解; c. d. Bgl I; e. Bgl I/Xho I; f. Bgl I/Pst I.

表2 鲮 mtDNA 单酶(Bgl I)部份酶解及双酶完全酶解片段大小(Kb)
Table 2 Molecular weights(Kb) of mtDNA fragments generated by Bgl I partial digestion and double enzyme digestion

酶	酶解片段大小	合计
Bgl I 部份酶解	13.46;8.53;4.51;3.72;3.30;1.21;	
Bgl I/Pst I	6.10;3.72;3.30;2.29;1.21	16.62
Bgl I/Xho I	8.53;3.51;3.30;1.21; <u>0.35</u>	16.90

注:数字下有横线的指推算出的分子量。

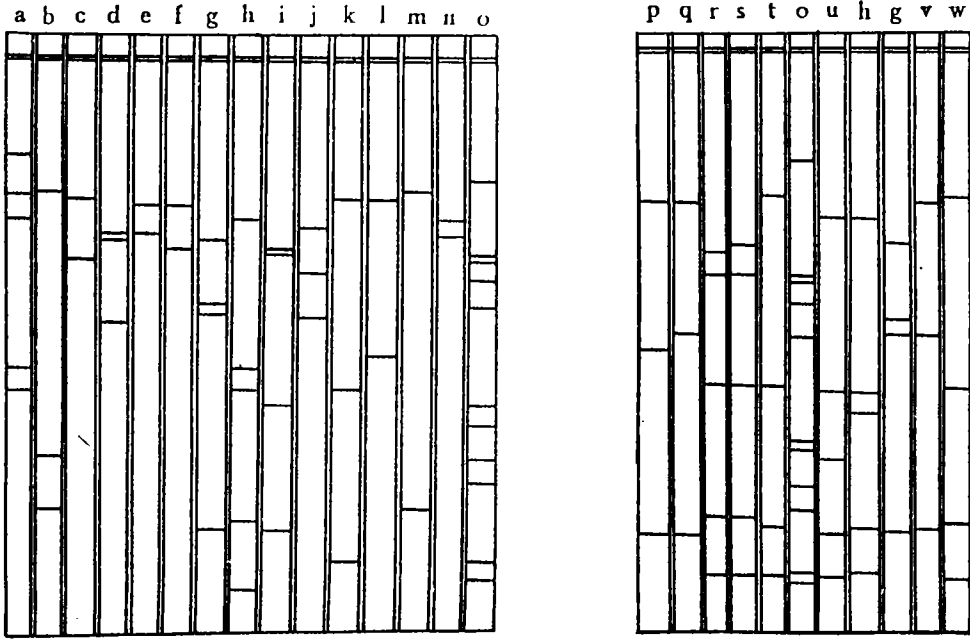


图4 鲢 mtDNA 双酶完全酶解片段电泳图

Fig. 4 Agarose gel electrophoresis pattern of restriction digests of mtDNA using the double enzyme a. λ -DNA/Hind III; b. BamH I /Xho I; c. Xba I /Xho I; d. Hpa I /Xho I; e. Sac I /Xho I; f. Kpn I /Xho I; g. EcoR I /Pst I; h. Bgl I /Pst I; i. BamH I /Pst I; j. Xba I /Pst I; k. Hpa I /Pst I; l. Sac I /Pst I; m. Kpn I /Pst I; n. Xho I /Pst I; o. λ -DNA/EcoR I ·Hind III; p. EcoR I /Xba I; q. EcoR I /Xho I; r. Bgl I /Xba I; s. Bal I /Sac I; t. Bgl I /Xho I; u. Bgl I /BamH I; v. EcoR I; w. Bal I.

以单个切点酶 Pst I 的切点定为零点,以 Pst I→Xho I 的近点方向定为基因组的顺时针方向。以单酶完全酶解定酶切切点数,以 Pst I 与另一种酶的双酶完全酶解定切点间的相对距离即片段长度(Kb),以单个切点酶 Xho I, Pst I 及其它酶与待测酶的双酶完全酶解来确定此酶各切点间的相对位置。对于不同酶间的两个相邻切点间的相对位置,再辅以此两种酶的双酶完全酶解来进一步确定。

例如: Xba I 单酶切有两个片段4.67Kb 和11.12Kb; Pst I /Xba I 得三个片段3.26Kb, 4.67Kb 和7.81Kb。这里3.26Kb 和7.81Kb 显然是由 Pst I 将11.12Kb 一分为二,表明 Pst I 切点在这3.26Kb 和7.81Kb 之间,因此, Xba I/Pst I 酶切片段排列有两种方向相反类型:A. 3.26Kb→4.67Kb→7.81Kb 和 B. 7.81Kb→4.67Kb→3.26Kb。将这两排列顺序分别与已设定的 Pst I(零点)→7.2Kb(Xho I)→8.96Kb(Pst I)相比较与计算,推算出 Xho I/Xba I 的双酶解有:A. Xho I 切点在4.67Kb 上将其一分为二;B Xho I 切点在7.81Kb 上而保留4.67Kb。实验证实 Xho I /Xba I 得三个片段:4.67Kb、10.73Kb 和0.61Kb(未检测出来),因此 B 型排列方式正确(图3)。

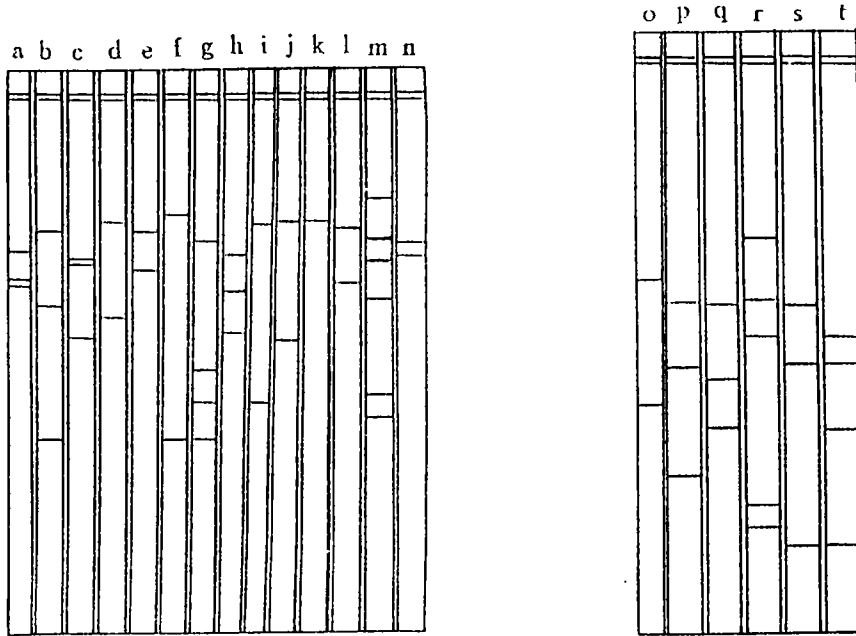


图5 鲢 mtDNA 双酶完全酶解片段电泳图

Fig. 5 Agarose gel electrophoresis pattern of restriction digests of mtDNA using the double enzyme
 a. Xba I /Bgl I; b. Sac I /Kpn I; c. Hpa I /Xho I; d. Bgl II /Xho I; e. Kpn I /Xho I;
 f. Sal I /Xho I; g. Sac I /Pst I; h. Xba I /Pst I; i. Hpa I /Pst I; j. Bgl II /Pst I;
 k. Kpn I /Pst I; l. Sal I /Pst I; m. r. /Hind III; n. Xho I /Pst I;
 o. Sal I /Kpn I; p. Sal I /Xba I; q. Sal I /Hpa I; s. Sac I /Sal I; t. Sac I /Xho I.

Xba I (2-1)与 EcoR I (4-2), Xba I (2-2)与 EcoR I (4-4)之间的相对位置, 通过比较这两种酶间的酶切位点的对应关系及理论推算并经实验证明: Xba I (2-1)切点将 EcoR I 的3.3Kb 切成两个小的片段3.2Kb 与0.10Kb, 表明 Xba I (2-1)切点在 EcoR I (4-2)之前; 而 Xba I (2-2)切点将 EcoR I 10.66Kb(单酶解为11.63Kb, 相当于3.66Kb 7.0Kb 之和)片段切成两个小片段10.26Kb(实际测量为9.84Kb)和0.40Kb, 则表明 Xba I (2-2)切点在 EcoR I (4-4)切点之后。有关这些双酶解的数据本文未列出。

因电泳技术原因, DNA 分子量的测定有一定误差, 片段分子量越大其误差也越大, 即使是相同大小的片段在同一个胶板上电泳测量也有误差。

鲢 mtDNA 九种限制性内切酶十八个切点的酶切图谱和鲢 mtDNA 九种限制性内切酶十六个切点的酶切图谱见(图6)。

表3 鲢 mtDNA 双酶完全酶解片段大小(Kb)

Table 3 Molecular weights(Kb) of restriction fragments of mtDNA using the double enzyme

酶	酶解片段大小	合计
Xho I /Pst I	7.2;8.96	16.16
Kpn I /Pst I	1.3;14.63	15.93
Kpn I /Xho I	5.73;10.50	16.23
Sac I /Pst I	2.54;13.39	15.93
Sac I /Xho I	6.08;9.87	15.95
Hpa I /Pst I	1.02;2.10;12.94	16.06
Hpa I /Xho I	2.95;6.07;6.81	15.83
Xba I /Pst I	3.26;4.67;7.81	15.74
Xba I /Xho I	<u>0.61</u> ;4.67;10.73	16.01
BamH I /Pst I	1.10;2.07;5.98;6.73	15.88
BamH I /Xho I	<u>0.47</u> ;1.10;1.51;12.94	16.02
Bgl I /Pst I	0.96;1.25;2.36;2.69;8.73	15.99
Bgl I /Xho I	<u>0.06</u> ;0.96;1.19;2.69;11.07	15.97
Bgl I /Sac I	0.96;1.25;2.69;5.05;6.36	16.31
Bgl I /Xba I	<u>0.55</u> ;0.96;1.25;2.69;4.67;5.95	16.07
EcoR I /Pst I	<u>0.71</u> ;1.13;3.30;3.66;7.0	15.80
EcoR I /Xho I	<u>0.20</u> ;0.51;1.13;3.30;10.37	15.51
EcoR I /Xba I	<u>0.10</u> ;0.40;0.71;1.13;3.20;9.84	15.38

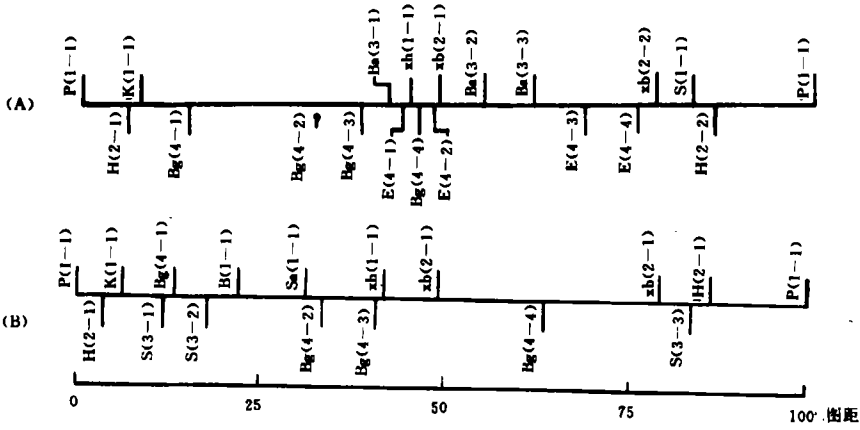
注:数字有横线的指推算出的分子量。

表4 鳙 mtDNA 双酶完全酶解片段大小(Kb)

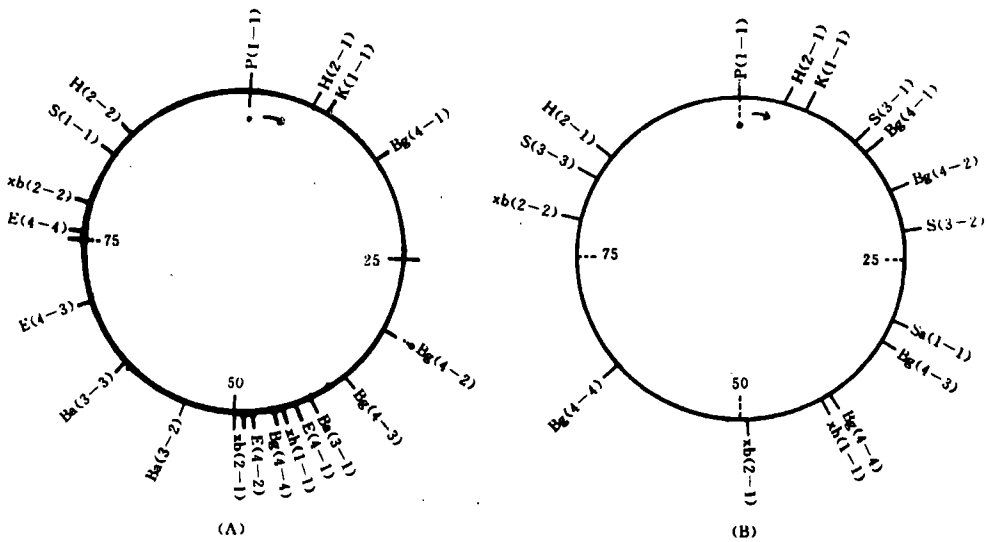
Table 4 Molecular weights(Kb) of restriction fragments of mtDNA using the double enzyme

酶	酶解片段大小	合计
Xho I /Pst I	9.35;7.04	16.39
Sal I /Pst I	11.56;5.29	16.85
Kpn I /Pst I	15.41; <u>1.1</u>	16.51
Bgl I /Pst I	13.70;3.06	16.76
Hpa I /Pst I	13.67;2.38; <u>0.70</u>	16.75
Xba I /Pst I	8.24;4.95;3.57	16.76
Sac I /Pst I	10.23;2.81;2.07;1.69	16.80
Sal I /Xho I	14.81;1.69	16.49
Kpn I /Xho I	10.81;5.94	16.89
Bgl I /Xho I	12.81;3.94	16.75
Sac I /Xho I	6.1;4.98;3.3;1.69	16.67
Sac I /Kpn I	10.23;3.99;1.69; <u>0.72</u>	16.63
Xba I /Bgl I	7.10;4.95;4.61	16.66
Hpa I /Xho I	7.17;6.34;3.08	16.59
Sac I /Sal I	9.13;4.89;1.69; <u>1.1</u>	16.56
Hpa I /Sal I	9.02;4.29;3.08	16.39
Xba I /Sal I	9.09;4.82;2.83	16.74
Kpn I /Sal I	12.38;4.17	16.55

注:数字有横线的指推算出的分子量。



I



II

图6 鲢(A)鳊(B)mtDNA 的限制酶图谱

Fig. 6 The restriction maps of mtDNA

(I)线形图谱 (linear form)

(II)环形图谱 (circular form)

1. Ba-BamH I; B-Bgl I; Bg-Bgl I; E-EcoR I; H-Hpa I; K-Kpn I; P-Pst I; S-Sac I; Sa-Sal I; Xb-Xba I; Xh-Xho I.

2. Hpa I (2-1)中的“2”指该酶的切点总数,而“1”指该酶的第一个切点,其余酶后面数字的意义类推。

3. 鲢 mtDNA 的 Bg(4-2)切点未能确定。

三、讨 论

在实验中观察到 Xba I 存在两种酶切类型即一个切点和两个切点的 mtDNA 多态现象(图1b)。通过加大酶量和双酶解法均证实存在 Xba I 酶切片段长度多态,这是由于在实验取材时采用了几条鲢鱼的肝。为了排除 mtDNA 多态性而便于分析,本文酶切图谱所用的数据均来自同一条鲢鱼肝 mtDNA。mtDNA 多态性与种群内遗传多样性相关,自然种群保持大量变异对种群生存有利。对鲢鳙不同地理群与 mtDNA 多态性的系统研究,有助于了解它们各种遗传结构品系的分布及其品种复壮的工作。

从鲢鳙的限制酶图可以看出,大多数酶切位点位于在0—50图谱单位范围内即酶切位点在 mtDNA 基因组中的分布是不均匀的,这种情况在其它动物的 mtDNA 中也可看到[张亚平等, 1989;张亚平, 1991;劳为德等, 1981],其包含的意义还不清楚。

Pst I, Xho I, Kpn I 在两种鱼中均为1个切点;Sal I, Bgl II 在鳙为1个切点而在鲢均无切点。Hpa I, Xba I 在鲢鳙中均为两个切点且它们的酶解片段大小很接近(因未在同一块胶板上进行电泳,因此,不能断定是否一样);Hpa I 酶解片段在鲢中为12.56Kb 和2.95Kb,而在鳙中为13.67Kb 和3.08Kb; Xba I 的酶解片段在鲢中为11.12Kb 和4.67Kb,而在鳙中为11.81Kb 和4.82Kb, Bgl I 在两种鱼中均为4个切点,但除最小的一个片段大小相似外(鲢:0.96Kb;鳙:1.21Kb),其余三个片段大小在鲢鳙间差别较大,Sac I 在鲢中仅为一个切点,而在鳙中却为3个切点,差别很大。

鲢鳙间 Pst I, Xho I 和 Kpn I 这三种酶酶切位点之间的位置以及与其它酶切位点的相对位置在限制酶图谱上都是一样;Hpa I 和 Xba I 酶切位点之间以及与其它酶切位点的相对位置也是一样,即凡是切点数一样,片段大小一样的酶,其酶解位点在限制酶图谱上的位置也一样。Bgl I 除 Bgl(4-4)切点外,其余的3个切点在鲢鳙 mtDNA 限制图谱中其位置也相似。鳙鱼的 Sac I (3-3)切点位置与鲢鱼的 Sac I (1-1)切点位置相似。

从上面的初步比较可见,在鲢亚科鱼类的发生过程中,其 mtDNA 的一级结构随着鲢鳙的分化发生了一些改变但差异不大。当然,有必要对这两种鱼做更多种酶酶切的比较研究。

本实验由国家自然科学基金(3880637)资助。

参 考 文 献

- [1] 王钢锋、吴乃虎, 1991. 鲤鱼线粒体 URFA6L 基因和 TRNALYS 基因的结构分析. 中国科学(B), 21(6):601-614.
- [2] 兰 宏、施立明, 1993. 麂属(*Muntiacus*)动物线粒体 DNA 多态性及其遗传分化. 中国科学(B), 23(5):489-497.
- [3] 劳为德等, 1981. 线粒体基因组的研究: I 猪肝线粒体基因组的限制性内切酶图谱. 生物化学与生物物理学报, B(2): 175-183.
- [4] 张四明等, 1992. 方正银鲫、白鲫与鲫线粒体 DNA 限制性内切酶酶切比较. 水产学报, 16(2):120-129.
- [5] 张亚平, 1991. 大熊猫线粒体 DNA 的九种限制酶图谱. 动物学研究, 12(2):209-214.
- [6] 张亚平等, 1989. 蜂猴和树鼩 mtDNA 10种限制酶酶切图谱. 动物学研究, 10(增刊):78-89.
- [7] 张亚平、施立明, 1990. 猕猴属五个种 mtDNA 多态性研究. 遗传学报, 17(1):23-33.
- [8] Beckwitt, R., 1987. Mitochondrial DNA sequence variation in domesticated goldfish, *Carassius Auratus*. *Copeia*, 1: 219-222.

- [9] Brown, W. M., 1980. Polymorphism in mitochond DNA of Humans as revealed by restriction endonuclease analysis. *PNAS USA*, **77**:3605-3609.
- [10] Brown, W. M. *et al.*, 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *PNAS USA*, **76**:1967-1971.
- [11] ———, 1983. *Evolution of animal mitochondrial DNA*. pp. 62-88. In: *Evolution of genes and proteins*, Edited by M. Nei and R. K. Koehn. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- [12] Gyllensten, V. *et al.*, 1985. Introgression between two cutthroat trout subspecies with substantial karyotypic, nuclear and mitochondrial genomic divergence. *Genetics*, **111**:905-915.
- [13] Yonekawa, H. *et al.*, 1988. Hybrid origin of Japanese mice "Mus musculus molossinus": evidence from restriction analysis of mitochondrial DNA. *Mol. Biol. Evol.*, **5**:63-78.

**COMPARATIVE STUDY ON THE MAPS OF NINE RESTRICTION
ENDONUCLEASES OF mtDNA OF SILVER CARP
(*HYPOPHTHALMICHTHYS MOLITRIX*) AND
BIGHEAD (*ARISTICHTHYS NOBILIS*)**

Song Ping, Li Xiaoying and Xiong Quanmo

(College of Life Sciences, Wuhan University, 430072)

ABSTRACT The mitochondrial DNA (mtDNA) of silver carp were digested by 11 restriction endonucleases which were Bam I, Bgl I, Bgl II, EcoR I, Hpa I, Kpn I, Pst I, Sac I, Sal I, Xba I and Xho I. The fragments cleaved by these enzymes are 3,4,0,4,2,1, 1, 1, 0, 2 and 1, respectively. The mtDNA of bighead were digested by restriction endonucleases Bgl I, Bgl II, Hpa I, Rpn I, Pst I, Sac I, Sal I, Xba I and Xho I into 4,1, 2,1,1,3,1,2 and 1 fragments, respectively. The sizes of mtDNA were estimated by agarose gel electrophoresis and they are 15930 ± 220 bp for silver carp and 16650 ± 150 bp for bighead. The maps of 9 restriction endonucleases for silver carp (18 cleaved sites) and bighead (16 cleaved sites) were constructed after digesting by the single, double or partial enzyme. The paper also compared the enzyme-digested sites, the size of fragment and the maps of restriction endonucleases between both fishes.

KEYWORDS silver carp, bighead, mtDNA restriction physical map