第20卷 第4期
1996年 12月

水 生 生 物 学 报
ACTA HYDROBIOLOGICA SINICA

Vol.20, No.4
Dec., 1996

# 大鳞副泥鳅线粒体 DNA 九种限制性内切酶酶切图谱*

宋 平 李小迎 熊全沫

(武汉大学生命科学学院,430072)

**提 要**

大鳞副泥鳅 mtDNA 经 11 种限制性内切酶(BamH I, Bgl I, Bgl II, EcoR I, Hpa I, Kpn I, Pst I, Sac I, Sal I, Xba I 和 Xho I)单酶完全酶解获得 23 个酶切位点,这些酶酶切位点数依次分别是:2、7、0、3、3、0、3、1、1、2 和 1。通过琼脂糖凝胶电泳测定大鳞副泥鳅 mtDNA 平均分子量为 $10.33\pm0.22\times10^6$u(原子质量);其分子长约 16720±350 碱基对(bp)。采用双酶完全酶解法构建了大鳞副泥鳅 mtDNA 限制性内切酶酶切图谱。

**关键词** 大鳞副泥鳅,mtDNA,限制性内切酶图谱

动物线粒体 DNA(mitochondrial DNA,简称 mtDNA)分子量小,约为 17000 碱基对[1],便于提取与分析;在结构上,mtDNA 基因组具有高度的保守性[2]而其一级结构却具有很大的歧异性[3—5],为探索种内之间的系统进化提供了比较资料;在遗传上,mtDNA 具有母性遗传特点[6],一个个体便代表了一个母系群体,便于取材;实验条件要求不高,实验结果稳定可靠。由于上述特点,使得 mtDNA 在动物的种群遗传学,进化遗传学和分类学等方面得到广泛应用[7]。

大鳞副泥鳅(*Paramisgurnus dabryanus* Sauvage)广泛分布于长江中下游淡水水域、出水后不易死亡便于运输。为开展大鳞副泥鳅的种群进化及其 mtDNA 多态性与地理分布关系的研究提供基础资料,作者构建了大鳞副泥鳅 mtDNA 限制性内切酶酶切图谱。

## 1 材料与方法

**1.1 材料与试剂** 实验用大鳞副泥鳅购自武汉市水果湖市场。限制性内切酶为华美生物工程公司出品。其它试剂与仪器均系国产产品。

**1.2 mtDNA 的提取** 取出大鳞副泥鳅的卵巢按 1∶20 的重量体积比加入 STE 缓冲液(0.25mol/L 蔗糖,0.01mol/L Tris · HCl,0.001mol/L EDTA, pH8.0),用 DS200 高速组织捣碎器匀浆(慢挡)。匀浆液用 1000r/min(4℃)离心 15min,去沉淀,上清以

* 本工作得到国家自然科学基金(3880637)的资助。
1994 年 5 月 25 日收到;1996 年 7 月 30 日修回。

15000r／min(4℃)离心 30min。沉淀悬浮于适量的缓冲液 B(0.25mol／L 蔗糖，0.05mol／L Tris · HCl, 0.007mol／L $MgCl_2$, pH7.5)中，以 15000r／min(4℃)离心 30min，重复一次。沉淀再悬浮于缓冲液 B 中加入 DNase I 至终浓度 50ug／ml，25℃反应 30min 水浴冷却，加入 DNase I 反应终止液(0.25mol／L 蔗糖，0.1mol／L EDTA，pH8.0)，15000r／min，(4℃)离心 30min，其沉淀即为线粒体。

将线粒体悬浮于缓冲液 C(0.05mol／L Tris · HCl, 0.1mol／L NaCl, 0.01mol／L EDTA, pH8.5)，加入 SDS 至终浓度 1%，37℃水浴保温 15min，水浴冷却。加入等体积苯酚／氯仿／异戊醇(25／24／1)反复抽提至两相界面无蛋白为止。水相加入氯仿／异戊醇(24／1)抽提二次。上述水相加入 0.2 倍体积的 1mol／L NaAc 混匀，再加入 2 倍体积的无水乙醇−38℃过夜，15000r／min(4℃)离心 30min，沉淀 mtDNA(粗品)真空干燥后溶于缓冲液 TE(0.01mol／L Tris · HCl, 0.001mol／L EDTA, pH8.0)。

**1.3 mtDNA 的纯化** 大鳞副泥鳅 mtDNA 纯化采用 Sepharose 4B 凝胶过滤法，其方法基本上按照贺林等人[8]的方法。

**1.4 限制性内切酶对 mtDNA 的酶解反应** 单酶完全酶解反应总体积 30ul，含适量的 mtDNA 和酶量，37℃保温 2h。双酶完全酶解 mtDNA 的条件同单酶酶解，总体积 40ul，37℃保温 3h，65℃，10min 后立即置冰浴中以终止反应。

**1.5 mtDNA 酶解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%，溴化乙锭含量为 5ug／ml，50V，4℃下电泳 10h，紫外检测仪下观察拍照。分子量测定用 λ−DNA／EcoR I · Hind III 完全酶解片段为 DNA 分子量标准。据标准片段的相对迁移率的倒数与分子量的对数绘制标准曲线，计算出各个酶切片段的分子量。

## 2 结果与讨论

### 2.1 mtDNA 单酶完全酶解片段大小(图 1，表 1)

用加大酶量和反应时间及配合双酶解法多次证明：Bgl II, Kpn I 对大鳞副泥鳅 mtDNA 均无切点。

因 mtDNA 是来自于多条鱼，存在 mtDNA 多态现象。为排除部分酶解的可能性，采用适当加大酶量和反应时间而获得完全酶解的 mtDNA 片段，经 λ−DNA／EcoR I · Hind III 完全酶解片段 DNA 为分子量标准，计算出单酶完全酶解 mtDNA 片段的分子量及分子大小。大鳞副泥鳅 mtDNA 平均分子量为 $10.33 \pm 0.22 \times 10^6$u(原子质量)平均分子长约 16720±350 碱基对(bp)。

根据对单酶完全酶解的大鳞副泥鳅 mtDNA 电泳图谱分析，其 mtDNA 酶切带存在两种类型的多态现象，这两种类型带的明暗和 DNA 含量差别很大，表明所提取样品中具有这两种类型 mtDNA 的量差别较大；采用控制上样量等方法很易突出主要类型 mtDNA 酶切带(图 1)。本文只分析其中主要酶切类型带即很明亮的带。其多态现象及意义有待进一步研究。

图中 Sal I 酶解电泳带因样品孔稍后而与 Xho I 和 Sac I 的酶解电泳带的迁移距离稍有差别；它们的迁移率经多次电泳证实相同。

表 1　单酶完全酶解 mtDNA 片段的分子量

Tab.1　Molecular weights of the restriction fragments of mtDNA by single enzyme digestion

| 酶 Enzyme | 片段 Fragment | 分子量(u, $\times 10^6$) Molecular weight | 大小 Size (Kb) |
|---|---|---|---|
| BamH I | A | 1.16 | 1.88 |
| | B | 8.89 | 14.39 |
| | Total | 10.05 | 16.27 |
| Bgl I | A | 0.29 | 0.47 |
| | B | 0.64 | 1.03 |
| | C | 0.72 | 1.17 |
| | D | 0.75 | 1.21 |
| | E | 0.75 | 1.21 |
| | F | 2.30 | 3.72 |
| | G | 4.61 | 7.46 |
| | Total | 10.06 | 16.27 |
| EcoR I | A | 0.46 | 0.74 |
| | B | 2.25 | 3.64 |
| | C | 7.55 | 12.21 |
| | Total | 10.26 | 16.59 |
| Hpa I | A | 1.26 | 2.04 |
| | B | 1.41 | 2.28 |
| | C | 7.86 | 12.71 |
| | Total | 10.53 | 17.03 |
| Pst I | A | 2.13 | 3.45 |
| | B | 3.29 | 5.33 |
| | C | 5.19 | 8.40 |
| | Total | 10.61 | 17.18 |
| Sac I | A | 10.29 | 16.65 |
| Sal I | A | 10.29 | 16.65 |
| Xba I | A | 5.20 | 8.42 |
| | B | 5.42 | 8.77 |
| | Total | 10.62 | 17.19 |
| Xho I | A | 10.29 | 16.65 |

注:本文计算单位换算采用 1Kb = $6.178 \times 10^5$u(原子质量)

Bgl I 完全酶解电泳图谱带共有 6 条,其中第 3 条带即 1.21Kb 片段很明亮,根据与相邻片段明暗比较其应包含 2 套 1.21Kb 片段,在 Bgl I 双酶解中或其它的酶解中也见到类似的情况。

**2.2　mtDNA 双酶解完全酶解片段大小**(图 1、2 及表 2)

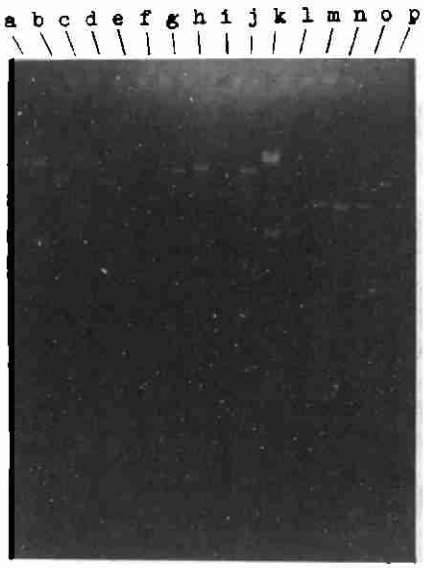


图 1 单酶完全酶解和双酶完全酶解 mtDNA 片段电泳图

Fig.1 Agarose gel electrophoresis pattern of restriction digests of mtDNA

a.&k. λ / EcoR I · Hind III b. BamH I c. Bgl I d. EcoR I e. Hpa I f. Pst I g. Sac I h. Sal I i. Xba I j. Xho I k l. Pst I / Bgl I m. Xho I / Bgl I n. Sal I / Bgl I o. BamH I / Bgl I p. Xho I / Sal I

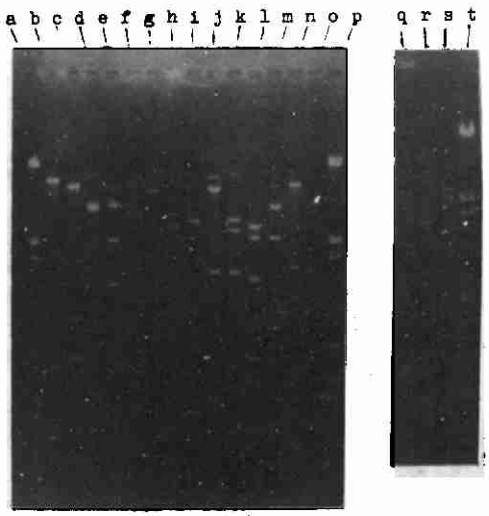


图 2 双酶完全酶解 mtDNA 片段的电泳图

Fig.2 Agarose gel electrophoresis pattern of restriction digests of mtDNA

a.p.t. λ / EcoR I · Hind III b. Sal I / BamH I c. Xho I / BamH I d. Sal I / Xba I e. Xho I / Xba I f. Sac I / Hpa I g. Sal I / Hpa I h. Xho I / Hpa I i.Bgl I / EcoR I j. Sal I / EcoR I k. Xho I / EcoR I l. Sal I / Pst I m. Xho I / Pst I n. Sal I / Sac I o. Xho I / Sac I p. q. Bgl I / Hpa I r. Bgl I / Sac I s. Pst I / Sac I t.

表 2 双酶完全酶解 mtDNA 片段的分子量[注]

Tab.2 Molecular weights of the restriction fragments of mtDNA digested by double enzymes

| 酶 Enzyme | 片 段 Fragment | 分子量(u, $\times 10^6$) Molecular weight | 大 小 Size (Kb) |
|---|---|---|---|
| Xho I / Sal I | A | 2.59 | 4.19 |
| | B | 7.42 | 12.01 |
| | Total | 10.01 | 16.20 |
| Xho I / Sac I | A | 5.13 | 8.30 |
| | B | 5.13 | 8.30 |
| | Total | 10.26 | 16.60 |
| Sal I / Sac I | A | 2.43 | 3.93 |
| | B | 7.60 | 12.29 |
| | Total | 10.03 | 16.22 |

续表 2

| 酶 Enzyme | 片段 Fragment | 分子量(u, $\times 10^6$) Molecular weight | 大小 Size (Kb) |
|---|---|---|---|
| Xho I / Pst I | A | 0.71 | 1.15 |
| | B | 1.41 | 2.28 |
| | C | 3.20 | 5.17 |
| | D | 4.81 | 7.79 |
| | Total | 10.13 | 16.39 |
| Sal I / Pst I | A | 1.14 | 1.85 |
| | B | 2.10 | 3.40 |
| | C | 3.20 | 5.17 |
| | D | 3.63 | 5.88 |
| | Total | 10.07 | 16.30 |
| Xho I / EcoR I | A | 0.46 | 0.74 |
| | B | 2.25 | 3.64 |
| | C | 3.53 | 5.71 |
| | D | 4.06 | 6.57 |
| | Total | 10.30 | 16.66 |
| Sal I / EcoR I | A | 0.46 | 0.74 |
| | B | 0.82 | 1.33 |
| | C | 2.25 | 3.64 |
| | D | 6.70 | 10.84 |
| | Total | 10.23 | 16.55 |
| Bgl I / EcoR I | A | 0.29 | 0.47 |
| | B | 0.46 | 0.74 |
| | C | 0.64 | 1.03 |
| | D | 0.68 | 1.10 |
| | E | 0.72 | 1.17 |
| | F | 0.75 | 1.21 |
| | G | 0.75 | 1.21 |
| | H | 0.82 | 1.33 |
| | I | 1.24 | 2.00 |
| | J | 4.02 | 6.50 |
| | Total | 10.37 | 16.76 |
| Xho I / Hpa I | A | 1.26 | 2.04 |
| | B | 1.41 | 2.28 |
| | C | 3.58 | 5.80 |
| | D | 4.23 | 6.85 |
| | Total | 10.48 | 16.97 |

续表 2

| 酶<br>Enzyme | 片 段<br>Fragment | 分子量(u, $\times 10^6$)<br>Molecular weight | 大 小<br>Size (Kb) |
|---|---|---|---|
| Sal I / Hpa I | A | 1.26 | 2.04 |
| | B | 1.31 | 2.12 |
| | C | 1.41 | 2.28 |
| | D | 6.51 | 10.54 |
| | Total | 10.49 | 16.98 |
| Sac I / Hpa I | A | 0.33 | 0.54 |
| | B | 1.04 | 1.69 |
| | C | 1.41 | 2.28 |
| | D | 8.11 | 13.13 |
| | Total | 10.89 | 17.64 |
| Xho I / Xba I | A | 2.00 | 3.23 |
| | B | 3.16 | 5.12 |
| | C | 5.11 | 8.27 |
| | Total | 10.27 | 16.62 |
| Sal I / Xba I | A | 0.49 | 0.80 |
| | B | 4.77 | 7.71 |
| | C | 5.11 | 8.27 |
| | Total | 10.37 | 16.78 |
| Xho I / BamH I | A | 1.16 | 1.88 |
| | B | 1.51 | 2.44 |
| | C | 7.42 | 12.01 |
| | Total | 10.09 | 16.33 |
| Sal I / BamH I | A | 0.08 | 0.13 |
| | B | 1.06 | 1.72 |
| | C | 8.86 | 14.33 |
| | Total | 10.00 | 16.18 |
| Xho I / Bgl I | A | 0.12 | 0.20 |
| | B | 0.17 | 0.27 |
| | C | 0.64 | 1.03 |
| | D | 0.72 | 1.17 |
| | E | 0.75 | 1.21 |
| | F | 0.75 | 1.21 |
| | G | 2.30 | 3.72 |
| | H | 4.61 | 7.46 |
| | Total | 10.06 | 16.27 |

续表 2

| 酶<br>Enzyme | 片 段<br>Fragment | 分子量(u, $\times 10^6$)<br>Molecular weight | 大 小<br>Size (Kb) |
|---|---|---|---|
| Sal I / Bgl I | A | 0.29 | 0.47 |
| | B | 0.39 | 0.63 |
| | C | 0.64 | 1.03 |
| | D | 0.72 | 1.17 |
| | E | 0.75 | 1.21 |
| | F | 0.75 | 1.21 |
| | G | 1.84 | 2.98 |
| | H | 4.61 | 7.46 |
| | Total | 9.99 | 16.16 |
| BamH I / Bgl I | A | 0.10 | 0.16 |
| | B | 0.29 | 0.47 |
| | C | 0.49 | 0.80 |
| | D | 0.64 | 1.03 |
| | E | 0.65 | 1.05 |
| | F | 0.75 | 1.21 |
| | G | 0.72 | 1.17 |
| | H | 1.77 | 2.86 |
| | I | 4.61 | 7.46 |
| | Total | 10.02 | 16.21 |
| Pst I / Bgl I | A | 0.27 | 0.44 |
| | B | 0.28 | 0.46 |
| | C | 0.29 | 0.47 |
| | D | 0.48 | 0.77 |
| | E | 0.64 | 1.03 |
| | F | 0.72 | 1.17 |
| | G | 0.75 | 1.21 |
| | H | 0.88 | 1.42 |
| | I | 2.30 | 3.72 |
| | J | 3.20 | 5.17 |
| | Total | 9.81 | 15.86 |
| Bgl I / Sac I | A | 0.29 | 0.47 |
| | B | 0.31 | 0.50 |
| | C | 0.44 | 0.71 |
| | D | 0.64 | 1.03 |
| | E | 0.72 | 1.17 |

续表 2

| 酶 Enzyme | 片段 Fragment | 分子量(u, $\times 10^6$) Molecular weight | 大小 Size (Kb) |
|---|---|---|---|
| Bgl I / Sac I | F | 0.75 | 1.21 |
| | G | 2.30 | 3.72 |
| | H | 4.61 | 7.46 |
| | Total | 10.06 | 16.27 |
| Bgl I / Hpa I | A | 0.10 | 0.16 |
| | B | 0.29 | 0.47 |
| | C | 0.64 | 1.03 |
| | D | 0.64 | 1.03 |
| | E | 0.65 | 1.05 |
| | F | 0.72 | 1.17 |
| | G | 0.75 | 1.21 |
| | H | 1.27 | 2.06 |
| | I | 1.67 | 2.70 |
| | J | 3.26 | 5.28 |
| | Total | 9.99 | 16.16 |

注：数字下有横线的指推算出的分子量。

Xho I / Sac I 双酶解中，在电泳图谱中可见一条明带和一条暗带，它们的分子量分别为 8.30Kb 和 7.56Kb，还有一条 0.85Kb 带因上样量不够看不清楚。这三条带包含两种酶切类型：A，8.30Kb×2；B，8.30Kb，7.45Kb，0.85Kb。Sal I / Sac I 双酶解中有两条明亮带 12.29Kb、3.93Kb 和一条暗带 3.08Kb，还有一条 0.85Kb 带因上样量不够看不见。这四条带包含两种酶切类型：A，12.29Kb，3.93Kb；B，12.29Kb，3.08Kb，0.85Kb。这里的 B 型中 7.45Kb(3.08Kb)和 0.85Kb 是由 8.30Kb(3.93Kb)片段增加了一个 Sac I 的酶切位点而来。这两种酶切类型的 mtDNA 量所含的比例不同(A 型多于 B 型)，在分析时是很易区分的。其它的双酶解：Sac I / Pst I，Sac I / Hpa I 和 Sac I / Bgl I 等也证实了这一点。

### 2.3 mtDNA 限制性内切酶酶切图谱

以单酶完全酶解定切点数。Xho I 和 Sal I 均为一个切点，以 Xho I 的切点定为零点，以 Xho I→Sal I 近点方向为基因排列方向即顺时针方向，并以 Xho I 与有关酶的双酶解定切点间的距离，以 Sal I 与有关酶的双酶完全酶解同时配合其它酶的双酶完全酶解来确定同一种酶酶切位点间的相对位置。例如：EcoR I 单酶完全酶解得三个片段：0.74Kb，3.64Kb 和 12.21Kb。Xho I / EcoR I 双酶完全酶解得四个片段：0.74Kb，3.64Kb，5.57Kb 和 6.57Kb，表明 Xho I 切点在 12.21Kb 上将其一分为：(5.57Kb+6.57Kb=12.21Kb；因电泳技术原因，相同大小片段在同一个胶板上电泳测量有误差，在不同胶板上表现出的误差则更大一些；片段分子量越大则误差越大，重复性越不好)，表明 5.57Kb 和 6.57Kb 在线形图谱的两端。Sal I / EcoR I 双酶完全酶解得四个片段：0.74Kb，

3.64Kb, 1.33Kb 和 10.84Kb。1.33Kb 和 10.84Kb 是 Sal I 将 12.21Kb 酶解所得。据计算: Sal I 的 4.19Kb 与 5.57Kb 之差为 1.38Kb(接近 1.33Kb)而 4.19Kb 与 6.57Kb 之差为 2.38Kb,显然 Sal I 切点是在 5.57Kb 上,即 5.57Kb 在线形图谱的前部,从而有 5.57Kb-(0.74Kb; 3.64Kb)-6.57Kb 排列。0.74Kb 与 3.64Kb 的先后位置由 EcoR I / Bgl I 双酶完全酶解来确定;在其双酶解中,EcoR I 的 0.74Kb 得到保留而 3.64Kb 等其它片段被 Bgl I 切点所切。将 Bgl I 的酶切片段顺序: 0.2Kb-1.17Kb-1.21Kb-1.03Kb-3.72Kb-1.21Kb-7.46Kb-0.27Kb 与 EcoR I 的酶切片段 5.57Kb-(10.74Kb; 3.64Kb)-6.57Kb 相比较与计算证实: Bgl I(7-6)和(7-5)两个位点恰好落在 EcoR I 3.64Kb 上,将 3.64Kb 酶解成三个小片段;而 EcoR I(3-1)与(3-2)两个位点恰好落在 Bgl I 的 3.72Kb 上将其一分为三,从而证明 EcoR I 的酶切片段顺序为 5.57Kb-0.74Kb-3.64Kb-6.57Kb(图 3)。

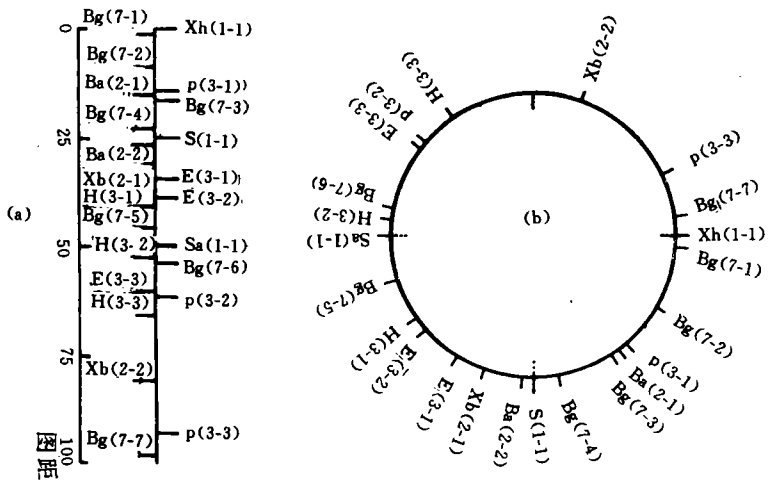


图 3　大鳞副泥鳅 mtDNA 的限制酶图谱

Fig.3　The restriction map of mtDNA

(a) 线形图谱 linear form;　(b) 环形图谱 circular form

注: 1. Xh-Xho I; S-Sal I; P-Pst I; E-EcoR I; Xb-Xba I; Ba-BamH I; H-HpaI; Bg-Bgl I; Sa-Sac I.

2. Bgl I(7-1)中的"7"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。

对于两种酶间的两个相邻酶切位点间的相对位置与距离,除了本文已列出的有关双酶切来确定外,还补加了 1 对以上的有关双酶切以进一步确证。(这些双酶解的资料本文未列出)。例如 Hpa I(3-1)与 EcoR I(3-2)两位点的先后,通过 Hpa I / EcoR I 的双酶切证实 EcoR I 的 0.74Kb 片段未被 Hpa I(3-1)切点所切,对比两种酶切点顺序看出 EcoR I(3-2)切点在 Hpa I(3-1)切点之前,其相差的距离约为 0.2Kb。

大鳞副泥鳅 mtDNA9 种限制性内切酶的 23 个酶切位点的酶切图谱见图 3。从其酶切位点分布看 65%的位点分布在 0—50 的图距范围内,其酶切位点分布在线粒体基因组中是非随机的,这种情况在鲢鳙鱼[9]及其它动物的 mtDNA 中也可看到[10—12],其包含的

意义有待于进一步研究。

## 参 考 文 献

[1] Lansman R A, et al. The use of restriction endonucleases to measure mitochondrial DNA sequence relatedness in natural population. *J. Mol. Evol.*, 1981, **17**: 214—226.
[2] Brown W M. Evolution of animal mitochondrial DNA. In: Evolution of genes and proteins, Edited by M Nei and R K Koehn. Sinauer Associates, Sunderland, Massachuaetts. 1983. 62—88.
[3] 王钢锋等。鲤鱼线粒体URFA6L基因和tRNAlys基因的结构分析。中国科学(B), 1991, **21**(6): 609—614.
[4] 兰 宏等。麂属Muntiacus动物线粒体DNA多态性及其遗传分化。中国科学(B), 1993, **23**(5): 469—497.
[5] Brown W M, Polymorphism in mitochondrial DNA of humans as revealed by restriction endonuclease analysis. *PNAS USA*, 1980, **77**:3605—3609.
[6] Gyllensten V, et al. Introgression between two cutthroat trout subspecies with substantial Karyotypic, nuclear and mitochondrial genomic divergence. *Genetics*, 1985, **111**: 905—915.
[7] 张四明等。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, 1992, **16**(2): 120—129.
[8] 贺林等。纯化和鉴别人胎盘线粒体的简易方法。遗传与疾病, 1986, **3**(3): 188—190.
[9] 宋平等。鲢鳙线粒体DNA的九种限制性内切酶酶切图谱的比较。水产学报, 1994, **18**(3): 221—230.
[10] 劳为德等。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, 1981, **13**(2): 175—183.
[11] 张亚平等。蜂猴和树鼩mtDNA10种限制酶酶切图谱。动物学研究, 1989, **10**: 78—89.
[12] 张亚平等。大熊猫线粒体DNA的九种限制酶图谱。动物学研究, 1991, **12**(2): 209—214.

# A MAP OF 9 RESTRICTION ENDONUCLEASES OF mtDNA OF *PARAMISGURNUS DABRYANUS* SAUVAGE

Song Ping, Li Xiaoying and Xiong Quanwei
(*College of Life Sciences, Wuhan University* 430072)

**Abstract**

The mitochondrial DNA (mtDNA) of *P. dabryanus* Günther was digested by 11 restriction endonucleases, viz. BamH I, Bgl I, Bgl II, EcoR I, Hpa I, Kpn I, Pst I, Sac I, Sal I, Xba I, Xho I into different fragments: 2, 7, 0, 3, 3, 0, 3, 1, 1, 2, 1 respectively. As estimated by using agarose gel electrphoresis, the size of mtDNA for *P. dabryanus* is 16720 350bp. Comparing the double restriction fragments with standard molecular weight of Mark (EcoR I and Hind III digested λDNA), we constructed the physical map of the enzymes.

**Key words** Mitochondrial DNA, Restriction endonuclease, *Paramisgurnus dabryanus*