

## 太湖新银鱼线粒体 DNA 物理图谱及分析<sup>①</sup>

谢志雄 杨代淑 熊全沫 郝广勤 张德春

(武汉大学生命科学院, 武汉 430072)

**摘要** 采用改进的碱裂解法制备太湖新银鱼线粒体 DNA, 构建其 *PvuII*、*BamHI*、*XhoI*、*SalI*、*EcoRI* 和 *PstI* 等 6 种限制性内切酶的物理图谱。比较了鲑形目 3 种鱼的线粒体 DNA 物理图谱, 根据限制性位点差异法计算它们之间的遗传距离, 利用 UPGMA 聚类分析法构建分子聚类图, 结果表明: 红点鲑属与大西洋鲑先聚在一起, 再与太湖新银鱼相聚, 前两者间遗传距离为 12.23%, 亲缘关系较近, 太湖新银鱼与这两者间的遗传距离为 21.36%, 亲缘关系较远, 表明银鱼科与鲑科分离较早。

**关键词** 太湖新银鱼, 线粒体 DNA, 物理图谱

**中图分类号** Q951, Q959.46

## Physical Map and Analysis of Mitochondrial DNA from *Neosalanx taihuensis* Chen

XIE Zhixiong YANG Daishu XIONG Quanwei HAO Guangqin ZHANG Dechun

(College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072)

**Abstract** The mitochondrial DNA(mtDNA) from *Neosalanx taihuensis* Chen was prepared by the improved alkaline lysis procedure. The cleavage sites map of six kinds of restriction endonucleases(*PvuII*, *BamHI*, *XhoI*, *SalI*, *EcoRI* and *PstI*) was determined. The physical maps of mtDNAs from *N. taihuensis* Chen, *Salvelinus* taxa and *Salmo salar* were analyzed. Genetic distances between mtDNAs were calculated by the formula of Nei and Li (1979). Phylogenetic reconstruction method, UPGMA, was used to analyze the genetic relationships and the molecular dendrogram was established and revealed: the genetic distance between *Salvelinus* taxa and *Salmo salar* is 12.23% and that between *N. taihuensis* Chen and *Salvelinus* taxa—*S. salar* is 21.36%. This indicates that Salangidae diverged from Salmoninae earlier.

**Key words** *Neosalanx taihuensis* Chen, Mitochondrial DNA, Physical map

动物线粒体 DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)一般是共价闭合的环状双链 DNA, 基因组结构简单、稳定, 遗传上具有相对自主性, 遵循母性遗传方式, 进化速度快<sup>(1)</sup>, 而且 mtDNA 的限制性内切酶图谱具有相对的科属稳定性, 这些使得 mtDNA 成为研究物种起源、遗传分化和系统进化的良好模型。

太湖新银鱼 (*Neosalanx taihuensis* Chen) 属鲑形目 (Salmoniformes)、胡瓜鱼亚目 (Osmeroidei)、银鱼科 (Salangidae)、新银鱼属<sup>(2)</sup>。有关银鱼科的分类尚无定论, 新银鱼属中的分类情况尤为复杂<sup>(3,4)</sup>。银鱼具有幼态持续现象 (neoteny)。1925 年 Jordan 最早提出银鱼的骨骼几乎没有骨化, Berg 指出银鱼似乎是幼态持续的鱼类, 伍献文等明确提出银鱼具有幼态持续现象<sup>(5)</sup>。对银鱼幼态持续机制与进化关系的研究, 有助于阐明个体发

<sup>①</sup>国家自然科学基金资助课题。

育过程中基因的表达调控及各器官系统发育协调的机制及其在进化过程中所起的作用。有关银鱼幼态持续现象分子水平的研究工作已有报道<sup>(6)</sup>, 但有关其 mtDNA 方面的研究工作还未见报道。本实验采用改进的碱裂解法制备太湖新银鱼 mtDNA, 构建了其 6 种限制性内切酶的物理图谱, 结合红点鲑属 (*Salvelinus taxa*) 和鲑属 (*Salmo*) 的大西洋鲑 (*Salmo salar*) 的 mtDNA 物理图谱进行比较分析, 从分子水平为其分类及系统进化的研究提供资料, 初步探讨了这些鱼类 mtDNA 间的趋异性及其进化地位, 为银鱼幼态持续机制及鲑形目鱼类的系统分类和遗传进化等方面的深入研究积累资料。

## 1 材 料 和 方 法

### 1.1 材料来源

太湖新银鱼于 1994 年 11 月和 1995 年 11 月取自湖北省广水市徐家河水库, 起网后液氮冷冻,  $-37^{\circ}\text{C}$  保存备用。

### 1.2 mtDNA 的制备

太湖新银鱼 mtDNA 制备方法参照 Tamura 和 Aotsuka<sup>(7)</sup> 的方法改进, mtDNA 限制性内切酶酶切、片段大小的确定及物理图谱构建参照戴建华等<sup>(8)</sup> 的方法。

### 1.3 遗传分析

参考有关文献<sup>(9,10)</sup>, 结合红点鲑属和 大西洋鲑 mtDNA 的物理图谱进行比较分析, 按 Nei 和 Li<sup>(11)</sup> 建立的“利用限制性内切酶研究遗传差异的数学模型”, 依据限制性位点差异法计算各物种 mtDNA 间的遗传距离, 采用 UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetic mean) 聚类分析法<sup>(12)</sup> 构建分子聚类图。

## 2 结 果 与 讨 论

### 2.1 mtDNA 限制性内切酶酶切电泳图谱

根据电泳结果测得太湖新银鱼 mtDNA 分子大小为 17.12kb, 与文献报道的动物 mtDNA 分子大小在 15.7~19.5kb 之间的结果相符<sup>(1)</sup>。太湖新银鱼 mtDNA 限制性内切酶酶切电泳图谱见图 1; mtDNA 经 6 种限制性内切酶酶切产生的片段大小见表 1。

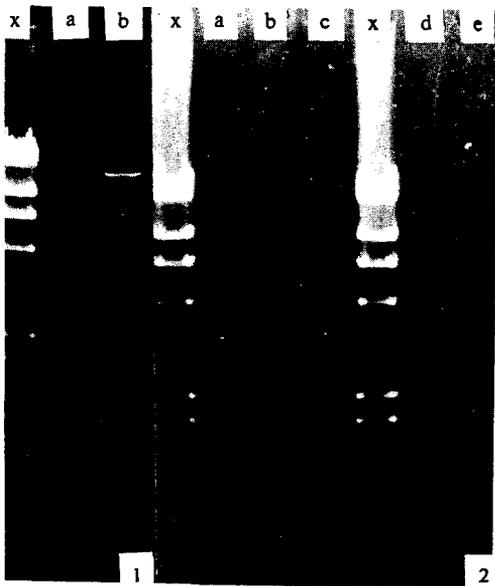


图 1 太湖新银鱼 mtDNA 限制性内切酶酶切电泳图谱  
x.  $\lambda$ DNA / *Hind*III; 1: a. *Pvu*II; 2: a. *Eco*RI;  
b. *Pst*I; c. *Bam*HI; d. *Xho*I; e. *Sal*I.

表 1 太湖新银鱼 mtDNA 限制性片段大小(kb)

| 酶、片段         | A     | B    | C    | D    | E    | F | 合计    |
|--------------|-------|------|------|------|------|---|-------|
| <i>SalI</i>  | 17.12 |      |      |      |      |   | 17.12 |
| <i>XhoI</i>  | 17.12 |      |      |      |      |   | 17.12 |
| <i>PvuII</i> | 17.12 |      |      |      |      |   | 17.12 |
| <i>BamHI</i> | 9.37  | 7.74 |      |      |      |   | 17.11 |
| <i>EcoRI</i> | 6.08  | 6.08 | 2.67 | 2.29 |      |   | 17.12 |
| <i>PstI</i>  | 8.21  | 3.91 | 2.14 | 1.99 | 0.88 |   | 17.13 |

2.2 遗传距离

采用双酶法构建的太湖新银鱼 mtDNA 物理图谱见图 2。共有 6 种限制性内切酶数据, 其中红点鲑属酶切位点为该属中保守位点或在大多数种间较为保守的位点。参加比较的位点共占 mtDNA 114~138bp 的序列, 约占 mtDNA 基因组的 0.7~0.8%。

mtDNA 间限制性位点共享度及限制性位点核苷酸的平均取代值 (遗传距离) 见表 2, 利用 UPGMA 聚类分析法构建的分子聚类图见图 3。

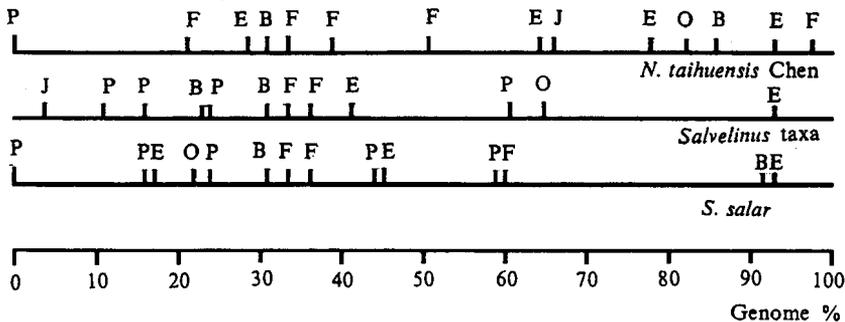


图 2 鲑形目 3 种鱼 mtDNA 物理图谱  
B = BamHI, E = EcoRI, F = PstI, J = SalI, O = XhoI, P = PvuII; 大西洋鲑无 SalI 数据。

表 2 限制性位点核苷酸的平均取代值 (遗传距离)

| mtDNA                     | <i>N. taihuensis</i> Chen | <i>Salvelinus</i> taxa | <i>S. salar</i> |
|---------------------------|---------------------------|------------------------|-----------------|
| <i>N. taihuensis</i> Chen |                           | 0.2308                 | 0.2963          |
| <i>Salvelinus</i> taxa    | 0.2244                    |                        | 0.4800          |
| <i>S. salar</i>           | 0.2027                    | 0.1223                 |                 |

注: 对角线右上方为限制性位点共享度, 左下方为限制性位点核苷酸的平均取代值  $\pi$ 。

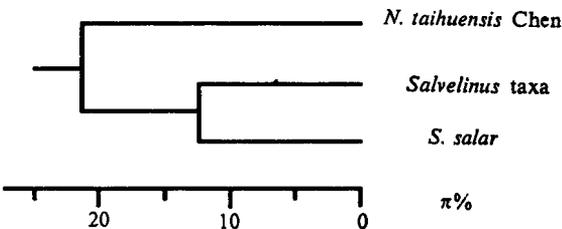


图 3 类平均聚类进化树

红点鲑属与大西洋鲑间 mtDNA 核苷酸平均取代值为 12.23%, 与 Grewe 等<sup>(9)</sup> 整理的鲑科 (Salmoninae) 鱼类中红点鲑属与鲑属间 mtDNA 核苷酸平均取代值 11.7% 的结果很接近, 依据 Brown 等<sup>(13)</sup> 提出的“每百万年

mtDNA 平均碱基突变速率为 2%”估算, 两者分离时间在 600 万年以前, 而太湖新银鱼与这二者间 mtDNA 核苷酸的平均取代值为 21.36%, 分离时间在 1100 万年前。类平均聚类进化树中, 红点鲑属与大西洋鲑先聚在一起, 再与太湖新银鱼相聚。

### 2.3 进化速率

利用限制性内切酶研究 mtDNA 遗传差异的估算中没有将回复突变计算在内, 分离时间很长时(超过 1 000 万年), 估算结果一般偏低<sup>[14]</sup>, 由此, 银鱼科与鲑科分离时间应该早于 1 100 万年前。而且“每百万年 mtDNA 平均碱基突变速率为 2%”的假设是根据对哺乳类动物 mtDNA 研究结果推算出来的, 不一定符合鱼类 mtDNA 的进化速率。

考查的位点所占序列约为 mtDNA 基因组的 0.7~0.8%, 增加限制性内切酶种类, 随着考查位点的增多, 分析结果会更接近于实际情况。受材料限制, 目前还没有鲑形目中香鱼科 (Plecoglossidae)、胡瓜鱼科 (Osmeridae) 及茴鱼科 (Thymallidae) 的 mtDNA 物理图谱的资料, 银鱼科 mtDNA 研究也未见到相关资料, 确定银鱼科在鲑形目中的地位及其系统演化历程还有待更多的工作积累, 这里只给出了银鱼科新银鱼属与鲑科两属间的粗略关系。

Ivankov 等<sup>[15,16]</sup>发现白斑红点鲑 (*Salvelinus leucomaenis*) 和马苏大麻哈鱼 (*Oncorhynchus masu*) 中存在稚鱼幼态持续现象 (postlarval neoteny)。具幼态持续现象的太湖新银鱼与红点鲑属和大西洋鲑间遗传距离分别为 22.44% 和 20.27%, 相差不大, 目前还未见到大西洋鲑存在幼态持续现象的资料, 这是否暗示鲑形目中具幼态持续现象鱼类在亲缘关系上没有紧密联系, 这一点还需对银鱼科和鲑形目中其他科属 (如 *Oncorhynchus*) 鱼类作进一步比较研究才能确定。

### 参 考 文 献

- 1 张亚平, 施立明. 动物线粒体 DNA 多态性的研究概况. 动物学研究, 1992, 13(3): 289~298
- 2 成庆泰, 郑葆珊. 中国鱼类系统检索 (上册), 北京: 科学出版社, 1987, 68~69
- 3 陈宁生. 太湖所产银鱼的初步研究. 水生生物学集刊, 1956, 2: 326~335
- 4 张玉玲. 中国新银鱼属 *Neosalanx* 的初步整理及其一新种. 动物学研究, 1987, 8(3): 277~286
- 5 伍献文, 林人端. 银鱼的幼态持续及其在天演上的意义. 水生生物学集刊, 1965, 5(2): 239~248
- 6 林信伟, 熊全沫. 寡齿新银鱼同工酶及其与幼态持续的关系. 遗传学报, 1991, 18(3): 214~218
- 7 Tamura K, Aotsuka T. Rapid isolation method of animal mitochondrial DNA by the alkaline lysis procedure. Biochem. Genet., 1988, 26(11/12): 815~819
- 8 戴建华等. 鲑鱼线粒体 DNA 的酶切图谱. 水产学报, 1994, 18(4): 312~320
- 9 Grewe P M *et al.* Polygenetic relationship among members of *Salvelinus* inferred from mtDNA divergence. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 1990, 47(5): 984~991
- 10 Bermingham, E. *et al.* Discrimination between Atlantic salmon (*Salmo salar*) of north American and European origin using restriction analyses of mitochondrial DNA. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 1991, 48(5): 884~893
- 11 Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1979, 76(10): 5269~5273
- 12 Sneath P H A, Sokal R R. Numerical taxonomy. San Francisco. CA.: W. H. Freeman and Co., 1973. 214~245
- 13 Brown W M *et al.* Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1979, 76(4): 1967~1971
- 14 张亚平, 施立明. 黑叶猴和灰叶猴的线粒体 DNA 限制性片段长度多态研究. 动物学研究, 1993, 14(3): 263~269
- 15 Invankov V N *et al.* Postspawning data on neotenic male salmon *Oncorhynchus masu* (Brevoort). Vopr. Ikhtiol., 1977, 17(4): 752~757
- 16 Invankov V N, Bronevskii A M. Postlarval neoteny in fishes. Zool. Zh., 1978, 57(1): 87~93