

胡子鲇 mtDNA 多态性及限制性酶切图谱*

戴建华 殷文莉 杨代淑 熊全沫

(武汉大学生命科学院, 430072)

提 要

用 8 种限制性内切酶对胡子鲇 (*Clarias fuscus Lacepede*) 肝脏线粒体 DNA (Mitochondrial DNA, mtDNA) 进行了分析。Xho I、EcoR I、Pst I、BamH I、Xba I、HindIII 在 mtDNA 分子上分别有 2、3、1、1、3 和 5 个切点。胡子鲇种内存在 mtDNA 酶切片段长度多态性 (Restriction fragment length polymorphisms, RFLP)。经 Bgl I、Bgl II 酶解, mtDNA 都出现两种酶切类型, I 型各具 2 个片段, II 型各具 1 个片段。mtDNA 分子量为 10.242×10^6 u, 长度约为 16.68 kb。用双酶解法建立了胡子鲇 mtDNA 的限制性酶切图谱, 并对 RFLP 现象进行了分析。

关键词 胡子鲇, mtDNA, RFLP, 酶切图谱

分子遗传学研究发现, 线粒体遗传是受两套遗传系统控制的。线粒体基因组结构比较简单, 但具有自主的复制与表达能力, 其遗传方式为母性遗传^[1, 2]。线粒体基因组是研究真核基因组织结构、功能以及进化的良好模型^[3, 4]。高等动物 mtDNA 为共价闭合的环状双链分子, 其分子量约为 10×10^6 u, 长度一般在 16—19 kb 之间^[5]。但不同种的动物以及同种内的不同遗传种群的个体之间一级结构存在着大量的分歧, 有的甚至表现为 mtDNA 长度的变化^[6]。这种特征已被应用于动物种群、分子进化遗传学以及分子地理学方面的研究^[7, 8]。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。

目前对于鱼类 mtDNA 酶切图谱的研究不多, 且选用内切酶较少^[9, 10]。有关胡子鲇 mtDNA 的研究尚未见报道。本文应用 8 种酶建立了胡子鲇 mtDNA 的酶切图谱, 并对出现的 RFLP 现象进行了分析。

1 材料和方法

1.1 实验材料 胡子鲇购自武汉市大东门集贸市场。DNase I、RNase、EcoR I、

* 本文是国家自然科学基金资助项目的一部分。

戴建华现在湖北师范学院生物系, 435002。

1993 年 2 月 11 日收到; 1996 年 1 月 22 日修回。

HindⅢ、Pst I、Bgl I、BamH I、Xba I 及 Xho I 均购自华美生物工程公司, BglⅡ为 Promega 公司产品。

1.2 线粒体 DNA 的分离纯化 采用差速离心法制备肝线粒体。用 DNase I 处理, 除去核 DNA, 经差速离心得到纯净的线粒体。加 SDS 破膜, 用饱和酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)抽提去蛋白, 乙醇沉淀得 mtDNA 粗品。用 RNase 处理后饱和酚/氯仿/异戊醇及氯仿/异戊醇抽提, 上清液用乙醇沉淀, 即得纯净的 mtDNA。

1.3 酶解及电泳 酶解条件参照 Promega Corporation 提供的反应体系。琼脂糖凝胶电泳缓冲系统为 TBE 电泳液。

2 结果

2.1 线粒体 DNA 酶切产物的测定

单酶切电泳图谱及片段大小(图版 I:1, 表 1)表明 BamH I、Pst I、EcoR I、HindⅢ、Xba I、Xho I 在胡子鲇肝 mtDNA 分子上分别具有 1、1、3、5、3 和 2 个切点, Bgl I、BglⅡ酶解胡子鲇肝 mtDNA 均具有酶切片段长度多态性。经 Bgl I、BglⅡ酶解, mtDNA 分别出现 2 种类型, I 型各具有 2 个片段, Ⅱ型各具有 1 个片段。双酶切电泳图谱及片段大小见图版 I:2—5 和表 2。

表 1 胡子鲇 mtDNA 单酶切片段
Tab.1 MtDNA restriction fragments from *C. fuscus* digested with single enzyme

酶 Enzyme	类型 Type	片段大小、Fragment Size (kb)					总计 Total
		A	B	C	D	E	
Xho I		14.214	2.470				16.684
BglⅡ	I	13.619	3.065				16.684
	Ⅱ	16.686					16.686
HindⅢ		8.689	4.748	1.471	1.094	0.682	16.685
BamH I		16.686					16.686
Pst I		16.686					16.686
Xba I		7.185	6.081	3.419			16.685
Bgl I	I		14.974	1.715			16.689
	Ⅱ	16.686					16.686
EcoR I		11.995	3.841	0.844			16.680

2.2 胡子鲇 mtDNA 酶切图谱的构建

以 Pst I 在胡子鲇 mtDNA 上的唯一切点作为基因组的零点(0 kb 处), 取 Pst I / Xho I—2—1—3 方向为基因组的顺时针方向。根据 Pst I / Xho I 双酶切结果可以确定 Xho I 2 个切点的位置在 10.278kb 处和 12.748kb 处。

根据 BamH I / Xho I、BamH I / Pst I 双酶切结果可以确定 BamH I 切点在 13.337kb 处。同理, 可以确定 EcoR I 3 个切点的位置分别在 0.242kb、4.083kb、16.078kb 处, 3 个片段的顺序为 EcoR I—C—B—A。Xba I 3 个切点的位置分别在

表 2 胡子鲇 mtDNA 双酶切片段

Tab.2 MtDNA restriction fragments from *C. fuscus* digested with double enzyme

酶 Enzyme	类型 Type	片段大小 Fragment Size (kb)								总 计 Total
		1	2	3	4	5	6	7	8	
Pst I / Xho I		10.278	3.937	2.474						16.689
Pst I / HindIII		8.689	4.631	1.471	1.094	0.682	0.387*			16.689
Pst I / BamH I		13.337	3.361							16.698
Pst I / Bgl I	I		11.210	3.760	1.714					16.684
	II	12.936		3.760						16.696
Pst I / EcoR I		11.995	3.841	0.602	0.242*					16.680
Pst I / Bgl II	I	10.239		3.380	3.065					16.684
	II	10.239	6.441							16.680
BamH I / Xho I		13.628	2.470	0.586*						16.684
BamH I / HindIII		8.699	3.750	1.442	1.081	1.035	0.682			16.689
BamH I / Xba I		7.198	6.061	3.181	0.238*					16.678
EcoR I / Xba I		6.061	3.849	3.012	2.919	0.437*	0.407*			16.685
EcoR I / Xho I		6.221	3.869	3.303	2.470	0.836				16.699
EcoR I / HindIII		8.200	3.757	1.471	1.094	0.846	0.682	0.49*	0.145*	16.685
EcoR I / BamH I		9.280	3.869	2.706	0.834					16.689
EcoR I / Bgl I	I		7.124	3.837	3.155	1.719	0.844			16.682
	II	8.841		3.837	3.155		0.844			16.677
Bgl II / Xho I	I		7.322	3.836	3.065	2.470				16.693
	II	10.386		3.836		2.470				16.692
Bgl II / HindIII	I	5.889	4.758	2.816	1.481		0.805	0.682	0.269*	16.699
	II	5.889	4.758	2.816	1.481	1.074		0.682		16.699
Bgl II / BamH I	I		6.876	6.746	3.065					16.687
	II	9.812	6.876							16.688
Bgl II / Bgl I	I		7.149		4.765	3.065	1.715			16.694
	II	10.209		6.486						16.695
Bgl II / EcoR I	I	9.637		3.138	2.353	0.844	0.713			16.685
	II	9.637	3.841		2.353	0.844				16.675
Bgl I / Xba I	I	7.195		4.199	3.419	1.715	0.157*			16.685
	II	7.195	5.914		3.419		0.157*			16.685
Bgl I / Xho I	I	14.041		1.541	0.934	0.173*				16.689
	II	14.041	2.470			0.173*				16.684
Bgl I / HindIII	I		7.624	4.140	1.461	1.084	1.065	0.672	0.672	16.718
	II	8.674		4.140	1.461	1.084		0.672	0.672	16.703
Bgl I / BamH I	I		14.573	1.715	0.401*					16.689
	II	16.285			0.401*					16.686

* 示根据单、双酶切片段大小推算出 Showing estimated according to the size of the fragments digested with single and double enzymes

7.009kb、13.09kb、16.509kb 处。3 个片段的顺序为 Xba I -A-B-C。Hind III 4 个切点的位置分别在 0.387kb、2.540kb、3.634kb、12.323kb 处, 另一切点可能在 1.069kb 或 1.858kb 处。Hind III 酶切片段的顺序为 Hind III-B-C(E)-E(C)-D-A。

Bgl I 酶解胡子鲇 mtDNA 出现酶切片段长度多态性。根据谱带的亮度和分子量大小可以确定其中 I 型分子上具有 2 个切点, 酶切后产生 14.974kb 和 1.715kb 2 个片段; II 型分子上只有 1 个切点, 经 Bgl I 酶解后由环型分子变成线型。在 Bgl I / Pst I 双酶切电泳中可观察到 4 条带, 其中 Bgl I / Pst I-3 为 2 个片段的重合, Bgl I / Pst I-1、3 为 II 型分子的 2 个片段, 2、3、4 为 I 型分子的 3 个片段。根据双酶切结果, Bgl I 在 II 型 mtDNA 分子上的切点可能在 12.936kb 处或 3.760kb 处。Bgl I 在 I 型 mtDNA 分子上产生 A 片段的一个切点可能在 11.210kb 处或 3.760kb 处。在 Bgl I / BamH I 双酶切电泳中可观察到 3 条带, 有 2 个片段跑出胶外未检出, 根据单、双酶切片段分子量差值推知为 0.401kb, 其中 16.285kb 和 0.401kb 为 II 型 mtDNA 分子酶切后产生的片段, 14.573kb、1.715kb 和 0.401kb 为 I 型 mtDNA 分子酶切后产生的片段。可以推测 Bgl I 在 II 型 mtDNA 分子上的切点可能在 12.936kb 处, 正好与前面推论吻合。同样可以推测 Bgl I 在 I 型 mtDNA 上产生 A 片段的 1 个切点可能在 11.221kb 处, 这与前面推论结果相符。因此可以确定 Bgl I 在胡子鲇 mtDNA 分子上的切点位置: I 型在 11.221kb 处和 12.936kb 处; II 型在 12.936kb 处。

Bgl II 酶解胡子鲇 mtDNA 也具有酶切片段长度多态性现象。同样可以确定 Bgl II 在 II 型 mtDNA 分子上的切点在 6.445kb 处, 在 I 型 mtDNA 分子上的切点在 3.380kb 处和 6.445kb 处。

胡子鲇 mtDNA 8 种酶的酶切图谱如图 1 所示。

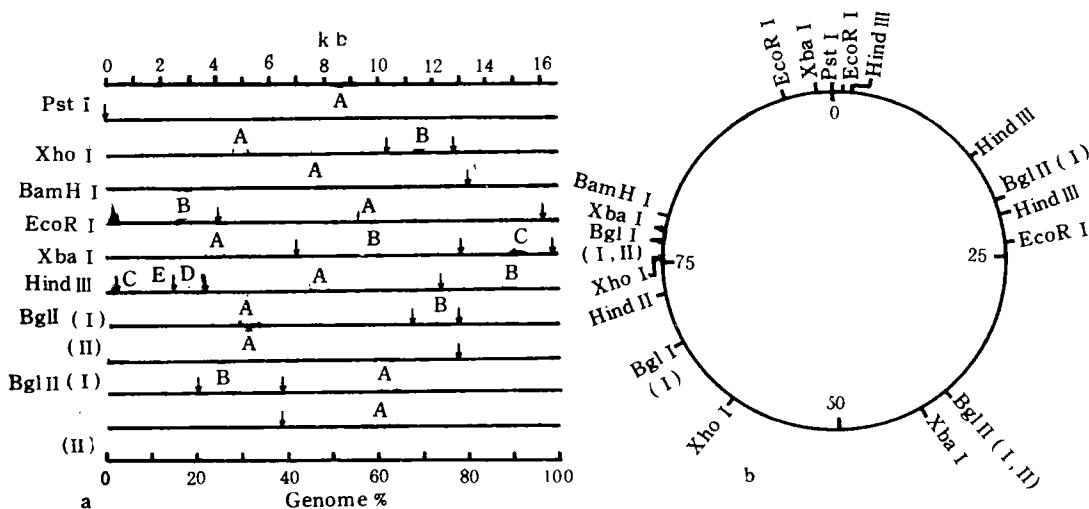


图 1 胡子鲇 mtDNA 酶切图谱

Fig.1 Restriction map of mtDNA from *C. fuscus*

a. 线状 Linear form b. 环状 Circular form

3 讨论

高等动物 mtDNA 的遗传学和分子生物学的比较研究表明,高等动物 rRNA 和 tRNA 基因的分布在动物 mtDNA 上非常相似,几乎所有的动物的 mtDNA 都有编码相同的基因,且排列一致,这说明高等动物 mtDNA 的基因组在进化上是十分保守的。另一方面,mtDNA 核苷酸顺序的进化却是非常迅速的,其进化速度为单拷贝核 DNA 的 5—10 倍。因此,mtDNA 的一级结构存在大量的分歧,这种分歧现象既存在于不同种的动物之间,也存在于同一物种的不同遗传种群之间^[11]。

线粒体 DNA 核苷酸序列常常会发生碱基替换、核苷酸小片段的缺失或添加现象。对某一特定的限制性内切酶而言,以上几种情况均可导致酶切位点的改变,从而出现酶切片段长度多态现象。RFLP 一般可分为单碱基突变型和顺序重排型两种。前者是由于某一限制性内切酶识别位点上发生单个碱基替换而造成该识别位点的丢失,或者由此形成一个新的限制酶识别位点,绝大多数多态性都属于这种类型。而在顺序重排型突变中,DNA 顺序发生重复、插入和缺失等,导致两个限制酶位点之间的 DNA 顺序长度发生变化,其特点是酶切位点上的碱基无变化,只是酶切位点在基因组中的相对位置发生变化。RFLP 常被应用于下列研究领域:物种起源及其分化、种内及种间的系统发生关系、群体遗传结构以及动物分类等^[12]。

本文实验用肝取自 6 条鱼。用 Bgl I、Bgl II 对胡子鲇 mtDNA 进行酶切分析,均发现存在酶切片段长度多态现象。将具有 2 个切点,产生 2 条片段的 mtDNA 分子称为 I 型,只具有 1 个切点的分子称为 II 型。从电泳图谱中发现,两种类型酶切谱带亮度相近,说明具有两种类型 mtDNA 的鱼数量相近。I 型 mtDNA 于 Bgl I 具有 2 个切点,分别位于 11.221kb 处和 12.936kb 处;II 型 mtDNA 只具有 1 个切点,在 12.936kb 处。推测可能是 I 型 mtDNA 分子在演化过程中发生突变,丢失了在 11.221kb 处的切点,或者是 II 型 mtDNA 分子获得了在 11.221kb 处的切点,该切点位于基因组的 67.25% 处。同样,对于 Bgl II 而言, I 型 mtDNA 具有 2 个切点,分别位于 3.380kb 处和 6.445kb 处;II 型只具有位于 6.445kb 处的 1 个切点。推测可能是 I 型 mtDNA 分子在演化过程中丢失了在 3.380kb 处的切点,或者是 II 型 mtDNA 获得一个新的切点,该切点位于基因组的 20.25% 处。

为了进一步证实胡子鲇 mtDNA 分子具有多态性,将 Bgl I、Bgl II 分别与其它几种酶进行了双酶解,酶解结果都证明胡子鲇 mtDNA 分子一级结构发生了突变,经 Bgl I、Bgl II 酶解具有酶切片段长度多态现象。

参 考 文 献

- [1] Gyllenstein V, et al. Maternal inheritance of mtDNA during backcrossing of two species of mice. *J. Hered.* 1985, 76: 321—324.
- [2] Clayton D A. Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell*, 1982, 28: 693—705.
- [3] Techeschi H. Mitochondria: Structure, Biogenesis and Transducing Function. New York: Springer, 1976.
- [4] Clary D O, et al. The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila yakuba*: nucleotide sequence, gene organization, and genetic code. *J. mol. Evol.*, 1982, 22: 252—271.

- [5] 赵邦梯等. 北京鸭肝脏线粒体DNA的限制酶图谱. 中国科学(B辑), 1983, 3: 213—222.
- [6] Densmore L D, et al. Length variation and heteroplasmy are frequent in mitochondrial DNA from parthenogenetic and bisexual lizards. *Genetics*, 1985, 110: 689—707.
- [7] Vawter L, et al. Nuclear and mitochondrial DNA comparisons reveal extreme rate variation in the molecular clock. *Science*, 1986, 234: 194—196.
- [8] Brown J R, et al. Mitochondrial DNA length variation and heteroplasmy in populations of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). *Genetics*, 1992, 132: 221—228.
- [9] 陈关君等. 鲤鱼、鲫鱼肌细胞线粒体DNA的限制性内切酶酶切图谱比较. 遗传学报, 1984, 11(2): 141—146.
- [10] 吴乃虎等. 草鱼和鲤鱼线粒体DNA的分离纯化及其Col基因的分子克隆. 动物学报, 1991, 37(4): 375—381.
- [11] Potter S S, et al. Specific analysis of mammalian mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1975, 72: 4496—4500.
- [12] 张亚平等. 动物线粒体DNA多态性的研究概况. 动物学研究, 1992, 13(3): 289—298.

POLYMORPHISM AND RESTRICTION MAP OF MITOCHONDRIAL DNA FROM *CLARIAS FUSCUS*

Dai Jianhua, Yin Wenli, Yang Daishu and Xiong Quanwei

(School of Life Science, Wuhan University, 430072)

Abstract

The mtDNA from liver of *Clarias fuscus* has been analysed with 8 kinds of restriction endonucleases. Xho I, EcoR I, Pst I, BamH I, Xba I, Hind III have 2, 3, 1, 1, 3 and 5 sites on this mtDNA, Bgl I and Bgl II have 2 sites on mtDNA (type I), and 1 site on mtDNA (type II). There was length polymorphism in liver mtDNA of *C. fuscus*. Two restriction types were observed, when digested with Bgl I and Bgl II respectively. The molecular weight of *C. fuscus* mtDNA is 10.242×10^6 u, and length is about 16.68 kilobase pairs. The author established the restriction maps of *C. fuscus* mtDNA by double digestion, and analysed the restriction fragment length polymorphisms (RFLP) of liver mtDNA in *C. fuscus*.

Key words *Clarias fuscus*, mtDNA, RFLP, Restriction map

图版说明

图版 I

1. a. λ DNA / EcoR I, b. λ DNA / Hind III, c. Xho I, d. Bgl II, e. Hind III, f. BamH I, g. Pst I, h. Xba I, i. Bgl I, j. EcoR I; 2. a. λ DNA / EcoR I, b. λ DNA / Hind III, c. Pst I / Xho I, d. Pst I / Hind III, e. Pst I / BamH I, f. Pst I / Bgl I, g. Pst I / EcoR I, h. Pst I / Bgl II; 3. b. λ DNA / Hind III, i. BamH I / Xho I, j. BamH I / Hind III, k. BamH I / Xba I, l. EcoR I / Xba I, m. EcoR I / Xho I, n. EcoR I / Hind III, o. EcoR I / BamH I, p. EcoR I / Bgl I; 4. b. λ DNA / Hind III, q. Bgl II / Xho I; 5. b. λ DNA / Hind III, r. Bgl II / Hind III, s. Bgl II / BamH I, t. Bgl II / Bgl I, u. Bgl II / EcoR I, v. Bgl I / Xba I, w. Bgl I / Xho I, x. Bgl I / Hind III, y. Bgl I / BamH I