

研究简报

三种鱼mtDNA的限制性内切酶分析\*

STUDY ON RESTRICTION ENDONUCLEASE MAP  
OF mtDNA OF THREE SPECIES IN CYPRINIDAE

关键词: 鱼类mtDNA, 限制性内切酶图谱, 羟基磷灰石

Key words: MtDNA of fishes, Restriction map, Hydroxyapatite

崔建勋; 余其兴  
Q959.405  
鱼类 mtDNA  
限制性内切酶 酶谱

鱼类线粒体DNA (mtDNA) 的限制性酶切图谱分析, 对于探讨鱼类的起源和演化等方面均有十分重要的意义。但是目前有关鱼类mtDNA酶切图谱的研究较少, 这主要是受方法学的限制。为此我们改良了一种鱼类 mtDNA 的提取法, 对鲤科的草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*)、鲢鱼 (*Hypophthalmichthys molitrix*) 和鳊鱼 (*Aristichthys nobilis*) 的mtDNA进行了限制性内切酶酶切分析。

材料和方法 草鱼、鲢鱼和鳊鱼均购自武汉集贸市场。限制性内切酶BamH I、EcoR I 和Pst I, 以及羟基磷灰石均购自华美生物工程公司。

用差速离心法得到经DNase I 处理的纯线粒体。将纯化的线粒体悬浮于缓冲液A (8 M尿素, 1% SDS, 0.24 M磷酸缓冲液, pH 5.8) 中, 37℃ 保温20分钟。直接上样于经0.24M磷酸缓冲液和8 M尿素 (pH6.8) 平衡的羟基磷灰石柱 (1.6cm × 7 cm)。上样后用相同的缓冲液平衡洗脱柱床体积的4倍。改用0.12M磷酸缓冲液 (pH6.8) 继续洗脱柱床体积的4倍。最后再用0.6M 磷酸缓冲液 (pH 5.8) 洗脱, 回收 mtDNA。透析后浓缩, 即可获得纯净的mtDNA。单酶和双酶完全酶解, 平板凝胶电泳后拍照, 均按常规方法。

结果 草鱼、鲢鱼和鳊鱼的mtDNA经BamH I、EcoR I 和Pst I 酶切后分别产生3、4、2个片段 (图1a),

表1 mtDNA单酶切片段的大小  
Tab. 1 Length of restriction fragment of mtDNA

鱼名	限制酶	片段大小 (kb)					mtDNA大小 (kb)
草鱼	BamH I	13.71	2.16	1.21			
	EcoR I	8.57	3.68	3.68	1.28		17.16 ± 0.07
	Pst I	13.09	4.13				
鲢鱼	BamH I	14.03	12.22	2.43	2.38	1.30	1.11
	EcoR I	11.94	3.77	1.25			
	Pst I	16.87					16.82 ± 0.09
鳊鱼	BamH I	12.22	2.43	1.47			
	EcoR I	11.68	3.60	1.04			
	Pst I	16.15					16.20 ± 0.09

\* 博士点基金资助项目。

本文1991年10月8日收到, 同年11月5日修回。

(上接第256页)

6、3、1个片段和3、3、1个片段。以 $\lambda$ -DNA经Hind III酶切的片段作对照,测得酶切各片段所含千碱基对数目,列于表1。采用双酶切来确定内切酶酶切位点的相对位置关系(如图1b),建立了这三种鱼mtDNA内切酶物理图谱(如图2)。

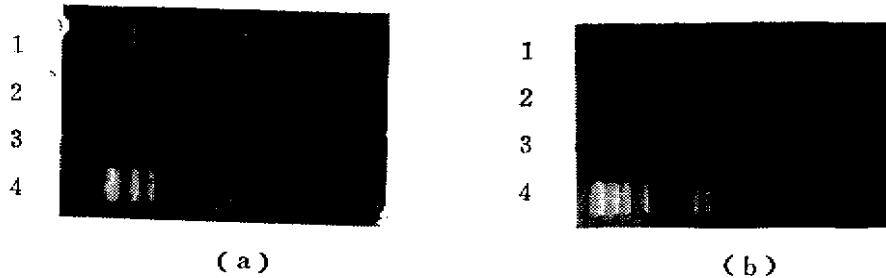


图1 草鱼单酶解(a)和双酶解(b)片段的电泳图谱  
Fig. 1 Agarose gel electrophoresis pattern of restriction digests of mtDNA from *C. idellus* by (a) single-enzyme (b) double-enzyme

- |                          |                          |
|--------------------------|--------------------------|
| 1 mtDNA/Pst I            | 1 mtDNA EcoR I/Pst I     |
| 2 mtDNA/EcoR I           | 2 mtDNA BamH I/Pst I     |
| 3 mtDNA/BamH I           | 3 mtDNA BamH I/EcoR I    |
| 4 $\lambda$ DNA/Hind III | 4 $\lambda$ DNA/Hind III |

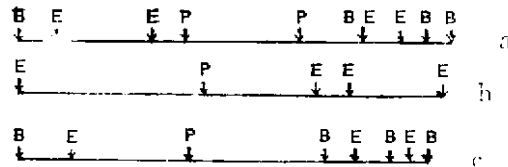


图2 三种鱼mtDNA的线性物理图谱

Fig. 2 The restriction map of fish mtDNAs from (a)*C. idellus*; (b)*H. molitrix* and (c)*A. nobilis*  
a. 草鱼 b. 鲢鱼 c. 鳊鱼

B: BamH I E: EcoR I P: Pst I

**讨论** 这种方法能直接提到纯净的mtDNA,不需要先提取mtDNA粗品然后再纯化。与其它方法比较具有以下优点:1.操作简便而且快速,只要将线粒体裂解于含有8 M尿素的0.24M磷酸缓冲液(pH 6.8)中即可上柱。样品上柱后经洗脱就可收集到mtDNA,整个过程在几小时内完成。2.分离到的mtDNA以共价闭合环状分子为主,样品中不含有RNA,蛋白质和多糖,易于酶切。3.不需要昂贵的仪器与试剂,实验条件要求不高,一般实验室均可采用。

从这三种鱼的mtDNA限制性酶切图谱看,其限制性酶切的切点分布不均匀,而且它们的限制性酶切图谱存在着差异。此外,鲢鱼的BamH I单酶完全酶切结果表明,在鲢鱼mtDNA上存在着BamH I酶切位点的多态性。这种mtDNA的种内多态性迄今已在鱼类、两栖类、爬行类、鸟类和哺乳类都有所发现。

**致谢** 本文在余先觉教授和周敏教授指导下完成。

崔建勋 余其兴 任修海\*  
Cui Jianxun Yu Qixing Ren Xiuhai

(武汉大学生物系 430072)

(Department of Biology, Wuhan University, 430072)

\* 现工作地址:上海科技大学生物工程系,上海 201800。