

5种常见石斑鱼的线粒体DNA酶切物理图谱

杨少闻, 刘楚吾

(广东海洋大学水产学院, 广东 湛江 524025)

摘要:用识别5,6碱基序列的17种限制性内切酶,即 *Bam*HI、*Bgl*I、*Bgl*II、*Dra*I、*Eco*RI、*Eco*RV、*Hind*III、*Kpn*I、*Mlu*I、*Pst*I、*Pvu*II、*Sal*I、*Sca*I、*Sma*I、*Spy*I、*Xba*I和 *Xho*I,对南海海域石斑鱼属(*Epinephelus* Bloch)野生蜂巢石斑鱼(*E. merra*)、鲑点石斑鱼(*E. fario*)、青石斑鱼(*E. atroara*)、赤点石斑鱼(*E. akaara*)和七带石斑鱼(*E. septemfasciatus*)的线粒体DNA(mtDNA)进行RFLP分析。测算出蜂巢石斑鱼、鲑点石斑鱼、青石斑鱼、赤点石斑鱼和七带石斑鱼的mtDNA分子大小分别为 (18.52 ± 0.21) kb、 (18.44 ± 0.21) kb、 (18.56 ± 0.18) kb、 (18.57 ± 0.19) kb和 (18.36 ± 0.11) kb。通过单、双酶切分析,分别构建了蜂巢石斑鱼10种酶共20个酶切位点、鲑点石斑鱼9种酶共17个酶切位点、青石斑鱼8种酶共16个酶切位点、赤点石斑鱼7种酶共12个酶切位点和七带石斑鱼7种酶共13个酶切位点的酶切物理图谱。*Bgl*II和 *Xho*I两种内切酶的酶切谱带可作为鉴别这5种石斑鱼的RFLP标记。[中国水产科学,2006,13(3): 344-351]

关键词:石斑鱼;RFLP;mtDNA;物理图谱;分子标记

中图分类号:Q959.483 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2006)03-0344-08

石斑鱼隶属鲈形目(Perciformes)、鲈科(Serranidae)、石斑鱼亚科(Epinephelinae)、石斑鱼属(*Epinephelus* Bloch)^[1],约100种,具有分布广、生长快、个体大和肉质鲜美等特点,分布于热带和亚热带海域,只有少数分布于温带海域。中国有36种,大多产于南海、东海,为名贵食用鱼类,其中,青石斑鱼及赤点石斑鱼为海水网箱养殖的主要对象,是中国出口活鱼的主要种类^[2]。

在分子水平上对石斑鱼进行研究采用较多的是微卫星DNA或称SSR和RAPD方法,而利用RFLP方法的仅见Richardson等^[3]对黑缘石斑鱼(*E. morio*)遗传结构的研究。在国内,对石斑鱼的研究多集中在饲料研制、饵料培养、疾病防治和幼苗培育等方面,在分子水平上的研究仅见郑莲等^[4-5]应用RAPD方法对石斑鱼的遗传多样性分析和聚类分析。为了尽快了解南海海域的野生蜂巢石斑鱼、鲑点石斑鱼、青石斑鱼、赤点石斑鱼和七带石斑鱼5种常见石斑鱼的遗传现状,使石斑鱼这一优良养殖鱼种得到很好的保护、开发和利用,有必要对其进行深入的基础研究。

mtDNA分析在研究动物种间和种内关系中应

用十分广泛^[6]。由于其结构简单,易于分离,进化较快等特点,在动植物种群遗传结构分析、物种及品系鉴定方面得到了广泛的应用^[7]。建立mtDNA限制性酶切图谱为深入研究mtDNA基因结构及功能,进行基因定位,研究其基因的表达及调控等提供了基础。不同物种及种群间mtDNA限制性酶切图谱的比较可为探索物种的起源及演化提供有益的资料^[8]。本研究应用限制性片段长度多态性(RFLP)技术对南海海域石斑鱼属5个常见种类的mtDNA进行了分析,构建这5种石斑鱼的线粒体DNA酶切物理图谱,旨在为石斑鱼的遗传育种工作打下基础,并为进一步在分子水平上对石斑鱼开展研究积累资料。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用蜂巢石斑鱼(*Epinephelus merra*)、鲑点石斑鱼(*E. fario*)、青石斑鱼(*E. atroara*)、赤点石斑鱼(*E. akaara*)和七带石斑鱼(*E. septemfasciatus*)于2003年从湛江海域采集,取新鲜肝脏用于制备线粒体DNA。

收稿日期:2005-05-29; 修订日期:2005-12-05。

基金项目:广东省重大科技兴海项目(A200099A01);湛江市科技攻关项目(文件编号:湛财企[2000]121号,项目编号:17)。

作者简介:杨少闻(1974-),女,硕士,讲师,主要从事水产经济动物繁育生物学研究。E-mail:yangsw@gdou.edu.cn

通讯作者:刘楚吾。E-mail:swyjs@gdou.edu.cn

1.2 方法

1.2.1 试剂 琼脂糖、核酸酶、DNA分子量标记、限制性内切酶等为华美生物工程公司产品,其他试剂均为国产分析纯。

1.2.2 mtDNA的提取 mtDNA的分离和纯化依照戴建华^[9]等描述的方法进行。

1.2.3 mtDNA的单、双酶切 酶切反应条件参照酶生产商(华美生物工程公司)推荐的条件。

1.2.4 电泳分析 将酶解产物在0.7%琼脂糖凝胶(含0.5 μg/mL EB)中电泳。以λDNA/*Hind* III (23 130 bp, 9 416 bp, 6 557 bp, 4 361 bp, 2 322 bp和2 027 bp)和λDNA/*Eco* R I + *Hind* III (21 227 bp, 5 148 bp, 4 268 bp, 3 530 bp, 2 027 bp, 1 904 bp, 1 584 bp, 1 375 bp, 947 bp和831 bp)Marker作为分子量标

准。电泳缓冲液为0.5×TBE,电压为5 V/cm,常温下电泳2 h。用Tanon GIS-2008型凝胶成像仪观察并拍照。利用Gelpro32软件计算各酶切片段的大小。

2 结果

2.1 石斑鱼 mtDNA 的单酶切

mtDNA经17种限制性内切酶酶切后,在5种石斑鱼的种内均检测到个体间多态的现象。为构建酶切物理图谱,每个种均以在各自种群中占有最高比例的限制性单倍型(蜂巢石斑鱼、鲃点石斑鱼、青石斑鱼、赤点石斑鱼和七带石斑鱼分别为第7、2、2、1和1种限制性单倍型)为标准来说明。5种石斑鱼的mtDNA单酶切的结果见图1(I~V)和表1。图1(VI)显示出5种鱼的特征RFLP标记。

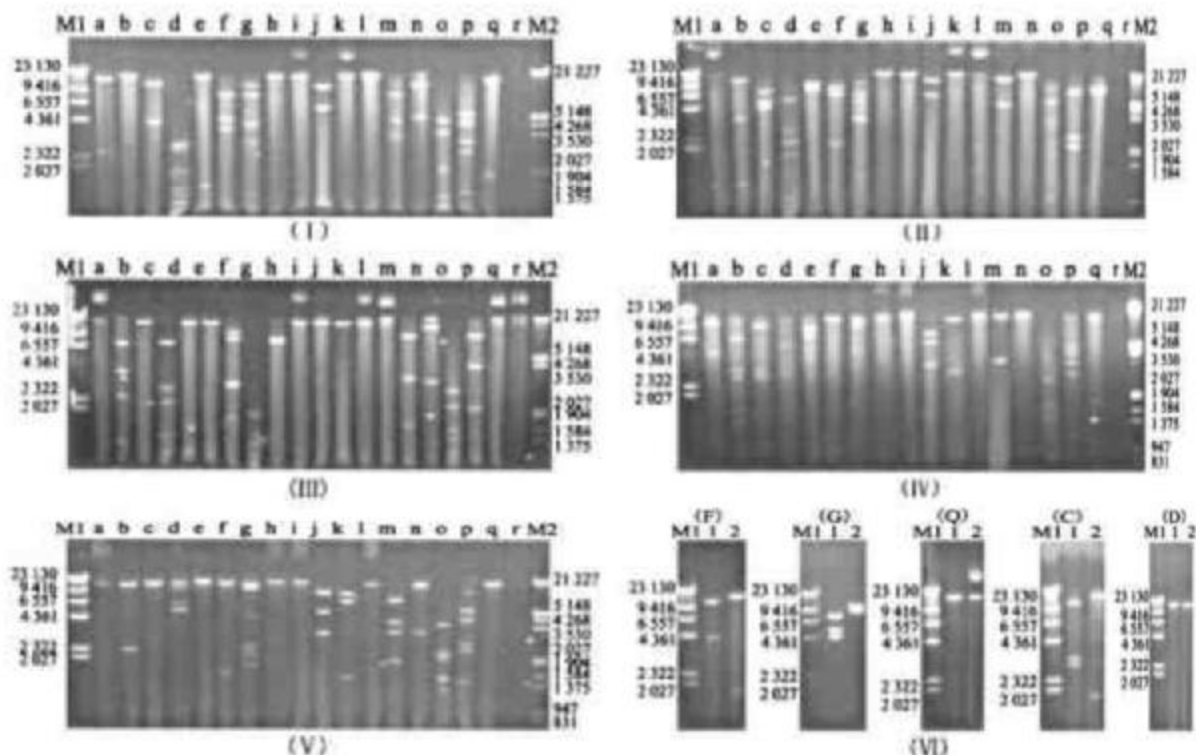


图1 5种石斑鱼的 mtDNA 单酶切电泳图和 5 种鱼的特征 RFLP 标记

I:蜂巢石斑鱼单酶切;II:鲃点石斑鱼单酶切;III:青石斑鱼单酶切;IV:赤点石斑鱼单酶切;V:七带石斑鱼单酶切;VI:特征RFLP标记;F:蜂巢石斑鱼;G:鲃点石斑鱼;Q:青石斑鱼;C:赤点石斑鱼;D:七带石斑鱼;1:*Bgl* II;2:*Xba* I; M1:λDNA/*Hind* III; a:*Bam* HI; b:*Bgl* I; c:*Bgl* II; d:*Dra* I; e:*Eco* RI; f:*Eco* RV; g:*Hind* III; h:*Kpn* I; i:*Mlu* I; j:*Pst* I; k:*Pvu* II; l:*Sal* I; m:*Sa* I; n:*Sna* I; o:*Sty* I; p:*Xba* I; q:*Xba* I; r:空白对照(negative sample); s:*Hinf* I; t:*Hpa* I; M2:λDNA/*Eco* RI + *Hind* III.

Fig.1 RFLP of mtDNAs of 5 *Epinephelus* species yielded by single restriction endonuclease digestion and their specific restriction patterns

I - V: The electrophoretic patterns of mtDNAs by single enzyme digestion for *E. merrui*, *E. fario*, *E. aeneus*, *E. akaara* and *E. septemfasciatus* respectively; VI: Specific restriction patterns; F: *E. merrui*; G: *E. fario*; Q: *E. aeneus*; C: *E. akaara*; D: *E. septemfasciatus*.

表1 5种石斑鱼 mtDNA 的单酶切片段

Tab.1 Restriction fragments length of mtDNA from the five species of groupers digested by single enzyme

内切酶 Enzyme	蜂巢石斑鱼 <i>E. merra</i>	鲑点石斑鱼 <i>E. furio</i>	青石斑鱼 <i>E. awoara</i>	赤点石斑鱼 <i>E. akaara</i>	七带石斑鱼 <i>E. septemfasciatus</i>
<i>Bam</i> H I	15.80 2.58	0	0	14.38 4.27	0
<i>Bgl</i> I	18.86	14.22 3.57 0.78	10.33 4.20 2.68 1.33	8.45 3.32 2.80 1.65 1.38 0.87	16.24 2.30
<i>Bgl</i> II	14.04 4.54	8.19 5.46 4.58	18.47	12.93 2.93 2.63	18.21
<i>Dra</i> I	n	n	n	n	n
<i>Eco</i> R I	16.76 1.53	10.79 8.19	18.80	11.22 7.60	18.21
<i>Eco</i> R V	9.42 4.80 4.04	9.21 7.37 1.76	18.47	18.42	16.80 1.47
<i>Hind</i> III	n	n	n	n	n
<i>Kpn</i> I	18.86	18.33	0	0	18.21
<i>Mlu</i> I	0	18.33	18.47	0	0
<i>Pst</i> I	12.48 6.15	12.16 6.12	17.57 0.92	8.41 6.24 3.81	10.66 4.69 2.97
<i>Pvu</i> II	0	0	16.55 2.20	15.43 3.03	9.87 6.99 1.46
<i>Sal</i> I	18.86	0	0	0	0
<i>Sca</i> I	10.45 4.69 3.47	14.22 4.47	11.61 3.49 1.73 0.97 0.83	15.43 3.37	9.14 4.03 3.31 1.98
<i>Sma</i> I	13.88 4.69	18.33	15.34 3.36	18.42	15.63 3.06
<i>Sty</i> I	n	n	n	n	n
<i>Xba</i> I	6.15 4.69 3.24 2.77 1.39	8.60 2.61 2.16	11.88 4.74 2.18	5.33 4.47 3.60 3.03 1.14	n
<i>Xho</i> I	16.76 1.85	10.10 8.40	0	16.57 1.77	18.21
$\bar{X} \pm SD$	18.52 $\pm$ 0.21	18.44 $\pm$ 0.21	18.56 $\pm$ 0.18	18.57 $\pm$ 0.19	18.36 $\pm$ 0.11

注：“0”表示没有切点；“n”表示有较多片段，难以统计。
Note: mtDNA not being digested are marked with “0”; the fragments not being detected completely are marked with “n”.

2.2 石斑鱼 mtDNA 的双酶切和酶切物理图谱的构建

每个种均以在各自种群中占有最高比例的限制性单倍型为标准，选择切点数在5以下，酶切完全的

内切酶两两组合，对 mtDNA 进行双酶切。5种石斑鱼的 mtDNA 双酶切结果见表2~6和图2。根据单酶切和双酶切的结果，分别构建了这5种石斑鱼的酶切物理图谱(图3~7)。

表2 蜂巢石斑鱼 mtDNA 双酶切片段

Tab.2 Restriction fragments length of mtDNA from *E. merra* with double enzyme digestion

内切酶 Enzyme	片段大小/kb Fragment length	内切酶 Enzyme	片段大小/kb Fragment length	内切酶 Enzyme	片段大小/kb Fragment length
<i>Bgl</i> I / <i>Bgl</i> II	9.04 4.69 4.36	<i>Xho</i> I / <i>Bgl</i> I	12.78 3.98 1.98	<i>Xho</i> I / <i>Bgl</i> II	7.54 5.59 3.78 1.80
<i>Sal</i> I / <i>Bgl</i> I	13.33 5.13	<i>Xho</i> I / <i>Sal</i> I	9.42 7.32 1.94	<i>Sma</i> I / <i>Bgl</i> I	13.73 2.69 1.74
<i>Sal</i> I / <i>Bgl</i> II	13.99 3.46 1.10	<i>Eco</i> R V / <i>Bgl</i> I	6.24 4.99 4.08 3.02	<i>Sma</i> I / <i>Sal</i> I	11.08 4.69 2.61
<i>Eco</i> R I / <i>Bgl</i> I	12.68 4.03 1.66	<i>Eco</i> R V / <i>Sal</i> I	9.04 4.91 4.03 0.38 *	<i>Xho</i> I / <i>Bam</i> H I	15.31 1.73 1.65
<i>Eco</i> R I / <i>Sal</i> I	10.72 6.23 1.72	<i>Bam</i> H I / <i>Bgl</i> I	8.27 7.32 2.83	<i>Sca</i> I / <i>Sal</i> I	7.34 4.69 3.40 3.02
<i>Pst</i> I / <i>Bgl</i> I	12.68 3.32 2.56	<i>Eco</i> R V / <i>Bgl</i> II	7.70 3.89 3.22 1.75 1.59	<i>Sca</i> I / <i>Bgl</i> I	10.45 4.69 2.34 1.13
<i>Pst</i> I / <i>Bgl</i> II	6.45 5.35 4.47 1.95	<i>Bam</i> H I / <i>Sal</i> I	13.99 2.46 2.23		

注：“*”表示片段在紫外光下未能检测到，根据相关片段的长度推出。
Notes: The fragments marked with “*” which were not detected were estimated according to the size of the other fragments.

表3 鲑点石斑鱼 mtDNA 双酶切片段

Tab.3 Restriction fragments length of mtDNA from *E. fario* with double enzyme digestion

内切酶 Enzyme	片段大小/kb Fragment length	内切酶 Enzyme	片段大小/kb Fragment length	内切酶 Enzyme	片段大小/kb Fragment length
<i>Kpn</i> I / <i>Xho</i> I	10.31 6.80 1.41	<i>Pst</i> I / <i>Xho</i> I	9.23 4.57 3.24 1.60	<i>EcoRV</i> / <i>Kpn</i> I	8.04 7.24 1.90 1.59
<i>Bgl</i> I / <i>Xho</i> I	7.81 6.25 2.70 1.26 0.68 *	<i>Sca</i> I / <i>EcoR</i> I	9.42 4.71 3.13 1.37 *	<i>EcoRV</i> / <i>Pst</i> I	6.76 5.52 3.41 1.95 1.12
<i>Bgl</i> I / <i>Kpn</i> I	9.49 4.57 3.38 1.23	<i>Sca</i> I / <i>Pst</i> I	7.78 5.40 3.51 2.11	<i>Pst</i> I / <i>Mlu</i> I	12.24 4.52 1.76
<i>EcoR</i> I / <i>Kpn</i> I	8.73 7.39 2.70	<i>Sma</i> I / <i>Kpn</i> I	12.90 6.03	<i>Pst</i> I / <i>Kpn</i> I	10.18 6.35 2.08
<i>EcoRV</i> / <i>Mlu</i> I	7.60 4.89 3.99 1.79	<i>Sma</i> I / <i>Xho</i> I	8.48 5.15 4.60	<i>Mlu</i> I / <i>Kpn</i> I	15.09 3.21
<i>Mlu</i> I / <i>Pst</i> I	12.52 4.42 1.64	<i>EcoR</i> I / <i>Mlu</i> I	10.45 7.43 0.76 *	<i>Mlu</i> I / <i>Xho</i> I	10.45 4.60 3.17

注: "*"表示片段在紫外光下未能检测到,根据相关片段的长度推出。

Note: The fragments marked with "*" were not detected and were estimated according to the size of the other fragments.

表4 青石斑鱼 mtDNA 双酶切片段

Tab.4 Restriction fragments length of mtDNA from *E. awoara* with double enzyme digestion

内切酶 Enzyme	片段大小/kb Fragment length	内切酶 Enzyme	片段大小/kb Fragment length	内切酶 Enzyme	片段大小/kb Fragment length
<i>Bgl</i> II / <i>EcoRV</i>	11.57 6.87	<i>Pst</i> I / <i>Mlu</i> I	16.83 1.11 1.08 *	<i>Pst</i> I / <i>EcoRV</i>	16.15 1.39 1.00
<i>Mlu</i> I / <i>Bgl</i> II	10.10 8.58	<i>Pst</i> I / <i>Bgl</i> II	8.99 8.58 1.08	<i>EcoR</i> I / <i>EcoRV</i>	17.22 1.04 0.09 *
<i>Mlu</i> I / <i>EcoRV</i>	17.22 1.10	<i>Xba</i> I / <i>Bgl</i> II	11.61 4.54 1.81 0.37 *	<i>EcoR</i> I / <i>Mlu</i> I	16.83 1.13 0.40 *
<i>Sma</i> I / <i>Bgl</i> II	9.86 5.52 3.31	<i>Xba</i> I / <i>EcoRV</i>	5.92 5.39 4.64 2.21	<i>EcoR</i> I / <i>Bgl</i> II	11.91 5.45 1.06 *
<i>Sma</i> I / <i>EcoRV</i>	13.65 3.27 1.71	<i>Xba</i> I / <i>Pst</i> I	7.47 4.64 3.23 2.21 1.05	<i>Bgl</i> I / <i>Pst</i> I	10.07 4.15 1.43 1.39 1.00 0.10 *
<i>EcoR</i> I / <i>Pst</i> I	15.37 1.25 1.18 1.00	<i>Bgl</i> I / <i>EcoRV</i>	9.20 4.01 2.61 1.38 1.11	<i>Xba</i> I / <i>Mlu</i> I	6.94 4.80 4.27 2.30
<i>Sma</i> I / <i>Pst</i> I	14.26 3.15 1.00 0.08 *	<i>Bgl</i> I / <i>Mlu</i> I	10.10 4.07 2.24 1.36 0.37 *	<i>Bgl</i> I / <i>Xba</i> I	4.96 4.11 3.60 2.68 2.18 1.34 0.56 *

注: "*"表示片段在紫外光下未能检测到,根据相关片段的长度推出。

Note: The fragments marked with "*" which were not detected and were estimated according to the size of the other fragments.

表5 赤点石斑鱼 mtDNA 双酶切片段

Tab.5 Restriction fragments length of mtDNA from *E. akaara* with double enzyme digestion

内切酶 Enzyme	片段大小/kb Fragment length	内切酶 Enzyme	片段大小/kb Fragment length	内切酶 Enzyme	片段大小/kb Fragment length
<i>EcoRV</i> / <i>Bam</i> HI	8.86 5.81 3.96	<i>Pst</i> I / <i>EcoR</i> I	9.70 5.04 2.46 1.53	<i>Xho</i> I / <i>Sma</i> I	16.18 1.85 0.38 *
<i>EcoR</i> I / <i>EcoRV</i>	8.86 7.62 2.39	<i>Sma</i> I / <i>EcoRV</i>	16.18 2.66	<i>Pvu</i> II / <i>Bam</i> HI	7.39 4.58 3.27 3.12
<i>EcoR</i> I / <i>Bam</i> HI	10.94 3.53 3.33 0.76 *	<i>Sma</i> I / <i>Pvu</i> II	11.97 3.81 2.86	<i>Pvu</i> II / <i>Xho</i> I	10.30 3.27 3.03 1.88
<i>Pst</i> I / <i>EcoRV</i>	8.09 6.55 3.48	<i>Xho</i> I / <i>EcoRV</i>	12.72 3.81 1.82		

注: "*"表示片段在紫外光下未能检测到,根据相关片段的长度推出。

Note: The fragments marked with "*" were not detected and were estimated according to the size of the other fragments.

表6 七带石斑鱼 mtDNA 双酶切片段

Tab.6 Restriction fragments length of mtDNA from *E. septemfasciatus* with double enzyme digestio

内切酶 Enzyme	片段大小/kb Fragment length	内切酶 Enzyme	片段大小/kb Fragment length	内切酶 Enzyme	片段大小/kb Fragment length
<i>EcoR</i> I / <i>Xho</i> I	13.37 4.96	<i>Bgl</i> I / <i>EcoR</i> I	13.37 3.08 2.39	<i>Pvu</i> II / <i>EcoR</i> V	9.63 3.70 3.22 1.49
<i>EcoR</i> V / <i>EcoR</i> I	16.59 1.67 0.21 *	<i>Bgl</i> I / <i>Bgl</i> II	13.79 2.39 2.06	<i>Pvu</i> II / <i>EcoR</i> I	9.63 5.25 1.73 1.49
<i>EcoR</i> V / <i>Xho</i> I	12.97 3.48 1.65	<i>Pst</i> I / <i>EcoR</i> I	8.43 4.96 3.18 1.95	<i>Pvu</i> II / <i>Bgl</i> II	9.63 6.27 1.51 0.65 *
<i>Bgl</i> II / <i>EcoR</i> I	17.65 0.70 *	<i>Pst</i> I / <i>Xho</i> I	7.92 4.96 3.18 2.22	<i>Pvu</i> II / <i>Xho</i> I	9.83 6.73 1.53 0.24 *
<i>Bgl</i> II / <i>Xho</i> I	11.82 6.39	<i>Pst</i> I / <i>Bgl</i> II	10.14 4.96 3.18	<i>EcoR</i> V / <i>Bgl</i> II	16.31 1.59 0.49 *
<i>Bgl</i> I / <i>Xho</i> I	10.28 5.87 2.26	<i>Pst</i> I / <i>EcoR</i> V	7.40 4.78 3.07 1.69 1.47	<i>Pst</i> I / <i>Bgl</i> I	10.78 3.01 1.72 1.61 1.50

注: * 表示片段在紫外光下未能检测到, 根据相关片段的长度推出。

Note: The fragments marked with "*" were not detected and were estimated according to the size of the other fragments.



图2 鲑点石斑鱼部分双酶切电泳图谱

Fig.2 Parts of restriction fragments of mtDNA from *E. fario* with double enzyme digestion

M1: λ DNA/*Hind* III; a: *Kpn* I / *Xho* I; b: *Bgl* I / *Kpn* I; c: *Bgl* I / *Xho* I; d: *Bgl* II / *Kpn* I; e: *Bgl* II / *Xho* I; f: *EcoR* I / *Bgl* II; g: *EcoR* I / *Kpn* I; h: *EcoR* V / *Xho* I; i: *EcoR* V / *Mlu* I; j: *Hpa* I / *EcoR* I; k: *Hpa* I / *Kpn* I; l: *Mlu* I / *Pvu* II; m: *Mlu* I / *Pst* I; n: *Pst* I / *Xho* I; o: *Pvu* II / *Pst* I; p: *Sma* I / *Xho* I; q: *Sma* I / *Mlu* I; r: *Sma* I / *EcoR* I; s: *Sma* I / *Xho* I; t: *Xho* I / *Mlu* I; u: *Xho* I / *Pst* I; v: 空白对照 (negative sample); M2: λ DNA/*EcoR* I + *Hind* III

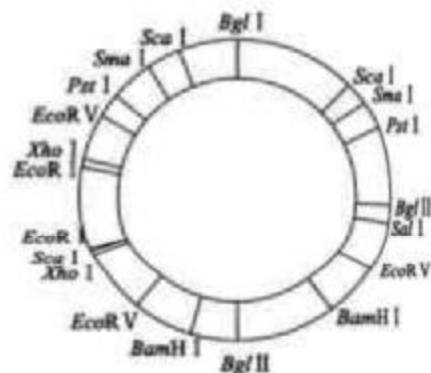


图3 蜂巢石斑鱼 mtDNA 酶切物理图谱

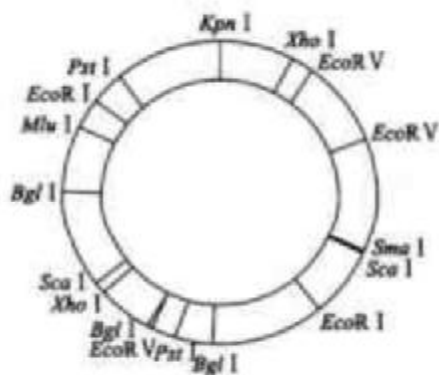
Fig.3 Physical map of mtDNA of *E. nana*

图4 鲑点石斑鱼 mtDNA 酶切物理图谱

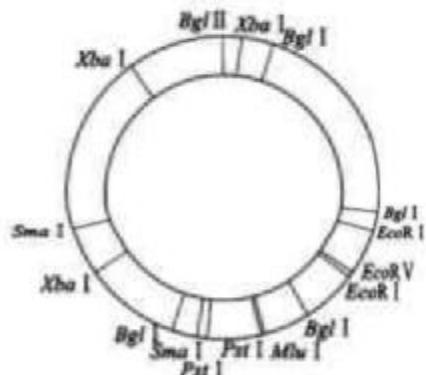
Fig.4 Physical map of mtDNA of *E. fario*

图5 青石斑鱼 mtDNA 酶切物理图谱

Fig.5 Physical map of mtDNA of *E. aeneus*

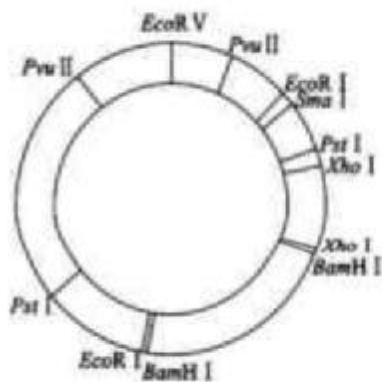


图6 赤点石斑鱼 mtDNA 酶切物理图谱

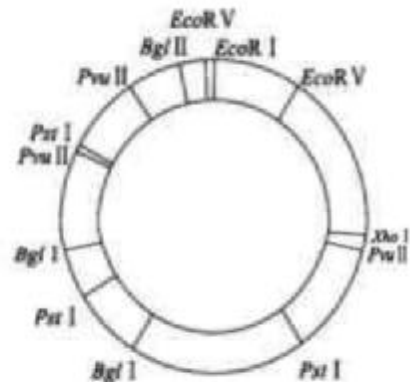
Fig.6 Physical map of mtDNA of *E. akaara*

图7 七带石斑鱼 mtDNA 酶切物理图谱

Fig.7 Physical map of mtDNA of *E. septemfasciatus*

2.3 5种鱼的特征 RFLP 标记

*Bgl*II和 *Xho*I这2种内切酶的切点在5种石斑鱼的种内均未发现多态性。这两种内切酶在蜂巢石斑鱼各自存在2个切点, *Bgl*II酶切片段为14.04 kb和4.54 kb, *Xho*I酶切片段为16.76 kb和1.85 kb;在鲑点石斑鱼分别产生了3个和2个切点, *Bgl*II酶切片段为8.19 kb、5.46 kb和4.58 kb, *Xho*I酶切片段为10.10 kb、8.40 kb;在青石斑鱼 *Bgl*II有1个切点,而 *Xho*I没有切点;在赤点石斑鱼分别产生了3个和2个切点, *Bgl*II酶切片段为12.93 kb、2.93 kb和2.63 kb, *Xho*I酶切片段为16.57 kb和1.77 kb;在七带石斑鱼 *Bgl*II和 *Xho*I都只具有1个切点见图1(VI)。可以将这两种内切酶的酶切带型作为鉴别这5种石斑鱼的RFLP标记。

3 讨论

这5种石斑鱼的mtDNA分子大小分别为:蜂巢石斑鱼(18.52±0.21) kb、鲑点石斑鱼(18.44±0.21) kb、青石斑鱼(18.56±0.18) kb、赤点石斑鱼(18.57±0.19) kb、七带石斑鱼(18.36±0.11) kb。这一结果与已报道的50多种鱼类mtDNA分子大小(15.2~19.8 kb)^[10]基本相符。本研究mtDNA分子大小的差异可能由软件计算误差所致,并不一定代表种内个体或种间的长度变异。

从5种石斑鱼的酶切物理图谱(图3~7)可以观察到,大多数酶切位点位于一半的酶谱单位范围内,即酶切位点在mtDNA基因组中的分布是不均匀的,这种情况在其他动物的mtDNA中也可看到^[11],其包含的意义有待于进一步研究。由于mtDNA呈母系遗传,基因组结构高度保守,但一级

结构却存在大量的分歧,有利于进行种内和种间的遗传变异和进化研究^[12]。限制性内切酶图谱既具有相对的稳定性,又能反映一定的变异,是从分子水平研究动物种群遗传学和进化遗传学的一种有效的手段^[13]。同时酶切物理图谱也是种质鉴定(遗传标记)的一种比较稳定的指标^[12]。开展mtDNA酶切图谱的研究,可以为线粒体基因定位,建立基因文库,比较不同来源mtDNA的差异,探索物种的起源和演化以及地理分布等提供非常有意义的资料^[14]。本研究构建的5种石斑鱼的酶切物理图谱,可以为今后石斑鱼遗传和进化的研究、物种的鉴别、遗传育种等工作提供依据,具有理论和现实意义。

线粒体基因组具有独立复制的能力。线粒体有自身独特的DNA、rRNA、tRNA、核糖体,但是实现线粒体基因组复制与表达所需的许多酶(如DNA聚合酶、RNA聚合酶)却是由核基因组编码的^[15]。在线粒体中,线粒体基因组的DNA信息是有限的,大多数线粒体基因组仅能编码两种rRNA及20种tRNA(原动物除外)及13种多肽。因此,线粒体虽然有自己的DNA及核糖体等遗传装置,但由于它所含的遗传信息不足以支持它的生命活动,仍然要受核基因的控制^[16]。mtDNA的RFLP分析与mtDNA序列分析相比,不仅简单、快速、耗费低,而且从理论上讲,只要选择的酶足够多,就可检测到足够的变异,但它毕竟是一种间接检测DNA序列变异的方法,与DNA序列数据相比,提供的信息有限^[17]。

许多学者早已认识到,与核基因组相比,mtDNA能够更快地固定产生不同基因型。再加上mtDNA具有快速进化、母系遗传等特点,因而它能

够提供更有效和更灵敏的遗传标记^[18]。在鱼类的种群遗传标志上,mtDNA方法已取得十分诱人的成果。例如 Wirgin 等^[19]用内切酶酶切片段谱型作为遗传标记来区分 Chesapeake 湾和 Roanoke 河的条纹石斑。石斑鱼属种类繁多,某些物种在形态上极为相似。因此,进行石斑鱼人工繁殖必须准确鉴定亲鱼物种。本研究发现对于这 5 种石斑鱼,只使用 *Bgl* II 和 *Xho* I 两种内切酶就可以达到快速鉴定的目的。以往对物种的鉴别多从形态学、细胞学、生化指标(同工酶、蛋白质)等方面进行,而这些测量和实验所得到的标记结果是基因表达加工后的产物,受个体发育和环境条件的影响较大,往往不能反映物种本身固有的特征。在鱼类遗传育种研究上依据这些标记,势必导致育种研究的盲目性,也增加了不必要的工作量,因此依据 RFLP 方法建立 mtDNA 分子遗传标记,对鱼类遗传育种具有一定的现实意义。但如果野生种群存在种间杂交;或有人工杂交育种,并存在杂交种回归自然的可能性,那么 mtDNA 就失去了物种鉴别的效果。

参考文献:

- [1] 戚庆泰,郑葆璠.中国鱼类系统检索(上、下册)[M].北京:科学出版社,1997.289-293.
- [2] 谢忠明.牙鲆、石斑鱼养殖技术[M].北京:中国农业出版社,1999.182-183.
- [3] Richardson L R, Gold J R. Mitochondrial DNA variation in red grouper (*Epinephelus morio*) and greater amberjack (*Seriola dumerili*) from the Gulf of Mexico[J]. ICES J Mar Sci, 1993, 50: 53-62.
- [4] 郑 莲,刘楚香.棘黑石斑鱼随机扩增多态性 DNA 的初步研究[J]. 黑龙江海洋大学学报, 2002, 22(4): 14-18.
- [5] 郑 莲,刘楚香.4 种石斑鱼亲缘关系的 RAPD 分析[J]. 水产科学, 2004, 23(11): 16-20.
- [6] Billington N, Hebert P D N. Mitochondrial DNA diversity in fishes and its implications for introductions[J]. Can J Fish Aquat Sci, 1991, 48(Supp. 1): 80-94.
- [7] Brown W M. Restriction endonuclease cleavage maps of animal mitochondrial DNAs[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1974, 4: 617-634.
- [8] 兰 宏,施立明.鹿属(*Muntiacus*)动物线粒体 DNA 多态性及其遗传分化[J]. 中国科学(B 辑), 1993, 23(5): 489-497.
- [9] 戴建华,殷文莉,杨代淑,等.鲆鱼线粒体 DNA 的酶切图谱[J]. 水产学报, 1994, 18(4): 312-313.
- [10] 张国范,童亚青,赵 艳.海洋动物线粒体 DNA 研究进展[J]. 海洋科学, 1997, (1): 25-28.
- [11] 宋 平,李小迎,熊全妹.鲢鳙线粒体 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): 221-223.
- [12] 宋 平,李小迎,熊全妹.团头鲂线粒体 DNA 的限制性内切酶酶切图谱[J]. 水生生物学报, 1996, 20(2): 119-126.
- [13] 樊连春,赖宇鹏,朱亚菲,等.雌核发育银鲷两个不同品系线粒体 DNA 比较[J]. 海洋与湖沼, 2000, 31(4): 370-377.
- [14] 戴建华,殷文莉,杨代淑,等.胡子鲇 mtDNA 多态性及限制性酶切图谱[J]. 水生生物学报, 1996, 20(2): 144-149.
- [15] Anderson S, Bankier A T, Barrell B G, et al. Sequence and organisation of the human mitochondrial genome[J]. Nature, 1981, 290 (5 806): 457-465.
- [16] 熊 庆,刘作易,喻子牛.线粒体 DNA 的研究与应用[J]. 西南农业学报, 2002, 15(3): 111-114.
- [17] 肖武汉,张亚平.鱼类线粒体 DNA 的遗传与进化[J]. 水生生物学报, 2000, 24(4): 384-391.
- [18] 肖武汉,张亚平.银鲷自然群体线粒体 DNA 的遗传分化[J]. 水生生物学报, 2000, 24(1): 1-10.
- [19] Wirgin I I, Silverstein P, Grossfield J. Restriction endonuclease analysis of striped bass mitochondrial DNA: the Atlantic coastal migratory stock[J]. Amer Fish Soc Symp, 1990, 7: 475-491.

Physical maps of mtDNAs of five species in Genus *Epinephelus*

YANG Shao-wen, LIU Chu-wu

(Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China)

Abstract: The restriction fragment length polymorphism (RFLP) of mitochondrial DNA (mtDNA) of *Epinephelus* spp. (*E. merra*, *E. fario*, *E. auxara*, *E. akaara* and *E. septemfasciatus*) was studied using 17 restriction endonucleases with 5- and 6-bp recognition sites to construct their physical maps of mtDNA and establish a panel of molecular markers for the purposes of protection, exploitation and utilization. The samples were collected from the coastal area of Zhanjiang, Guangdong Province. These enzymes included *Bam*H I, *Bgl* I, *Bgl* II, *Dra* I, *Eco*R I, *Eco*RV, *Hind* III, *Kpn* I, *Mlu* I, *Pst* I, *Pvu* II, *Sal* I, *Sca* I, *Sma* I, *Sty* I, *Xba* I and *Xho* I. mtDNA was extracted from the fresh liver tissue by applying a difference centrifugation procedures. The purified mtDNA was cleaved by single or double enzymes. Electrophoresis of digested products was conducted through 0.7% agarose gels in 0.5 TBE running buffer at room temperature and 5 V/cm for 2 h. The size of mtDNA was estimated using the Gelpro32 software. The estimated size of mtDNA was (18.52 ± 0.21) kb, (18.44 ± 0.21) kb, (18.56 ± 0.18) kb, (18.57 ± 0.19) kb and (18.36 ± 0.11) kb respectively for *E. merra*, *E. fario*, *E. auxara*, *E. akaara* and *E. septemfasciatus*, which almost accorded with the results that had been published of more than fifty other species of fishes. There were 20, 17, 16, 12 and 13 cleavage sites detected for *E. merra*, *E. fario*, *E. auxara*, *E. akaara* and *E. septemfasciatus* with 10 (including *Bam*H I, *Bgl* I, *Bgl* II, *Eco*R I, *Eco*RV, *Pst* I, *Sal* I, *Sca* I, *Sma* I and *Xho* I), 9 (including *Bgl* I, *Eco*R I, *Eco*RV, *Kpn* I, *Mlu* I, *Pst* I, *Sca* I, *Sma* I and *Xho* I), 8 (including *Bgl* I, *Bgl* II, *Eco*R I, *Eco*RV, *Mlu* I, *Pst* I, *Sma* I and *Xba* I), 7 (including *Bam*H I, *Eco*R I, *Eco*RV, *Pst* I, *Pvu* II, *Sma* I and *Xho* I) and 7 (including *Bgl* I, *Bgl* II, *Eco*R I, *Eco*RV, *Pst* I, *Pvu* II and *Xho* I) restriction enzymes, respectively. According to these cleavage sites, the physical map of mtDNA from the five species was constructed. The enzymes *Bgl* II and *Xho* I can serve as diagnostic markers for identification of these five species. The cleavage sites of the enzymes *Bgl* II and *Xho* I showed no genetic diversity of intraspecies among these five species. There were 2, 3, 1, 3 and 1 cleavage sites detected with enzyme *Bgl* II. And the relevant restriction fragments lengths of mtDNA were 14.04 kb and 4.54 kb; 8.19 kb, 5.46 kb and 4.58 kb; 18.47 kb; 12.93 kb, 2.93 kb and 2.63 kb; 18.21 kb for *E. merra*, *E. fario*, *E. auxara*, *E. akaara* and *E. septemfasciatus*, respectively. There were 2, 2, 0, 2 and 1 cleavage sites detected with the enzyme *Xho* I. The relevant restriction fragments lengths of mtDNA were 16.76 kb and 1.85 kb; 10.10 kb and 8.40 kb; 16.57 kb and 1.77 kb; 18.21 kb for *E. merra*, *E. fario*, *E. akaara* and *E. septemfasciatus* respectively. [Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(3): 344–351]

Key words: *Epinephelus* spp; RFLP; mtDNA; physical map; diagnostic markers

Corresponding author: LIU Chu-wu. E-mail: swyjs@gdou.edu.cn