

## 鲇(*Silurus asotus* L.)线粒体 DNA 的初步研究

曹 莹<sup>1</sup> 张兴忠<sup>2</sup> 杨干荣<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 华中农业大学水产学院, 武汉 430070)

(<sup>2</sup> 淡水鱼类种质资源与生物技术国家重点实验室, 沙市 434000)

**摘 要** 实验共用 13 种限制酶分别对鲇 *mtDNA* 作酶切分析。其中, 酶 BamHI、BglII 和 SacI 在鲇 *mtDNA* 分子上产生 2 个切点; BglII、EcoRI、Pst I 和 Sca I 都产生 1 个切点; HindIII 和 PvuII 分别产生 5 个和 3 个切点; Xba I 的切点多于 5 个, 而 Cla I、Dra I 和 Kpn I 没有切点。根据酶解结果计算出鲇 *mtDNA* 的大小约为 16.55kb。构建了 BamHI、BglII、EcoRI、Pst I、PvuII、Sac I 及 Sca I 共 7 种酶的酶切图谱。实验共分析了鲇的 10 个个体, 没有发现脊椎动物中普遍存在的限制性片段长度多态 (RFLP) 现象。实验中采用的 *mtDNA* 的提取纯化方法证明是简捷有效的。

**关键词** 鲇, 线粒体 DNA, 限制性核酸内切酶, 限制酶图谱

鱼类遗传多样性的保护和利用是水产遗传学中最令人感兴趣的研究课题之一。解决问题的关键是建立恰当的分子标记用以研究鱼类的群体遗传结构, 为遗传资源的保护、开发和利用提供理论依据。

作为群体遗传研究的传统手段, 同工酶电泳得到的数据只能部分和间接地反映基因组的信息。而利用线粒体 DNA (*mtDNA*) 酶切片段数据能够在 DNA 分子水平上达到上述目的。这是因为脊椎动物 *mtDNA* 具有如下独特性质: 大小在 15,200–19,500bp 之间, 共价闭合环状结构<sup>[7]</sup>; 严格的母系遗传方式<sup>[6]</sup>; 基本序列的进化速度是单拷贝核 DNA 的 5~10 倍<sup>[4]</sup>; 每个细胞内有几千至几万个拷贝<sup>[4]</sup>; 个体内的 *mtDNA* 分子极少有变异<sup>[6]</sup>等。

国外学者已将 *mtDNA* 酶切片段技术广泛地应用于探索鱼类种系发生、群体遗传结构及分类等诸多领域<sup>[3, 5, 8, 9, 11]</sup>。而国内仅报道了对少数几种淡水鱼 *mtDNA* 的初步研究结果。本研究以鲇为材料。鲇在我国的分布极广泛, 资源十分丰富, 具有很高的经济价值。国内已进行了鲇人工繁殖的研究<sup>[2]</sup>。为能够充分地保护和利用鲇的遗传资源, 为鲇的繁殖育种提供理论依据, 有必要对其进行分子水平的遗传标记研究。本文用酶切技术对鲇 *mtDNA* 作了初步分析, 构建了酶切图谱。

## 材 料 与 方 法

### (一) 实验材料

鲇是重 500g 左右性成熟的雌性个体。全部取自湖北洪湖有关渔业单位。实验前暂养在水族箱中。

### (二) 实验方法

**1. 主要试剂** 限制酶(识别序列): BamH I (G↓GATCC)、Bgl I (GCCNNNN↓NGGC, N=A、T、G 或 C)、Bgl II (A↓GATCT)、EcoR I (G↓AATTC)、Hind III (A↓AGCTT)、Kpn I (GGTAC↓C)、Pst I (CTGCA↓C)、Pvu II (CGA↓CTG)、Sac I (GAGCT↓C)、Sca I (AGT↓ACT)和 Xba I (T↓CTAGA)购自武汉华美生物工程公司; Cla I (AT↓CGAT)和 Dra I (TTT↓AAA)是 Promega 公司产品; λDNA、λDNA/Hind III 及 λDNA/EcoR I+Hind III 也是华美公司产品。其它试剂均为国产分析纯级。

**2. mtDNA 的分离及纯化** 实验用碱性提取法<sup>[10]</sup>提取 mtDNA。实验中作适当修改。

取活鲇的卵巢组织 15-30g, 剪碎。在 STE-蔗糖缓冲液(100mM NaCl, 10mM Tris·Cl pH8.0, 1mM EDTA pH8.0, 250mM 蔗糖)中匀浆后, 用差速离心法得到粗提线粒体。再用 STE-蔗糖缓冲液重新悬浮, 离心清洗两次后收集线粒体。

将线粒体悬浮于 5ml TE-葡萄糖缓冲液(50mM 葡萄糖, 10mM EDTA, 25mM Tris·Cl pH8.0)中。之后把新配制的碱性 SDS 溶液(1%SDS, 0.2N NaOH)(用 1N NaOH 和 10%SDS 母液配制)10ml 加入上述悬浮液以裂解线粒体。轻轻混匀后置冰浴(0℃~4℃, 操作除非特别说明, 均指在此温度下)中。加入 7.5ml 的 3M KAC 溶液(pH4.8, 对 K<sup>+</sup>为 3M, 对 Ac<sup>-</sup>为 5M), 混匀后置-20℃下 5min。10000Xg 下离心弃去沉淀。向得到的上清液中加入等体积的饱和重蒸酚(pH8.0)抽提蛋白质。重复三次。离心弃酚相, 向水相中加入两倍体积的冷乙醇, 混匀后置-20℃下过夜沉淀 mtDNA。次日在 20000Xg 下离心 30min 收集 mtDNA。真空干燥后溶于适量的灭菌 TE 缓冲液(10mM Tris·Cl, 0.1mM EDTA pH7.5)中。置 4℃下存放备用。

**3. mtDNA 样品的检测** 在 0.9% 琼脂糖凝胶上对样品电泳检测。凝胶中含 0.5μl/ml EB。电泳缓冲液 TAE(0.04M Tris-醋酸, 0.001M EDTA)。点样 10μl。λ/EcoR I+Hind III 及 λ/Hind III 作分子量标准。室温 50V 下电泳 3h。紫外光下观察拍照。

**4. mtDNA 的酶切电泳** 单、双酶切反应: 根据厂家推荐的条件进行酶切。时间分别是 3h 和 4h。之后分别向反应混合物中加入 5μl 终止液(0.5M EDTA, 0.25% 溴酚蓝, 40%(W/V) 蔗糖)(兼做载样缓冲液)终止反应。

电泳: 单、双酶解反应产物分别在 0.9% 和 1.2% 琼脂糖凝胶上电泳分离。胶中含有 0.5μg/ml 的 EB。电泳缓冲液 TAE。λ/Hind III 和或 λ/EcoR I+Hind III 作分子量标准, 同时用未经酶解的样品作对照。室温 30V 下分别电泳 12h 和 16h。在紫外光下观察并拍照记录结果。

### (三) 酶切片段的大小计算和命名

标准曲线法计算酶解片段的大小。单酶解所得片段的命名是按片段的大小顺序,以该酶名称加上英文大写字母表示;双酶解片段用单酶解片段的名称加上第二个酶的名称,并按大小顺序加上1、2、3等脚码。

## 结 果 与 分 析

### (一) mtDNA 样品的检测

从预电泳结果(图1)可以发现,实验得到的 mtDNA 以超螺旋、开环和完整的闭环三种形式存在,且绝大部分的 mtDNA 是闭合环状。



图1 MtDNA 样品的检测。从左到右分别是:  $\lambda$ DNA / EcoR I + Hind III, mtDNA,  $\lambda$ DNA / Hind III  
Fig.1 The electrophoretic detection of mtDNA extracted. On lanes from left to right are, separately:  $\lambda$ DNA / EcoR I + Hind III, mtDNA,  $\lambda$ DNA / Hind III

### (二) mtDNA 的单酶解反应结果

从单酶解电泳图谱(图2)中可以发现,限制酶 BamH I、Bgl I、Bgl II、EcoR I、Hind III、Pst I、Pvu II、Sac I 和 Sca I 分别切割鲆 mtDNA 成 2、2、1、1、5、1、3、2 和 1 个片段。比较 Cla I、Dra I 和 Kpn I 的带型与 mtDNA (对照)的带型,判断此三酶没产生酶解片段。根据重复实验和计算结果(表1),推知 Xba I 的片段应多于 5 条。由于 mtDNA 的闭环结构,所以片段的数目即是限制位点的数目。由单酶解片段长度算得 mtDNA 的分子大小约为 16.55Kb。

### (三) mtDNA 的双酶解结果

双酶解电泳图谱如图 3A、B 所示。各片段长度列于表 2 中。

### (四) 鲆 mtDNA 酶切图谱的构建

取 Bgl II 的切点为零点,并在线型图左端时为正方向。BamH I -A 被 Bgl II 切成 BamH I / Bgl II -A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>; BamH I / Bgl II -B 即是 BamH I -B, 可知 BamH I 的切点在 3.00kb 和 6.40kb 处或在 10.15kb 和 13.55kb 处。由于这两种相对位置和 Bgl II 的衔接方式相同,这里取切点在 3.00 和 6.40kb 处,即基因组的 18%和 39%。

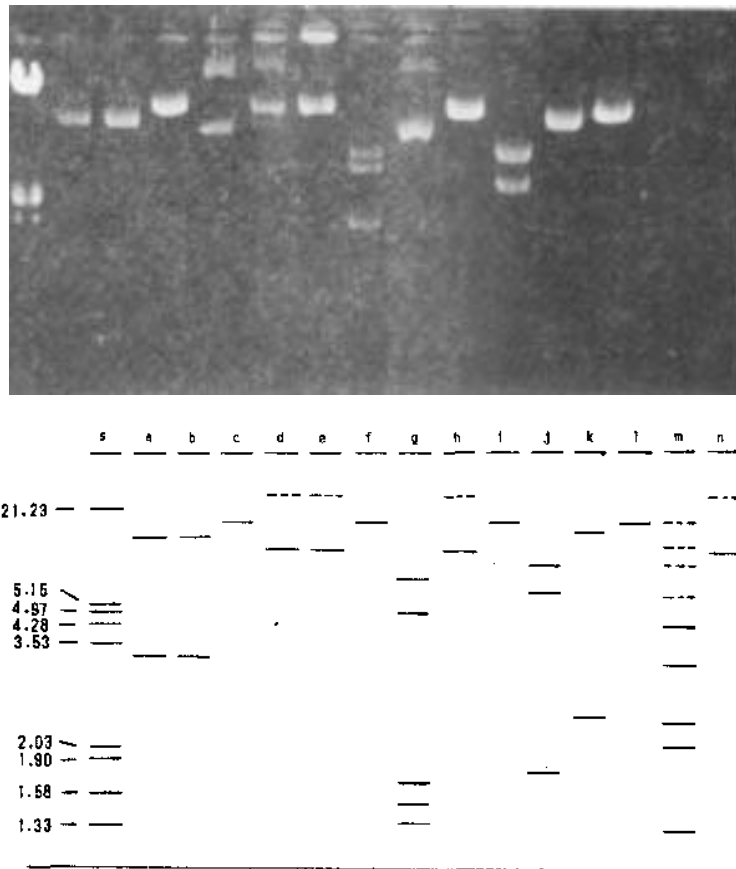


图 2 鲇 mtDNA 单酶解电泳图谱及其模式图

**Fig.2 Electrophoretic patterns of restriction fragments of catfish mtDNA generated with single enzymes**  
 s)mtDNA / EcoR I +HindIII, a)mtDNA / BamH I, b)mtDNA / Bgl I, c)mtDNA / Bgl II, d)mtDNA / Cla I, e)mtDNA / Dra I, f)mtDNA / EcoR I, g)mtDNA / HindIII, h)mtDNA / Kpn I, i)mtDNA / Pst I, j)mtDNA / Pvu II, k)mtDNA / Sac I, l)mtDNA / Sca I, m)mtDNA / Xba I. n)mtDNA. (d、e 及 h 下之虚线表示此样品未被酶切, m 下的虚线表示不完全酶解片段。分子量标准以 kb 为单位。)

表 1 鲇 mtDNA 单酶消化的片段长度 (单位: kb)

Table 1 Restriction fragment lengths of catfish mtDNA by single enzyme digestions (in kb)

片 断 Fragment	BamH I	BglII	BglIII	EcoR I	HindIII	Pst I	PvuII	Sac I	Sca I	Xba I	平均* Mean
A	13.18	13.18	16.59	16.59	7.24	16.59	8.51	13.80	16.59	4.16	
B	3.40	3.40			4.97		6.17	2.51		3.35	
C					1.66		1.82			2.46	
D					1.44					2.09	
E					1.33					1.28	
总计(Total)	16.58	16.58	16.59	16.59	16.64	16.59	16.50	16.31	16.59	13.34	16.55

\* 因 Xba I 的各片段之和与其它各酶解片段长度之和相差悬殊, 在计算平均分子大小时将其除外。

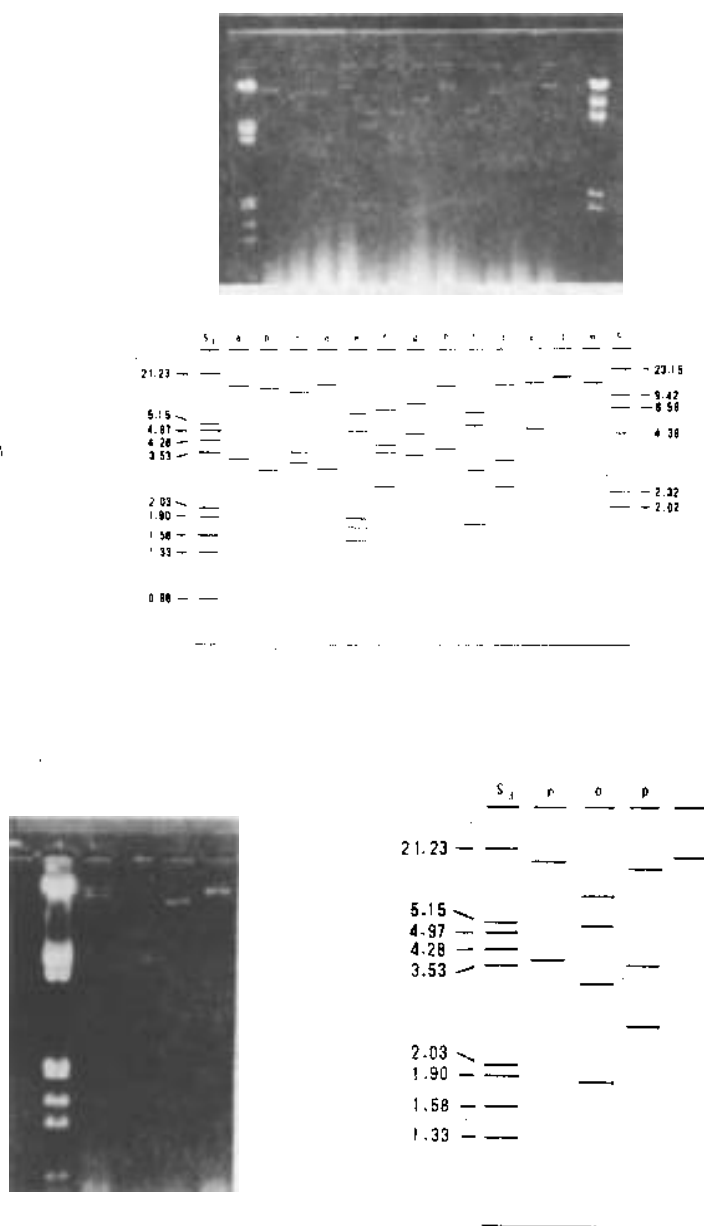


图3 鲇 mtDNA 双酶解电泳图谱及其模式图

Fig.3 Electrophoretic patterns of restriction fragments of catfish mtDNA generated with double enzymes

- A:  $s_1$ λDNA / EcoR I + Hind III. a) mtDNA / BamH I + Bgl II, b) mtDNA / BamH I + Bgl III, c) mtDNA / BamH I + EcoR I, d) mtDNA / BamH I + Pst I, e) mtDNA / BamH I + Pvu II, f) mtDNA / BamH I + Sac I, g) mtDNA / BamH I + Sca I, h) mtDNA / EcoR I + Pst I, i) mtDNA / EcoR I + pvu II, j) mtDNA / EcoR I + Sac I, k) mtDNA / EcoR I + Sca I, l) mtDNA / EcoR I + Bgl III, m) mtDNA,  $s_2$ λDNA / Hind III.
- B:  $s_2$ λDNA / EcoR I + Hind III, n) mtDNA / Bgl III + Pst I, o) mtDNA / Bgl III + pvu II, p) mtDNA / Bgl III + Sac I. (分子量标准以 kb 为单位。)

表 2 鲇 mtDNA 双酶消化的片段长度 (单位: kb)

Table2 Restriction fragment lengths of catfish mtDNA by double enzyme digestions (Unit:)

酶组合 Combination of enzymes	EcoR I ×				BglIII ×			
	Pst I	PvuII	Sac I	Sca I	EcoR I	Pst I	pvu II	Sac I
片段及长度 Fragment & length	A <sub>1</sub> :12.50	B :6.46	A <sub>1</sub> :10.83	A <sub>1</sub> :11.50	A:16.10	A <sub>1</sub> :13.00	B :6.33	A <sub>1</sub> :10.52
	A <sub>2</sub> : 4.01	A <sub>1</sub> :5.20	A <sub>2</sub> : 3.20	A <sub>2</sub> : 5.0	B: 0.48*	A <sub>2</sub> : 3.55	A <sub>1</sub> :4.95	A <sub>2</sub> : 3.51
		A <sub>2</sub> :3.09	B : 2.51				A <sub>2</sub> :3.45	B : 2.51
		C :1.81					C :1.81	
总计(Total)	16.51	16.56	16.54	16.50	16.58	16.55	16.54	16.54
酶组合 Combination of enzymes	BamH I ×							
	BglII	BglIII	EcoR I	Pst I	pvu II	Sac I	Sca I	
片段及长度 Fragment & length	A:11.20	A <sub>1</sub> :10.23	A <sub>1</sub> :9.75	A <sub>1</sub> :13.18	A <sub>1</sub> :6.46	A <sub>1</sub> :6.46	A <sub>1</sub> :8.61	
	B: 3.10	B : 3.41	A <sub>2</sub> :3.47	A <sub>2</sub> : 2.80	B <sub>1</sub> :4.80	A <sub>2</sub> :4.16	A <sub>2</sub> :4.57	
		A <sub>2</sub> : 3.00	B :3.35	C : 0.55*	A <sub>2</sub> :1.91	B :3.40	B :3.40	
					C :1.81	A <sub>3</sub> :2.51		
总计(Total)	-	16.64	16.57	16.53	16.49	16.53	16.58	

\* 此片段根据所建立的酶切图谱推算得到。

Pvu II 切 BamH I -B 成 BamH I / Pvu II -A<sub>2</sub>、B<sub>2</sub> 二片段, 切 BamH I -A 成 BamH I / Pvu II -A<sub>1</sub>、B<sub>1</sub>、C 三片段。因此, Pvu II 的一个切点在 BamH I -B 上, 另二个在 BamH I -A 上; 同时, BamH I / Pvu II -A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub> 之和是 Pvu II -A, BamH I / Pvu II -B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub> 之和是 Pvu II -B, BamH I / Pvu II -C 就是 Pvu II -C。又 Bgl II / Pvu II -A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub> 之和 Pvu II -A, 因此, Bgl II 的切点应在 Pvu II -A 上。此外, BamH I / Bgl II -A<sub>2</sub> 与 BamH I / Pvu II -A<sub>2</sub> 之和是 Bgl II / Pvu II -A<sub>1</sub>。所以确定 Pvu II 的三切点应在 4.91、11.22 及 13.03kb 处, 即在基因组的 30%、68%和 79%处。

因 BamH I / EcoR I -A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub> 之和是 BamH I -A, 所以 EcoR I 的切点在 BamH I -A 上。又 EcoR I 切 Pvu II -A 成 EcoR I / Pvu II -A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>, 因此, EcoR I 的切点又在 Pvu II -A 上。据之 EcoR I 的切点应在 16.08kb 即基因组的 97%处。

EcoR I 与 Bgl II 的切点已定。根据 EcoR I 和 Pst I 的双解结果与 Bgl II 和 Pst I 的双解结果, 应将 Pst I 的切点定位于 3.55kb 即基因组的 21%处。

Sac I 切 BamH I -A 成 BamH I / Sac I -A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>、A<sub>3</sub> 三片段, 又 BamH I / Sac I -A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>、B 之和是 Sac I -A, 从而判断 Sac I 的两切点在 BamH I -A 上。同时, Sac I -A 被 Bgl II 切成 Bgl II / Sac I -A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>, 因而 Bgl II 的切点在 Sac I -A 上。据此确定 Sac I 的切点在 10.56 和 13.07kb 处, 即基因组的 64%和 79%处。

Sca I 切 BamH I -A 成 BamH I / Sca I -A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>, 因此 Sca I 的切点在 BamH I -A 上; 又 EcoR I 和 Sca I 双解得两片段, 推知 Sca I 的切点在 10.97%即基因组的 66%处。

综合以上分析, 建立酶切图谱如下 (图 4A、B):

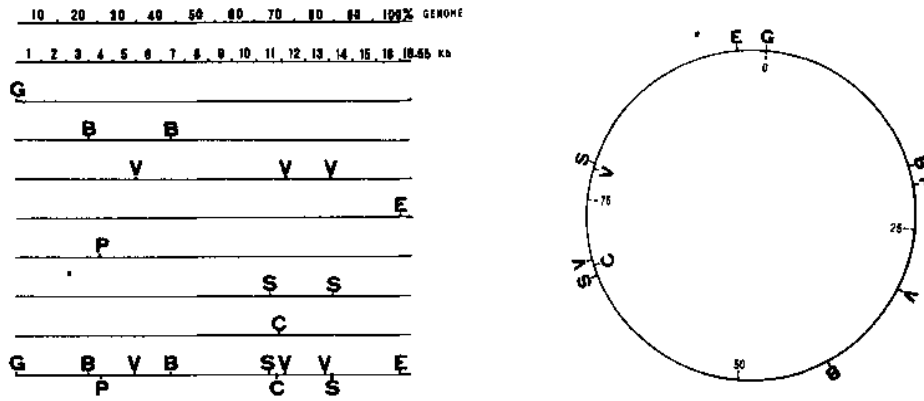


图 4 鲇 mtDNA 的限制酶图谱。A: 线型图谱 B: 环型图谱

(图中大写字母所代表的酶分别是: B=BamH I, G=Bgl III, E=EcoR I, P=Pst I, V=Pvu II, S=SacI, C=ScaI)

Fig.4 Restriction maps of catfish mtDNA

A:linear map B:circular map.

## 讨 论

1. 关于 mtDNA 的制备 不同作者所采用的 mtDNA 制备方法均有所不同, 得到的效果也有差异。本文所采用的碱性提取法<sup>[10]</sup>制备 mtDNA 的关键是去除核 DNA 和蛋白质的污染。本实验中省去了多数作者使用的 DNase I 和蛋白酶 K, 仅将粗提线粒体清洗二到三次, 之后用碱性 SDS 溶液。其中 SDS 破线粒体膜释放 mtDNA, NaOH 使核 DNA 变性, 而环状 mtDNA 的两互补链不会完全分离。再用醋酸钾溶液使 mtDNA 复性, 并使变性的大分子核 DNA 及 SDS-蛋白质复合物凝聚而沉淀。从而分离 mtDNA 和消除核 DNA 的污染。再用酚抽提蛋白质二到三次, 可使样品得到纯化。

结果表明, 此方法能够获得较高数量和质量的样品, 可取得良好的酶切效果。电泳谱带清晰, 无可见核 DNA 背景, 适于作酶切片段分析。同时, 我们的实验小组也发现此法用于从冷冻组织中提取 mtDNA 时, 也可取得较好的效果。可以看出, 与 CsCl 密度梯度离心法、柱层析法及 DNase I 法相比较, 碱性提取法操作简便, 节省时间和费用, 又可获得良好的效果。对实验条件没有十分严格的要求, 适于一般实验室。不足之处是, 此法提取 mtDNA 所需组织量较大, 运用于个体很小的鱼类时, 提取的样品可能无法满足多个酶解反应之需。

2. 关于实验结果 在使用的 13 种酶中的 10 种在鲇 mtDNA 分子上有切点。用双酶解法对切点定位。因 Bgl I、Hind III 及 Xba I 三种酶的单、双酶解数据不足, 所以仅对 7 种酶的切点定位。从电泳结果中可发现有两对酶的双酶解与单酶解片段不符: BamHI × PstI 应有三条片段, 但只能发现两条; Bgl II × EcoR I 应有两条片段, 却也只能检出一几乎与



mtDNA 分子一样大小的片段。从酶切图谱中可以看出, BamH I 的一个切点与 Pst I 的切点非常接近, 约间隔 0.55kb; Bgl II 在线型图上位于零点, EcoR I 在 16.08kb 处, 因此 EcoR I x Bgl II 应有 16.08 和 0.47kb 两片段。而象 0.55kb 和 0.47kb 这样小的片段在 1.2% 琼脂糖凝胶上是难于检出的。

酶切图谱上位点的分布是不均匀的, 主要在两个比较集中的区段。一个是在线型图的 2.5kb 至 7.0kb 处, 另一个在 10.0kb 至 13.0kb 处。这一现象与 BamH I、Pvu II、Pst I 和 Sac I 四种酶识别序列的碱基组成以 G 和 C 为主 (四种酶识别序列的 G+C/A+T=2/1) 有关。暗示鲇 mtDNA 分子上核苷酸的分布具有一定规律性。限制酶切位点分布的不均匀性有许多报道, 但其生物学意义尚不清楚。

大量研究表明, 包括鱼类在内的脊椎动物在种间或种内存在着广泛的 mtDNA 的限制性片段长度多态 (RFLP) 现象<sup>[4]</sup>。本实验所分析的鲇的个体间, 没有发现此现象。可能是实验所分析的片段不够多。10 种酶共得到 23 个片段, 计 138bp, 占鲇线粒体基因组的 0.84%。如要增加所分析的片段的数量, 则要分辨力更高的酶切电泳方法。

鲇在我国分布极广, 由于地理隔离而形成许多地理群体。如果其间隔时间较长而无基因流动, 那么不同的地理群体将积累不同的 mtDNA 变异<sup>[3]</sup>, 形成种内 mtDNA 多态现象。鲇群体间 mtDNA 多态现象还需在未来以系统全面的工作进行探索。

致谢: 本文实验在淡水鱼类种质资源与生物技术国家重点实验室完成, 得到了鲁大椿、汤伏生、王朝元、龙华和晏勇等老师的帮助。

## 参 考 文 献

- [1] 赵邦梯等, 1983. 北京鸭肝脏线粒体 DNA 的限制酶图谱. 中国科学 (B 辑), (3): 213-222.
- [2] 潘伟志等, 1992. 鲇鱼的人工繁殖. 水产学报, 16 (3): 278-281.
- [3] Avise, J.C., and N.C. Saunders, 1984. Hybridization and introgression among species of sunfish (*Lepomis*) analysis by mitochondrial DNA allozyme markers. *Genetics*, 108: 237-255
- [4] Avise, J.C., and R.A. Lansman, 1983. *Evolution of genes and proteins*, pp147-164. Sinauer Associates, Sunderland, Mass
- [5] Birt, T.P., J.M. Green, and W.S. Davidson, 1991. Mitochondrial DNA variation reveals genetically distinct sympatric populations of anadromous and nonanadromous Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 48: 577-582
- [6] Brown, W., 1983. *Evolution of genes and proteins*, pp62-88. Sinauer Associates, Sunderland, Mass.
- [7] Ferris, S.D., and W.J. Berg, 1987. *Population genetics and fishery management*, pp277-299. University of Washington Press, Seattle.
- [8] Hynes, R.A., E.J. Duke, and P.Joyce, 1989. Mitochondrial DNA as a genetic marker for brown trout, *Salmo trutta* L., populations. *J.Fish Biol.*, 35: 687-701.
- [9] Meyer, A., and T.D. Kocher et al. 1990. Monophyletic origin of Lake Victoria cichlid fishes suggested by mitochondrial DNA sequences. *Nature*, 347: 550-553.
- [10] Palva T.K., and E.T.Palva, 1985. Rapid isolation of animal mitochondrial DNA by alkaline extraction. *FEBS letters*, 192(2): 267-270.
- [11] Potter, S.S., and J.E.Newbold et al., 1975. Specific cleavage analysis of mammalian mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72: 4496-4500.



## A PRELIMINARY STUDY ON MITOCHONDRIAL DNA OF CATFISH, *SILURUS ASOTUS* L.

Cao Ying<sup>1,\*</sup> Zhang Xingzhong<sup>2</sup> Yang Ganrong<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Fishery School, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070;

<sup>2</sup>State Key Laboratory of Freshwater Fish Germplasm Resources and Biotechnology, Shashi 434000)

**ABSTRACT** In this study, 13 restriction enzymes, which recognize nucleotide sequences of six basepairs on DNA molecules, were employed to cleave catfish (*Silurus asotus* L.) mtDNA, among which BamH I, Bg II, Bg III, EcoR I, Hind III, Pst I, Pvu II, Sac I and Sca I have 2, 2, 1, 1, 5, 1, 3, 2 and 1 recognition sites, respectively, on catfish mtDNA; the cleavage sites of Xba I are more than five; while enzymes Cla I, Dra I and Kpn I have no sites. The size estimate for catfish mtDNA is 16.55kb. The recognition sites of seven enzymes, BamH I, Bg III, EcoR I, Pst I, Pvu II, Sac I and Sca I, were also mapped on mtDNA. Ten individuals were examined in the research. However, the restriction fragment length polymorphism (RFLP), which occurs ubiquitously in vertebrates, was not found. The protocol for extracting mtDNA from fish applied in the study was proved to be very efficacious.

**KEYWORDS** Catfish (*Silurus asotus* L.), mtDNA, Restriction endonuclease, Restriction map