

尼罗非鲫和奥利亚非鲫 线粒体 DNA 遗传差异的研究

曹 莹 夏德全

(中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 无锡 214081)

摘 要 以酶切 Mitochondrial DNA(mtDNA)技术检测了尼罗非鲫和奥利亚非鲫的 mtDNA。测得两种鱼线粒体基因组的大小都约为 16.83 kb。在使用的 6 种酶中,只有 Pvu II 在所检测的 15 尾尼罗非鲫 mtDNA 上产生了多态片段,3 尾鱼的 mtDNA 产生了 4 个片段,12 尾鱼的 mtDNA 产生 3 个片段。而 6 种酶在所有 15 尾奥利亚非鲫中均未检测到多态片段。比较两种鱼的 mtDNA 酶切片段,仅 Pvu II 的酶切结果有所不同,尼罗非鲫 mtDNA 上有 3 个或 4 个 Pvu II 位点,但奥利亚非鲫 mtDNA 上有 5 个位点,因此,Pvu II 的酶切位点可作为鉴别它们的分子遗传标记。

关键词 尼罗非鲫,奥利亚非鲫,线粒体 DNA,种群,遗传变异

尼罗非鲫(*Oreochromis niloticus*)和奥利亚非鲫(*O. aureus*)引进时奠基群体很小,遗传瓶颈的影响使非鲫养殖群体的遗传变异减少,这将不利于非鲫种质资源的保护,因此,本研究以线粒体 DNA(mtDNA)酶切片段技术对尼罗非鲫和奥利亚非鲫的群体遗传多样性进行研究。

酶切 mtDNA 技术已被广泛地应用于鱼类群体结构的研究[Ferris 等 1987, Funkenstein 等 1990, Seyoum 等 1992]。mtDNA 具有母系遗传的特性,它的进化速度比核基因组快 5~10 倍[Ferris 等 1987],所以,利用酶切 mtDNA 产生的片段数目和大小鉴别种内遗传组成和群体间细微的差异,也可作为鉴别群体的分子遗传标志,以识别各种非鲫[Bouchon 等 1994, Seyoum 等 1992]。本文利用 mtDNA 对尼罗非鲫和奥利亚非鲫进行遗传差异的研究,这对保护和利用非鲫种质资源,促进非鲫养殖业的发展具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 实验材料

奥利亚非鲫是 1983 年本实验室从美国奥本大学引进的,原产于尼罗河下游;尼罗非鲫是 1992 年从美国引进的,原产于苏丹尼罗河下游。二种鱼均取材于作者所在单位鱼种场,体重为 300~400 g。

1.2 主要试剂

六种限制性内切酶 Ava I、Bgl II、EcoR V、Hinc II、Hind III 和 Pvu II 及 RNase 均购自华美生物工程公司。

缓冲液 I:STE-蔗糖缓冲液(100 mM NaCl, 10 mM Tris·HCl, 0.1 mM EDTA, 250 mM 蔗糖, pH 值 7.8)。

缓冲液 II:TE-葡萄糖缓冲液(50 mM 葡萄糖, 10 mM EDTA, 25 mM Tris·HCl pH 值 8.0)。

缓冲液 III:TE 缓冲液(10 mM Tris·HCl, 0.1 mM EDTA, pH 值 7.5)。

缓冲液 IV:酶解反应终止兼载样缓冲液(0.25% 溴酚蓝, 50% 甘油, 50 mM EDTA, pH 值 8.0)。

缓冲液 V:TAE 电泳缓冲液(40 mM Tris-乙酸, 1 mM EDTA)。

溶液 I:碱性 SDS 溶液(1% SDS, 0.2 N NaOH)(用时以 10% SDS 和 1 N NaOH 配制)。

溶液 II:3 M 醋酸钾溶液(pH 值 4.8, 对 K^+ 为 3 M, 醋酸为 5 M)。

1.3 实验方法

1.3.1 mtDNA 的提取纯化

采用 Palva 等[1985]建立的快速碱性提取法,并作适当修改。

取新鲜非鲫肝脏(约 15 g),加缓冲液 I 匀浆后用差速离心法得到粗提线粒体(操作除非特别说明,均指在 0~4℃下)。用缓冲液 I 清洗两次,离心后将得到的纯净线粒体充分悬浮于缓冲液 II 中,加两倍体积溶液 I 裂解线粒体,冰浴 10 min 后加 1.5 倍体积溶液 II 终止反应。10 000 r/min 离心 10 min,取上清用等体积平衡后的酚抽提二次、再用苯酚/氯仿/异戊醇(25/24/1)抽提一次,离心后取水相,加两倍体积预冷的无水乙醇,在 -20℃下过夜。次日在 15 000 r/min 离心 30 min,收集 mtDNA,干燥后溶于适量缓冲液 III 中,加无 DNase 的 RNase, 37℃水浴 1 h 以除去 RNA。再用酚/酚/氯仿/异戊醇抽提蛋白质后,沉淀、干燥,将所得 mtDNA 溶于灭菌水中,置于 4℃保存备用。

1.3.2 mtDNA 的酶解反应

用常规方法进行酶解反应,加缓冲液 IV 终止反应。

1.3.3 琼脂糖凝胶电泳

凝胶浓度为 1.2%~1.5%。胶中含 0.5 μg/mL 溴化乙锭。电泳缓冲液为 TAE。在室温下电泳,电压为 1 V/cm。电泳时间为 16 h。电泳毕在紫外灯下观察拍照。

1.4 酶解片段大小的计算

以 λDNA/EcoR I + Hind III 和 λDNA/Hind III 完全酶解片段作分子量标准。根据 Southern [1979]的公式计算酶解片段大小。

2 结果

用 Ava I、Bgl II、EcoR V、Hinc II、Hind III 和 Pvu II 6 种内切酶分别酶解 15 尾尼罗非鲫和奥利亚非鲫的 mtDNA,结果如表 1 所示。Ava I 在尼罗非鲫的 mtDNA 上有 4 个酶切位点,产生 4 个片段,大小分别为 5.40、5.10、4.90 和 1.45 kb;Bgl II 有 3 个酶切位点,产生 3 个片段,大小分别为 7.80、5.20 和 3.80 kb;EcoR V 有 2 个位点,产生 2 个片段,大小分别为 9.40 和 7.40 kb(图 1);Hinc II 有 8 个位点,产生 8 个片段,大小分别为 5.15、3.40、2.10、1.72、1.71、1.20、0.94 和 0.60 kb;Hind III 有 3 个位点,产生 3 个片段,大小分别为 8.50、5.10 和 3.20 kb。以上 5 种酶在 15 尾尼罗非鲫 mtDNA 上均只测到一种限制类型,即呈现单态。Pvu II 的酶切位点呈现多态,在 12

尾尼罗非鲫 mtDNA 上产生 3 个片段,大小分别是 11.00、3.00 和 2.90 kb,称为 Pvu II - I 限制类型;在其余 3 尾鱼 mtDNA 上产生 4 个片段,大小分别是 8.90、3.00、2.90 和 2.10 kb,称为 Pvu II - II 限制类型(表 1、图 2)。可见, I 型的 11.00 kb 片段就是 II 型的 8.90 和 2.10 kb 两片段。

六种内切酶酶解奥利亚非鲫 mtDNA 时,除 Hinc II 和 Pvu II 外,其余 4 种酶的酶切结果均与尼罗非鲫的相同(表 1)。不同的是, Pvu II 在奥利亚非鲫 mtDNA 上有 5 个酶切位点,产生 5 个片段,大小分别是 8.00、3.00、2.90、2.10 和 0.90 kb(表 1、图 3)。Hinc II 的酶解片段仅检出 5 条,其和与其它酶解片段之和相比相差甚远,可能是由于较小的酶解片段在电泳过程中走出凝胶,以至于未能检出。实验共检测了 15 尾奥利亚非鲫,均未检测到其 mtDNA 酶解片段的多态现象。

根据酶切结果,计算出尼罗非鲫和奥利亚非鲫 mtDNA 的大小都是 16.83 kb。这表明这两种非鲫的进化亲缘关系非常接近。

表 1 尼罗非鲫与奥利亚非鲫 mtDNA 酶切片段大小(kb)

Table 1 Restriction fragment length of mtDNA of *O. niloticus* and *O. aureus*(kb)

酶的种类型	鱼的种类型	酶切片段大小	合计
Ava I	尼罗非鲫	5.40 + 5.10 + 4.90 + 1.45	16.85
	奥利亚非鲫	5.40 + 5.10 + 4.90 + 1.45	16.85
Bgl II	尼罗非鲫	7.80 + 5.20 + 3.80	16.80
	奥利亚非鲫	7.80 + 5.20 + 3.80	16.80
EcoRV	尼罗非鲫	9.40 + 7.40	16.80
	奥利亚非鲫	9.40 + 7.40	16.80
Hinc II	尼罗非鲫	5.15 + 3.40 + 2.10 + 1.72* + 1.20 + 0.94 + 0.60	16.83
	奥利亚非鲫	5.15 + 3.40 + 2.10 + 1.72*	14.09**
Hind III	尼罗非鲫	8.50 + 5.10 + 3.20	16.80
	奥利亚非鲫	8.50 + 5.10 + 3.20	16.80
Pvu II	尼罗非鲫 ¹	11.00 + 3.00 + 2.90	16.90
	尼罗非鲫 ²	8.90 + 3.00 + 2.90 + 2.10	16.90
	奥利亚非鲫	8.00 + 3.00 + 2.90 + 2.10 + 0.90	16.90
平均	尼罗非鲫		16.83
	奥利亚非鲫		16.83

注: * 因为在紫外光下此带荧光的亮度较强,从而认为它是大小相同的两条片段重叠而成。 ** : 由于有若干小的片段未能检出,在计算 mtDNA 均值时将其排除在外

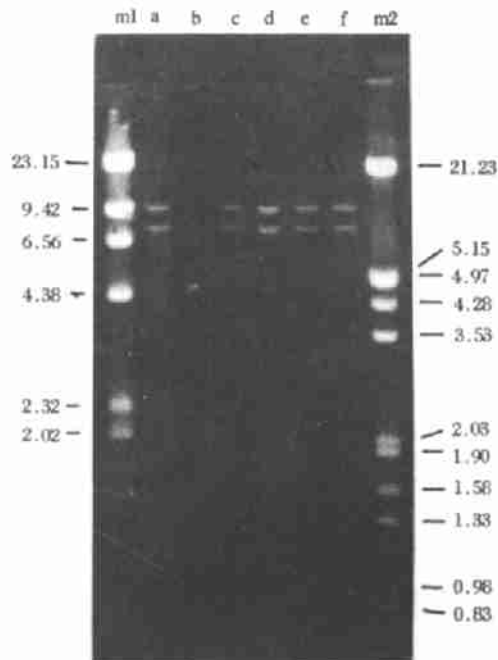


图 1 尼罗非鲫 mtDNA 的 EcoRV 酶切电泳图
(分子量标准以 kb 为单位)

Fig. 1 Electropherogram of mtDNA restriction fragments of *O. niloticus* cleaved with EcoRV

m1: λDNA/Hind III, a-f: mtDNA/EcoRV, m2: λDNA/EcoRI + Hind III

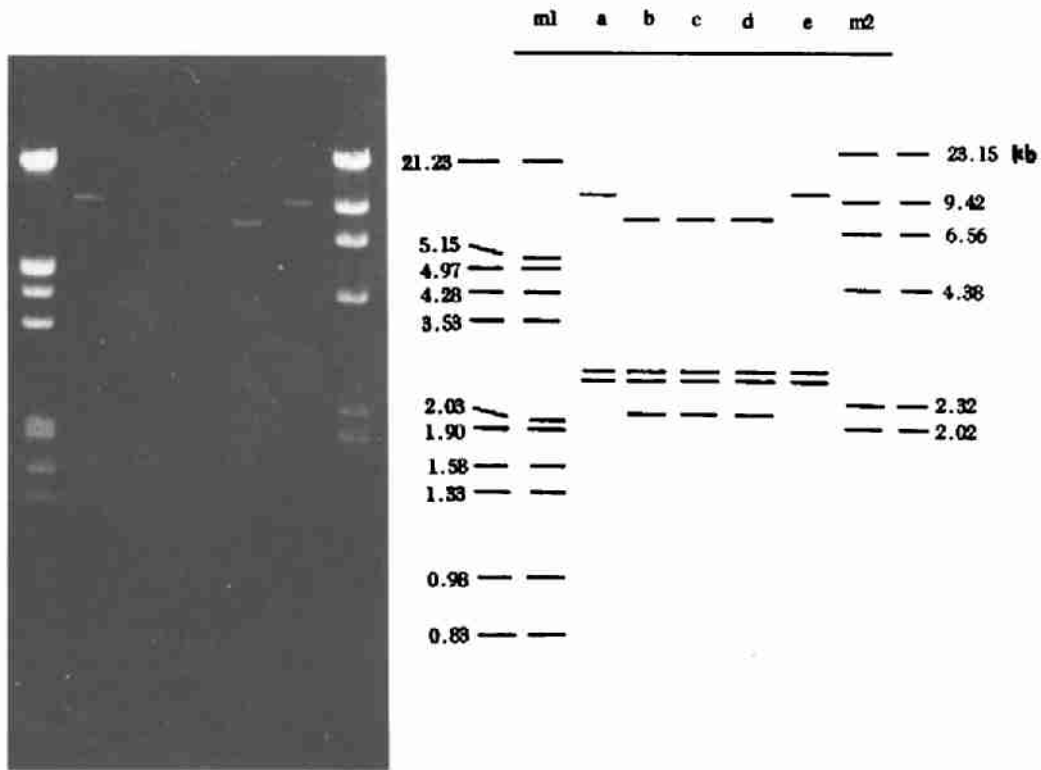


图2 尼罗非鲫 mtDNA 的 Pvu II 酶切电泳图谱及其模式图(分子量标准以 kb 为单位)

Fig.2 Electropherogram of mtDNA restriction fragments of *O. niloticus* cleaved with Pvu II

m1:λDNA/EcoR I + Hind III, a-e:mtDNA/Pvu II, m2:λDNA/Hind III

3 讨论

本实验室保存了两种来源的尼罗非鲫。一种是 1978 年长江水产研究所从苏丹尼罗河引进的尼罗非鲫的后代,称阿斯旺坝上游尼罗非鲫,是我国尼罗非鲫的主要养殖对象;另一种是 1992 年从美国引进的产于尼罗河下游的尼罗非鲫,即笔者所检测的尼罗非鲫。由于是二次引进(一次引入美国,二次引入中国),经过两次遗传瓶颈之后,丢失了大量的遗传变异。在所使用的几种酶中,只有 Pvu II 产生了两种带型(图 2),即多态现象,说明了从美国引进的尼罗非鲫尚保留了一定的遗传变异。根据本实验室对 1978 年长江水产研究所引进的阿斯旺坝上游尼罗非鲫的 mtDNA 检测结果(待发表),说明其遗传变异大一些。因为除了 Pvu II 的带型呈现多态以外,EcoR V 也产生了两种带型(因此,可用 EcoR V 来区别这两种不同来源的尼罗非鲫)。对两个来源的尼罗非鲫 mtDNA 的检测结果表明,证实了瓶颈效应可导致遗传变异的丢失。虽然如此,两者的结果同时也显示出我国的尼罗非鲫群体还拥有一定水平的遗传多样性。

实验中未能检测到酶切奥利亚非鲫 mtDNA 的多态现象。本研究中的奥利亚非鲫系在 1963 年从美国奥本大学引进的,而该大学的奥利亚非鲫是在 1957 年从以色列引进。当时引进 10 尾,仅一雌三雄成活。追根溯源,国内的奥利亚非鲫实际都是这一尾雌鱼的后代。由于 mtDNA 是母系遗传的,因而国内奥利亚非鲫的线粒体基因型只有一种。即使在近 40 年间线粒体基因组可积累个别碱基的变异,但这种变异也许只能用 DNA 测序的方法才能检测到。

对尼罗非鲫和奥利亚非鲫 mtDNA 酶切片段的比较发现,这两种非鲫的线粒体基因组极为相似。在所采用的六种酶中,除奥利亚非鲫 mtDNA 的 Hinc II 酶解片段未完全观察到而不能与尼罗非鲫相比较外,仅 Pvu II 在两种非鲫 mtDNA 上切得的片段有所不同:尼罗非鲫 mtDNA 上有 3 个或 4 个 Pvu II 位点,但在奥利亚非鲫 mtDNA 上却有 5 个 Pvu II 位点(图 2、3)。这说明,可用 Pvu II 的酶切图谱作为区别两种非鲫的遗传标记。无独有偶,李思发等[1995]的研究也证实了它们的核基因组是极其相似的,因为在他们所采用的 10 种同工酶中,也只有 ADH 的酶谱在两种鱼之间呈现出差别。

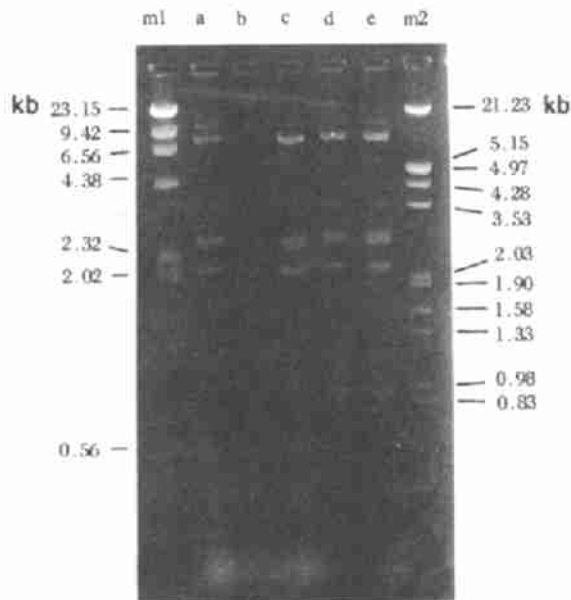


图 3 奥利亚非鲫 mtDNA 的 Pvu II 酶切电泳图
(分子量标准以 kb 为单位)

Fig.3 Electropherogram of mtDNA restriction fragments of *O. aureus* cleaved with Pvu II
m1: λ DNA/Hind III, a - e: mtDNA/Pvu II, m2: λ DNA/EcoR I + Hind III

本文是国家“九五”攻关专题“奥利亚罗非鱼选育”(编号:96-008-01-02-04)部分内容,并得到中国水产科学研究院科研基金资助。研究生吴晓洲和王文君在 mtDNA 提取过程中付出了辛劳,谨致谢忱。

参 考 文 献

- 李思发,蔡完其.1995.我国尼罗罗非鱼和奥利亚罗非鱼养殖群体的遗传渐渗.水产学报,19(2):105-111.
- Bouchon D, Souty-Crosset C, Raimond R.1994. Mitochondrial DNA variation and markers of species identity in two penaeid shrimp species: *Penaeus monodon* fabricius and *P. japonicus* bate. Aquaculture, 127:131-144.
- Ferris S D, Berg W J.1987. Population genetics and fishery management. University of Washington Press, Seattle.277-299.
- Funkenstein B, Cavari B, Studie T, et al.1990. Restriction site polymorphism of mitochondrial DNA of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*) broodstock in Eilat, Israel. Aquaculture, 89:217-223.
- Palva T K, Palva E T. 1985. Rapid isolation of animal mitochondrial DNA by alkaline extraction. FEBS letters, 192(2):267-270.
- Seyoum S, Kornfield I. 1992. Identification of the subspecies of *Oreochromis niloticus* (Pisces: Cichlidae) using restriction endonuclease analysis of mitochondrial DNA. Aquaculture, 102:29-42.
- Southern E M.1979. Measurement of DNA length by gel electrophoresis. Analytical Biochemistry, 100:319-323.

STUDIES ON THE GENETIC VARIATION IN MITOCHONDRIAL DNA OF *OREOCHROMIS NILOTICUS* AND *O. AUREUS*

CAO Ying, XIA De-Quan

(Freshwater Fisheries Research Center, CAFS, Wuxi 214081)

ABSTRACT Mitochondrial DNAs (mtDNA) of *Oreochromis niloticus* and *O. aureus* were assayed with six restriction endonucleases Ava I, Bgl II, EcoR V, Hinc II, Hind III and Pvu II. The length of mtDNA of these two fishes was figured out to be 16.83 kb according to the sizes of resulted restriction fragments. Out of the six enzymes employed, Pvu II was the only one that detected mtDNA polymorphism of *O. niloticus*. There were two types of mtDNA, one consisting of three PvuII sites, which appeared on the mtDNA of 12 of 15 individuals of *O. niloticus* examined; and the other composed of four Pvu II sites, which appeared on the mtDNA of the remaining three fishes. However, the mtDNA of the 15 individuals of *O. aureus* assayed appeared to be monomorphic. Restriction fragments generated with the six enzymes were compared between *O. niloticus* and *O. aureus*, but the mtDNAs of the two species were found to be only slightly different, only in Pvu II restriction sites, i. e., there were three or four Pvu II restriction sites on *O. niloticus* mtDNA, while there were five Pvu II sites on *O. aureus* mtDNA. Thus, Pvu II restriction sites can be used as genetic molecular marker to identify the two species of tillapias.

KEYWORDS *Oreochromis niloticus*, *Oreochromis aureus*, Mitochondrial DNA (mtDNA), Population, Genetic variation