

文章编号: 1004-7271(2002)01-0014-05

瓯江彩鲤线粒体 DNA 的限制性内切酶分析

王成辉¹, 李思发¹, 徐志彬², 项松平², 王 剑², 段江萍²

(1. 上海水产大学农业部水产增养殖生态、生理重点开放实验室, 上海 200090;

2. 浙江省龙泉市水利水电局, 浙江 龙泉 323700)

摘 要 用 13 种限制性内切酶对瓯江彩鲤的线粒体 DNA (mtDNA) 进行 RFLP 分析, 结果表明 (1) 共产生 18 种限制性态型, 其中 5 种酶产生限制性片段长度多态性 (RFLPs), 归结为 5 种基因单倍型。(2) 瓯江彩鲤 mtDNA 大小为 16.60 ± 0.15 kb, 单倍型间的基因多样性指数和群体核苷酸多样性指数分别为 0.751 7、0.028 6, 遗传多样性较丰富。

关键词 瓯江彩鲤 线粒体 DNA 限制性片段长度多态 遗传多样性

中图分类号 S917 文献标识码: A

Restriction endonuclease analysis of mitochondrial DNA in Oujiang color common carp

WANG Cheng-hui¹, LI Si-fa¹, XU Zhi-bin², XIANG Song-ping², WANG Jian², DUAN Jiang-ping²

(1. Key Laboratory of Ecology and Physiology in Aquaculture Certificated by the Ministry of Agriculture, Shanghai Fisheries

University, Shanghai 200090, China; 2. Longquan Water Conservancy and Hydropower Bureau, Longquan 323700, China)

Abstract RFLP analysis of mtDNA in Oujiang color common carp (*Cyprinus carpio*. var *color*) was conducted by 13 restriction endonucleases. The results indicated that there were 18 restriction morphs and 5 of which were polymorphic and could be sorted into 5 haplotypes. The size of mtDNA is 16.60 ± 0.15 kb, the index of gene diversity among haplotypes is 0.751 7 and the average nucleotide diversity is 0.028 6, which indicated there was abundant genetic diversity in Oujiang color common carp.

Key words Oujiang color common carp; mitochondrial DNA (mtDNA); Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLP); genetic diversity

瓯江彩鲤是分布于浙江省瓯江流域的龙泉、青田等市县的农家养殖对象。它生长迅速, 一龄阶段日增重达 0.8 g/d, 二龄阶段日增重约 5.0 g/d, 经 5-10 月份饲养, 个体均重可达 1 000 g 以上^[1]。瓯江彩鲤除生长性能突出外, 而且体色丰富、艳丽, 有全红、大花、麻花和粉玉等多种体色。瓯江彩鲤在当地虽有 1 200 余年的养殖历史, 但长期处于农户自发性的自繁自养, 缺乏系统选育和资源的开发及利用研究, 遗传多样性的研究至今还是空白, 目前仅见程起群等^[1]对瓯江彩鲤的养殖性能作过报道。

线粒体 DNA 为共价双链闭合环状的核外遗传物质, 结构简单, 不发生重组, 进化速度快, 母性遗传^[2], 是进行动物系统演化和群体遗传结构研究的良好标记。mtDNA 限制性酶切技术目前已在鱼类的种群遗传结构研究中广泛应用^[3-5]。

本研究应用 mtDNA 的 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) 分析技术, 研究瓯江彩鲤线粒体 DNA 的多态性, 旨在为瓯江彩鲤的遗传多样性研究和种质开发利用提供相关资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

瓯江彩鲤 18 尾, 取自浙江省龙泉市瓯江彩鲤原种场。

1.2 mtDNA 的提取

取肝脏或卵巢于玻璃匀浆器中, 加 STE 缓冲液 (250mmol/L 蔗糖, 30mmol/L Tris-HCl, 10mmol/L EDTA, pH8.0) 匀浆。匀浆液于 3000r/min 离心 15min。取上清液于 13000r/min 离心 30min, 弃去上清液, 沉淀线粒体用 TEN 缓冲液 (10mmol/L Tris-HCl, 10mmol/L EDTA, 0.15mmol/L NaCl, pH8.0) 混匀, 加入浓度为 10% 的 NP-40, 轻轻震荡, 充分混匀, 静置 5min; 12000r/min 离心 5min, 取上清液, 按 1:1 比例加入饱和酚, 轻轻震荡混匀 20min; 12000r/min 离心 5min, 取上清液, 同样按 1:1 比例加入饱和酚、氯仿和异戊醇 (25:24:1), 摇匀 10min; 12000r/min 离心 5min, 取上清液, 加入氯仿和异戊醇 (24:1), 轻轻摇匀 5min; 12000r/min 离心 5min, 取水样, 加无水乙醇沉淀 mtDNA, 放入 -20℃ 的冰箱中冷却过夜; 12000r/min 离心 10min, 弃去乙醇, 将 mtDNA 在 37℃ 的烘箱中烘干, 然后用适当 TE 液溶解, 于 4℃ 的冰箱中保存备用。

1.3 限制性内切酶消化和电泳

13 种限制性内切酶 BamHI, EcoRI, EcoRV, HindIII, PstI, SalI (购自华美生物工程有限公司), AvaI, HaeIII, HincII, MboI, MspI, PvuI, XbaI (购自大连宝生物工程有限公司)。按产家推荐的条件进行消化, 消化产物用 0.8% 的琼脂糖凝胶进行电泳, 溴化乙锭染色, GeneGenius 凝胶成像系统观察、拍照。

1.4 数据处理与分析

参照 Nei 等^[6] 的片段法计算单倍型间的片段共享度 (F)、遗传距离 (P) 和基因多样性指数 (h), 以及群体核苷酸多样性指数 (π)

$$F = 2N_{ij} / (N_i + N_j)$$

$$P = \{[(F^2 + 8F)^2 - F] / 2\}^{1/2}$$

$$h = n(1 - \sum x_i^2) / (n-1)$$

$$\pi = \sum A_i A_j P_{ij}$$

式中, N_{ij} 是 i, j 单倍型间的共享片段数, N_i 、 N_j 分别是 i, j 单倍型的片段总数, r 为内切酶识别序列碱基数, n 为样本数, P_{ij} 为 i, j 单倍型间的遗传距离, A_i 、 A_j 为 i, j 单倍型在群体中的百分数。

核苷酸多样性指数 (π) 的计算采用中国科学院昆明动物研究所张亚平先生赠送的 RFLP 分析软件^[7] 进行。用 MEGA2.1 软件^[8] 中的 UPGMA 法构建单倍型间的遗传聚类图。

2 结果

2.1 限制性内切酶酶谱及片段大小

在分析的 13 种限制性内切酶中, 除

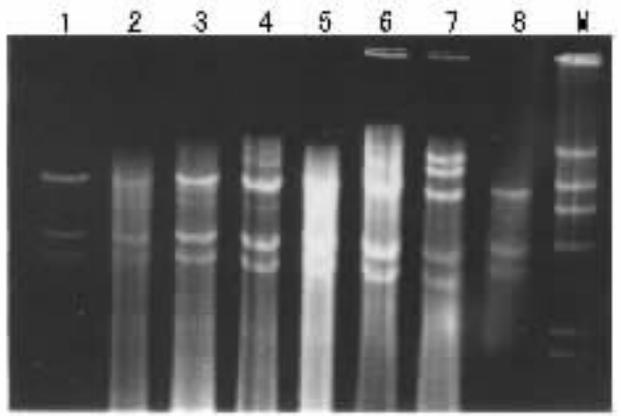


图 1 瓯江彩鲤 mtDNA 的 BamHI 酶切片部分电泳图谱

Fig. 1 The electrophoresis patterns of mtDNA in Oujiang color common carp

(1~8 为试验鱼编号; M: Lambda DNA/HindIII)

EcoRV 未出现酶切位点外,其余 12 种内切酶均检测出酶切位点,其中 BamH I, EcoR I, Hind III, Msp I, Pst I 5 种内切酶具有多态性。图 1 为 BamH I 酶的部分酶切图谱。瓯江彩鲤 mtDNA 的大小为 16.23 ~ 16.85 kb, 平均为 16.60 ± 0.15 kb (表 1) 表 1 所示的不同内切酶测得的 mtDNA 分子量。mtDNA 总计大小差异为计算差异所致,并非瓯江彩鲤 mtDNA 本身的大小差异。

表 1 瓯江彩鲤限制性内切酶酶切片长度模式

Tab.1 Restriction fragment patterns in Oujiang color common carp

酶	识别序列	限制性态型	位点数	限制性片段大小(kb)	总计
Ava I	CTCGAG	A	3	8.25 5.92 2.29	16.46
BamH I	GGATCC	A	3	8.68 4.27 3.66	16.46
		B	1	16.66	16.66
EcoR I	GAATTC	A	4	7.53 4.31 3.56 1.22	16.62
		B	1	16.64	16.64
Hae III	GGCC	A	6	7.39 3.16 2.97 1.27 1.20 0.52	16.51
Hinc II	GTTAAC	A	4	5.99 4.96 3.17 2.38	16.50
Hind III	AAGCTT	A	1	16.63	16.63
		B	4	7.60 6.11 2.32 0.65	16.68
Mbo I	GATC	A	6	8.56 2.13 2.01 1.53 1.38 0.96	16.57
Msp I	CCGG	A	7	4.19 3.97 2.37 2.25 1.98 1.08 0.90	16.74
		B	4	8.15 4.34 2.25 1.98	16.73
Pst I	CTGCAG	A	4	6.61 4.40 3.42 2.68	16.81
		B	2	14.11 2.68	16.85
		C	3	6.61 6.20 3.42	16.23
Pvu I	CGATCG	A	2	8.76 7.92	16.68
Sal I	GTCGAC	A	1	16.42	16.42
Xba I	TCTAGA	A	3	7.62 6.83 2.17	16.62

2.2 mtDNA 单倍型及多样性指数

在产生酶切片断的 12 种限制性内切酶中,检测到 18 种限制性态型,归结为 5 种基因单倍型。各单倍型在瓯江彩鲤的分布及频率见表 2。从 5 种单倍型在群体中的分布频率和酶切图谱看,瓯江彩鲤主要以单倍型 II 为主,还存在其它几种单倍型,单倍型 V 是由于单倍型 I 的 PstI 酶切位点发生突变所致。

表 2 瓯江彩鲤 mtDNA 的单倍型及频率

Tab.2 Restriction haplotypes and their frequencies in Oujiang color common carp

单倍型	个体数	频率(%)	限制性态型				
			BamHI	EcoRI	HindIII	MspI	PstI
I	4	22.22%	A	A	A	A	A
II	8	44.44%	B	A	A	A	B
III	3	16.67%	A	B	B	A	A
IV	2	11.11%	A	A	A	B	A
V	1	6.56%	A	A	A	A	C

根据 mtDNA 的限制性内切酶图谱,计算出 5 种单倍型间的片段共享度和遗传距离列于表 3。5 种单倍型的遗传距离为 0.195% ~ 1.136%,单倍型间的基因多样性指数为 0.7517。根据单倍型间的遗传距离用 UPGMA 法构建的 5 种单倍型的亲缘关系树(图 2)表明,单倍型 I 与单倍型 V 的亲缘关系最近。瓯江彩鲤的核苷酸多样性指数(π)为 2.86%。

表 3 瓯江彩鲤单倍型间的片段共享度、遗传距离

Tab.3 The shared fragments indexes and genetic distances among haplotypes in Oujiang color common carp (%)

单倍型(haplotypes)	I	II	III	IV	V
I	44	0.9048	0.8864	0.9176	0.9655
II	0.5609	40	0.7857	0.8148	0.9398
III	0.6773	1.3648	44	0.8000	0.8506
IV	0.4804	1.1562	1.2623	41	0.8810
V	0.1954	0.3473	0.9110	0.7118	37

注：右上角数字表示片段共享度，左下角数字表示遗传距离(%)，对角线数字表示单倍型的总片段数。

3 讨论

瓯江彩鲤 mtDNA 的大小为 16.60 ± 0.15 kb, 与陈关君等^[9]报道的普通鲤 16.99kb, 吴乃虎等^[10]报道的 16.40kb, 及 Araya^[11] (见 Billington and Hebert, 1991) 报道的 16.40kb 十分接近。

在应用的 13 种限制性内切酶中, 12 种检测出酶切位点, 5 种酶检测出多态性, 可归结为 5 种基因单倍型, 单倍型间的基因多样性指数为 0.7517, 高于银鲫(0.4417)、彭泽鲫(0.1895)和野鲫(0.6177)^[12], 也高于鲢(0.681)、鳙(0.584)及草鱼(0.231)^[13], 表明瓯江彩鲤的 mtDNA 多态程度较高。

衡量一个群体 mtDNA 变异程度有两个指标, 一是单倍型间的平均遗传距离(P), 二是核苷酸多样性指数(π)^[14]。瓯江彩鲤单倍型间的遗传距离为 0.195% ~ 1.136%, 平均 $0.767 \pm 0.396\%$, 位于一些淡水鱼类 mtDNA 种内变异较高的范围内, 属种内变异程度大的物种^[11]。核苷酸多样性指数(π)是指给定群体内两个随机选取的 mtDNA 序列间的平均每个位点的核苷酸差异数目, π 值越小, 群体间的多态程度越低。由于 π 值考虑了各种 mtDNA 单倍型在群体中所占的比例, 因而在衡量一个群体的 mtDNA 多态程度时, 比单纯的遗传距离平均值 P 要精确^[14]。本研究中, 瓯江彩鲤的核苷酸多样性指数(π)为 2.86%, 高于“四大家鱼”^[13]和鲫^[12, 15], 也高于我国的其它三种红鲤(兴国红鲤 1.18%, 玻璃红鲤 0.86%, 荷包红鲤 1.47%)^[1], 表明瓯江彩鲤 mtDNA 变异程度较高, 遗传多样性较为丰富。mtDNA 为母性遗传, 其有效种群大小仅为核基因组的四分之一, 易受遗传漂变的影响, 进化速度快, 其原始构建种群的大小对后代种群核苷酸多样性有很大的影响^[16]。瓯江彩鲤千百年一直是农家养殖群体, 还未进行有目的的人工系统选育与研究, 而较少的人工干预是目前瓯江彩鲤尚保持较高遗传多样性的重要原因。

从酶切图谱、单倍型的分布频率和聚类关系图, 可见除单倍型 II 外, 还有其它三种单倍型(I、III、IV), 这是否是由于环境因素等使瓯江彩鲤的线粒体 DNA 发生了突变, 还是与其它群体产生了基因流, 还有待进一步研究。

本研究得到蔡完其教授的鼎力相助, 1999 级硕士生轩兴荣和 2001 届本科生曾首英同学参与部分实验工作, 谨致谢忱。

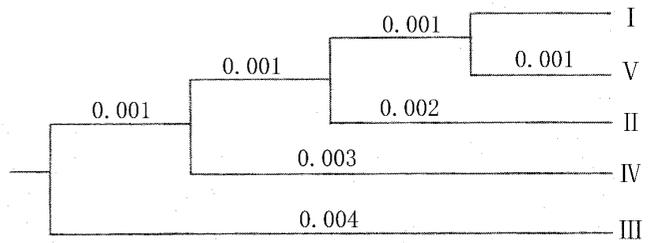


图 2 瓯江彩鲤 mtDNA 单倍型的 UPGMA 聚类图

Fig.2 The UPGMA dendrogram of 5 mtDNA haplotypes in Oujiang color common carp

(1) 李思发, 王成辉, 邵曙明. 中国红鲤线粒体 DNA 的遗传多样性及起源分化研究. 2001.

参考文献:

- [1] 程起群,王成辉,李思发,等.不同体色瓯江彩鲤生长率和存活率的差异研究[J].水产科技情报,2001,28(2):56-58,63.
- [2] 张亚平,施立明.动物线粒体 DNA 多态性研究概况[J].动物学研究,1992,13(3):289-29.
- [3] Berg W, Ferris S D. Restriction endonuclease analysis of salmonid mitochondrial DNA[J]. Can J Fish Aquat Sci, 1984, 41: 1041-1047.
- [4] Avise J C, Vruenhoek R C. Model of inheritance and variation of mitochondrial DNA in hybridogenetic fishes of genus *Poeciliopsis*[J]. Mol Biol Ecol, 1987, 4: 514-525.
- [5] 肖武汉,张亚平.银鲟自然群体线粒体 DNA 的遗传分化[J].水生生物学报,2000,24(1):1-9.
- [6] Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases[J]. Proc Nat Acad Sci USA, 1979, 76: 5269-5273.
- [7] 李海鹏,张亚平. Ftp: 分析群体 RFLP 数据的软件[J].动物学研究,1999,20(5):326.
- [8] Kumar S, Tamura K, Jakobsen I B, et al. MEGA2: Molecular evolutionary genetics analysis software[J]. Bioinformatics, 2001, 17(12):1244-1245.
- [9] 陈关君,陈彩云,王尔中.鲤鲫肌细胞线粒体 DNA 的限制性内切酶酶切比较[J].遗传学报,1984,11(2):1411-146.
- [10] 吴乃虎,王钢锋,阎景智,等.草鱼和鲤鱼线粒体 DNA 的分离纯化及其 *CoI* 基因分子克隆[J].动物学报,1991,37(4):375-381.
- [11] Billington N, Hebert P D N. Mitochondrial DNA diversity in fishes and its implications for introductions[J]. Can J Fish Aquat Sci, 1991, 48 (suppl. 1): 80-94.
- [12] 张辉,董新红,叶玉珍,等.三个三倍体鲫鱼品系及野鲫 mtDNA 的比较研究[J].遗传学报,1998,25(4):330-336.
- [13] 李思发,吕国庆, L. 贝纳切兹.长江中下游鲢鳙草青四大家鱼线粒体 DNA 多样性分析[J].动物学报,1998,4(1):82-93.
- [14] 李祥龙,张亚平,陈圣偶,等.山羊 mtDNA 多态性及其起源分化研究[J].畜牧兽医学报,1999,30(4):313-319.
- [15] 罗静,张亚平,朱春玲,等.鲫鱼遗传多样性的初步研究[J].遗传学报,1999,26(1):28-36.
- [16] Ward R D, Payne P. Appraisal of molecular genetic technique in fisheries[J]. Rev Fish Biol Fish, 1994, 4: 3000-3257.

来稿须知

一、《上海水产大学学报》为上海水产大学主办、以水产科学技术为主的综合性学术刊物。

本刊主要刊载渔业资源、水产养殖与增殖、水产捕捞、水产品保鲜与综合利用、渔业水域环境保护、渔船、渔业机械与仪器、渔业经济与技术管理以及水产基础研究等方面的论文、研究简报,少量刊载综述等文章。

本刊被《中国科学引文索引》、《水产文摘》、《中国水产文摘》、《水科学和渔业文摘》(ASFA)、美国《化学文摘》(CA)等多种权威检索刊物收录。最近本刊又被俄罗斯《文摘杂志》收录,成为其新收录的 102 种期刊中的一种。根据中国科技信息研究所信息分析研究中心最新提供的 2001 年版《中国科技期刊引证报告》,本刊 2000 年影响因子和总被引频次分别为 0.183 和 54,在全国水产类学术期刊中排名第 3 和第 6 位。

二、注意事项

1. 来稿文责自负。要求论点明确,数据可靠,简明扼要,文字精练(包括文章题名、图表和文献的运用),用第 3 人称撰写。着重撰述作者的新方法、新观点和新成果等。材料方法、基本原理及公式推导等从简。

2. 论文不超过 6000 字,综述 7000 字,研究简报 4000 字,其他文稿 1500 字。各数字内均含图、表等。

3. 来稿一式二份,请用打印稿,正文以四号字,宽行打印,改返时随附软盘。本刊对来稿有删改权,必要时退作者修改、精减交清稿。不录用稿不予退稿,请作者见谅。文章刊登后,将酌致稿酬,并赠送若干册当期的本刊。

4. 本刊也接受校外作者撰写的稿件,来稿请寄上海市军工路 334 号 38 信箱《上海水产大学学报》编辑部。

邮编 200090,电话 021-65710892,电子信箱 xuebao@shfu.edu.cn,传真 021-65680965。