第2卷 第5期 中国水产科学 Vol.2,No.5
1995年12月 JOURNAL OF FISHERY SCIENCES OF CHINA Dec.,1995

鱼类线粒体 DNA 的研究及其应用

THE RESEARCH AND APPLICATION OF FISHES MITOCHONDRIAL DNA

郑光明 李新辉

（中国水产科学研究院珠江水产研究所，广州 510380）

Zheng Guangming Li Xinhui

(Pearl River Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guang Zhou 510380)

关键词 鱼类，线粒体 *DNA*，研究，应用

KEY WORDS Fishes, mtDNA, Research, Application

线粒体是细胞的重要呼吸器官，六十年代开始，细胞化学研究和密度梯度离心法相继证明线粒体中存在 DNA[2,13]。由于其是核外遗传物质，呈母性遗传，且分子核小，对其结构容易进行研究，吸引许多生物学工作者从事这方面的研究，他们已经在生物进化论、遗传学、分类学、医学遗传学及生物地理学等方面作出了许多贡献[1,2,4,7,10,13]。鱼类方面，八十年代开始引用 mtDNA 分析方法进行了遗传结构、遗传标记等研究[1,3,12,14,16-18,20,21]。我国对鱼类线粒体 DNA 的研究已有一些报道[1,4,6,12]，为了更深入开展这方面的工作，本文拟从线粒体 DNA 功能特性、鱼类 mtDNA 的研究与应用等方面进行如下综述。

线粒体 *DNA* 的功能和特性

动物线粒体 DNA 是独立于核染色体外的遗传物质，由共价闭环的双链 DNA 组成，高等动物中环长约 5μm，含约 17，000bp，每个细胞中含有 1，000-10，000 个拷贝，其中两条链因所含碱基不同分为重链（H）和轻链（L）。两条链均具编码功能，每个 mtDNA 分子编码一大一小两类 rRNA，装配 22 个线粒体蛋白的 tRNA，氧化磷酸化复合体系中包含 13 条多肽链的 mRNA（细胞色素 b、c，氧化酶的Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ亚单位，ATP 合成酶中亚单位 6 和 8，以及呼吸链 NADH 脱氢酶的 7 个亚单位：ND_1、ND_2、ND_3、ND_4、ND_4L、ND_5、ND_6）。mtDNA 除具编码功能外还具有自我复制和转录功能。哺乳动物 mtDNA 复制，一条复制在前，另一条复制在后，先在 L 链的特殊位置上开始，而亲代的 H 链暂且被搁置起来，从而产生 D 形环，亲代的 L 链复制继续进行而使 D 形环的体积增大，然后被搁置的亲代 H 链也开始复制[13]。因而 mtDNA 的表达物质对维持细胞生理功能至关重要外，研究 mtDNA 在遗传学方面也具有极其重要的意义。

研究表明 mtDNA 具有下列特性[2,5,6,10,12,14]：

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.com.cn

1. 绝大多数 mtDNA 中没有重复核苷酸序列，这是 mtDNA 一级结构的重要特点。
2. mtDNA 中含有短的均聚核苷酸序列，它们一般比核 DNA 中的小。
3. 动物细胞 mtDNA 表现出明显的分子内不均一性，在变性过程中，一些区域对热很不稳定，这些区域在加热过程中首先变性，很可能作为 RNA 聚合酶的识别点（启动子）。
4. mtDNA 中各基因排列紧凑，不含内含子序列。如人类 mtDNA 几乎没有非编码顺序，仅有 16，569 个碱基，基因之间十分紧凑。
5. 脊椎动物中 mtDNA 核苷酸置换率比核 DNA 高约 5–10 倍，即突变频率高，且缺乏修复功能，表现出快速进化特点。
6. mtDNA 为母系遗传。如 Leber 氏病是一种由 mtDNA 突变引起的疾病，通过女性遗传给后代。
7. mtDNA 的遗传不遵循孟德尔定律，能随机分配到子细胞中，在异质性细胞中发生遗传漂变。
8. 突变体 mtDNA 在不同组织中差异性表达（正常与不正常表现型）与这些组织对线粒体供能的依赖程度密切相关。

线粒体 DNA 的研究方法

目前基本上是通过一定的化学方法和梯度离心手段从若干肝脏、肌肉、卵巢、血液等组织器官中提取出纯的 mtDNA，然后用若干限制性核苷酸内切酶消解（通常是 4 或 6 识别点的内切酶），电泳分离出各组酶切片断，通过各片断迁移程度，以标准 mtDNA 分子迁移率作为参照，推算出各片断大小，算出整个 mtDNA 分子大小同时可根据各内切酶切点在 mtDNA 上的相对位置，作出限制性内切酶图谱，利用电镜技术作出以复制起点为原点的物理图谱，找出某一基因的相对位置[5-8,11]。

另外利用标准 mtDNA 作探针，通过分子杂交等技术可进行 mtDNA 上特定基因或片断核苷酸序列分析，达到测定线粒体基因组全部或部分核苷酸序列的目的[2,9,15,19]。

还可以利用电泳分析结果，通过 Nei 和 Tajimg（1983）[18] 介绍的公式：$D_{NT}=dxy-(dx+dy)/2$，（这里 dx，dy 分别为 x、y 两物种种群内序列平均歧异率，dxy 为 x、y 两物种间观测到的序列平均歧异率，D_{NT} 为 x、y 两物种之间的遗传距离），计算出两物种之间的遗传距离或碱基置换值，构建其分子进化系统树，确定其亲缘远近关系和进化历史。

鱼类 mtDNA 分析的实际应用

渔业资源的保护是一个极其重要的问题。水产科学家为了提高渔业产量和资源量，就得区分养殖鱼群与野生鱼群，不同野生鱼群以及不同产卵群体，对其进行标志，了解其群体结构、群体差异，确定现有资源量。传统的各种标志法，劳动强度大而且年年重复，而以 mtDNA 作遗传标志就勿需每条都标记，随时都可以通过采样分析区别不同类型的 mtDNA，它的方法是对某种鱼的 mtDNA 作限制性内切酶多态性分析（RFLPs），方法快捷简便。每种鱼类 mtDNA 都不同，即便同种内，亚种间，不同群体间都会有差异。

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.com.cn

通过测定鱼类 mtDNA 分子大小及 RFLPs，就可以区别不同种类和种群。目前国内外学者已经测定了几十种鱼 mtDNA 的分子大小[5,14]，并对一些经济鱼类进行了 RFLPs 分析。如 Birt 等（1986）和 Graves 等（1984）分别研究了近缘关系的非洄游性与洄游性的大西洋鳟（*Salmo salar*）以及大西洋与太平洋的鲣鱼（*Katsuwonus pelamis*）之间的 mtDNA，通过 RFLPs 分析，找出了 mtDNA 水平上最微小的变异，并据此可以作为不同类型的区别[18]。Gyllensten 和 Wislon（1987）研究了五种鲑科鱼类（*Salmonidae*）种间、种内 mtDNA 的差异性，为渔业经营管理和基因资源保护提供了依据[18]。Avise 等（1986）对产卵非常相似的美洲鳗（*Anguilla rostrata*）和欧洲鳗（*A.anguilla*）的 mtDNA 进行了分析，其存在明显 mtDNA 差别，为在子代群体中确定种类提供依据，方便人工养殖、捕捞及资源保护[18]。Billingto 和 Hebert（1988）研究了美国大湖区大眼鳈鲈（*Stizostedion vitreum*）种群 mtDNA 多态性，说明分布于大湖区盆地的鳈鲈群体可分为两大类型，一个占东部优势，一个占西部优势，从进化角度推测它们形成不同地理分布类群至少在上次冰蚀期到来前发生，并为亲鱼生存与繁殖成功与否提供了参考[14,18]。Palva 等（1987）对芬兰四种硬头鳟（*Salmo gairdneri*）产卵群体的 mtDNA 进行了分析，说明其广泛存在多态性，用 Hind Ⅲ和 Bgl Ⅲ分别消化 mtDNA，各自出现两种和三种不同限制性片断形态，mtDNA 的多态性能以限制性位点的获得或缺失得到解释[21]。Funkenstein 等（1990）也对以色列 Eilat 的海水金鲷（*Sparus anrata*）产卵群体 mtDNA 限制性位点进行了多态性研究，分析出其可分两个组，且至少起源于代表中世纪两个不同群体的不同母系[17]。又如 Ferguso 等（1993）研究了加拿大安大略湖养殖的硬头鳟（*S.gairdneri*）不同产卵期 mtDNA 变异，指出由于产卵期不同而发生基因漂变，产生 mtDNA 多态性，结合产卵期（非原养殖点）不同及 mtDNA 分析，在 340 尾发生 mtDNA 变异的硬头鳟中找出 27 种单模标本[16]。

在鱼类 mtDNA 进化分类学上，由于 mtDNA 在世代交替中快速进化，使同一母系的后代逐渐出现分化，通过分析遗传距离就可以确定不同类别，追踪其起源和进化历史。如 Billington 等（1988）[14]发现大湖区大眼鳈鲈（*S.vitreum*）可分 9 个类群，根据遗传距离可划分为两个主要组别，其遗传距离在 0.0015–0.0060 之间，mtDNA 顺序歧异性在 0.467 ± 0.200% 之间，这样推测它们大约在 230，000 ± 100，000 年前是同一祖先类型，在上次冰蚀期发生分化，一个来源于大西洋残遗种保护区，另一个来源于密西西比湖残遗种保护区。有一些鱼类种类遗传距离比较大，大于 0.001[14]，如硬头鳟（*S.gairdneri*）、大麻哈鱼（*Oncorhynchus keta*）、红大麻哈鱼（*O.nerka*）、银大麻哈鱼（*O.kisutch*）以及四种太阳鱼属（*Lepomis*）。就太阳鱼属而言，其遗传距离越大，它们的地理分离越近更新世纪的中期冰蚀期。而另外一些鱼类种类遗传距离较小，小于 0.001[14]，如大西洋与太平洋的鲣鱼（*K.pelamis*）没有种内歧异性，非洄游与洄游性大西洋鳟（*S.salar*）也缺乏种内 mtDNA 歧异性，美洲鳗（*A.rostrata*）mtDNA 的遗传距离很低（小于 0.001），比欧洲鳗（*A.anguilla*）更低（0.008）。所有这些资料都丰富了鱼类 mtDNA 进化分类。

在 mtDNA 序列分析方面，Anderson 等和 Bill（1981）已完成了人和小鼠线粒体基因组全部核苷酸序列的测定[2]。在鱼类研究方面，目前尚未见 mtDNA 全序列测定的报道，但已有片断分析，如 MeVeigh 等（1990）利用多聚酶连锁反应（PCR）与直接顺序测定了大西洋鳟（*S.salar*）线粒体细胞色素 b 基因的一个核苷酸片断的基因变化量，该片

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.com.cn

断由295个核苷酸组，在19个种群分析中，发现三个类型，每个类型之间有一个或二个核苷酸位点是不同的[20]。又如王钢锋等（1991）测定了鲤鱼线粒体DNA中URFA6L基因，该基因由165个核苷酸组成，同爪蟾URFA6L基因有68%的同源性，但同哺乳动物（如人、牛、小鼠）同源性较低[1]。这些工作都大大深化了鱼类分子遗传学的研究。

mtDNA的分析还可应用于环境保护和实验动物学领域中，众所周知，各种化学药品，其中很多是诱癌剂，可诱发基因突变。随着世界经济的日益发展，这些化合物或重金属，在各种化工业及加工业中得到广泛应用，各种农药杀虫剂，洗涤剂，食品添加剂等都会随工业、生活污水排放到水中，势必直接或间接地对人类造成潜在的遗传损害，而这些物质能引起人类直接食用的鱼类发生基因突变，特别是mtDNA上易突变的碱基位点对毒害物质非常敏感，通过测定鱼类mtDNA突变型，分析其对鱼类毒害作用，从而判断水体污染源和污染程度，为有效地保护水环境，保护鱼类及人类免遭遗传损害提供依据并实施相应保护措施。也可利用一定浓度毒害物质对鱼类mtDNA上易突变位点非常敏感性的特点；作为遗传指标应用于实验动物学领域，通过人工注射或移植造成鱼类感染，确定作为实验动物是否产生抗药突变型和敏感品系。在这方面如果蝇、变形虫、啤酒酵母等生物已有研究及应用[13]，利用这些经验和方法开展鱼类mtDNA研究，在实验动物学领域中应用势必产生深远意义和广阔前景。

小　　结

纵观鱼类mtDNA的研究及其应用，可以说进入了一个蓬勃发展阶段。在鱼类mtDNA分子大小、多态性、遗传标记、遗传距离等方面得到广泛研究，为洞悉鱼类遗传变异，群体结构地理分布，资源保护提供了可靠方法和依据，追踪鱼类进化、起源历史、亲缘关系远近及物种形成，佐证了传统鱼类分类学，丰富了现代分子生物学。但在鱼类mtDNA全序列测定方面尚待探讨，如果进行这些方面的研究，将逐步探索出mtDNA各基因在生命功能中的作用，完善鱼类mtDNA分类。在实验动物学和环境保护方面还有待开展这方面的研究。mtDNA与疾病方面人类方面已有了研究[9,10]，鱼类方面尚未有人探讨。总之，随着技术不断进步和完善，利用其它生物领域技术和化学物理方法，广泛开展鱼类mtDNA研究及应用，将大大丰富鱼类分子遗传学内容。

参 考 文 献

〔1〕王钢锋，吴乃虎：1991。鲤鱼线粒体URFA6L基因和$tRNA^{Lys}$基因的结构分析。中国科学（B辑），6：609-614。

〔2〕王　静：1984。线粒体的遗传装置。国外医学分子生物学分册，6（4）：169-175。

〔3〕冯国宏等：1991。玉米黑粉菌mtDNA研究。DNA克隆和基因图谱。遗传学报，18（4）：378-384。

〔4〕陈建敏：1992。线粒体DNA突变与人类疾病。国外医学遗传学分册，1：14-19。

〔5〕张四明，龙华：1991。乌鳢线粒体DNA限制性内切酶酶切分析。淡水渔业，4：38-39。

〔6〕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。

〔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〕张亚平等：1991。两种锦鸡和环颈雉线粒体DNA（mtDNA）的比较研究。动物学研究，12（4）：387-392。

〔9〕张志平等，1991。线粒体病的分子遗传学研究。国外医学遗传学分册，1：1-4。

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.com.cn

〔10〕张志平等，1992。Leber氏病的mtDNA突变。遗传，14（2）：21-23。
〔11〕贺林等，1988。中国人线粒体DNA的八种限制酶图及其电镜结构。遗传学报，15（3）：215-222。
〔12〕姜勇、张兴忠，1993。线粒体DNA分析技术在鱼类群体遗传学研究中的应用。淡水渔业，23（3）：40-43。
〔13〕比尔，G.H.，诺乐斯，J.K.C.1984。核外遗传学，9-55。科学出版社。
〔14〕Billington, N. And P D. N. Hebert. 1988. Mitochondrial DNA variation in Great Lakes Walleye(*Stizostedion vitreum*) Populations. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 45:645-654.
〔15〕Carter, R. E. et al. 1991. The application of DNA fingerprinting in the analysis of gynogenesis in tilapia. Aquat. 95:41-52.
〔16〕Ferguson, M. M. et al. 1993. Mitochondrial DNA and allozyme variation in Ontario Cultured rainbow trout spawning in different seasons. Aquat. 117:237-259.
〔17〕Funkensten, B. et al. 1990. Restrction site polymorphism of mitochondrial DNA fo the gilthead sea bream(*Sparus aurata*) broodstock in Eilat, Israel. Aquat. 89:217-223.
〔18〕Hallerman, E. M. et al. 1988. DNA-level Polymorphism as a Tool in Fisheries Science. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 45:645-654.
〔19〕Harris, A. S. et al. 1991. DNA fingerprinting of tilapia, *Oreochromis niloticus*, and its application to aquaculture genetics. Aquat. 92:157-163.
〔20〕McVergh, H. P. et al. 1991. Polymerase chain reaction / direct sequence analysis of the cytochrome b gene in *Salmo salar* Aquat. 95:225-233.
〔21〕Palva, T. K. et al. 1987. Restriction site Polymorphism in Mitochondrial NDA fo Rainbow Trout, *Salmo gairdneri* Richardson, Stocks in FInland. Aquat. 67:283-389.
〔22〕Stoneking, M et al. 1990. Geographic Variation in Human Mitochondrial DNA form Papua New Gaines. The Genetics Society of America. 717-737.

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.com.cn