

方正银鲫、白鲫与鲫线粒体 DNA 限制性内切酶酶切比较

张四明 龙 华 张兴忠

(长江水产研究所, 沙市 434000)

提 要 用 Bam HI、Eco RI、Dra I、Hinf I、Hind III、Hpa II、Msp I、Pst I、Sau 3AI、Sma I、Xba I、Xho I 和 Sal I 等十三种限制性内切酶对方正银鲫(*Carassius auratus gibelio*)、白鲫(*Carassius auratus cuvieri*)和鲫(*Carassius auratus auratus*)的线粒体 DNA (mt DNA) 进行单酶酶切以及其中八种识别六碱基对序列的限制性内切酶的双酶酶切,经琼脂糖凝胶电泳后,分析且计算出各酶切片断大小,得出三种鲫鱼的 mt DNA 分子大小:方正银鲫为 15990 ± 90 碱基对(bp);白鲫为 16600 ± 130 碱基对(bp);鲫为 15540 ± 140 碱基对(bp),并且分别建立了方正银鲫、白鲫和鲫 mt DNA 由 Bam HI、Pst I、Eco RI 及 Xba I 等四种限制性内切酶构建的酶切图谱。

关键词 线粒体 DNA,限制性内切酶,方正银鲫,白鲫,鲫

动物线粒体 DNA (mt DNA) 是共价闭环双链 DNA^[17],分子量约为 17000 碱基对 (bp)^[14],其基因组进化速率比核基因组快约十倍^[10],且系母性遗传^[18]。目前,mt DNA 的限制性内切酶分析已被广泛应用于群体遗传结构、基因流动、杂交、生物地理学和系统发生等研究^[16]。与同工酶分析相比,mt DNA 限制性内切酶分析可提供更详细、可靠、稳定的数据,特别适合种内遗传变异的研究^[5~8,14]。八十年代中期,该技术开始应用于鱼类群体遗传结构分析、遗传标记,亦取得很大成功^[2,9,6~8,11~12,16~17]。

鲫鱼是深受我国人民喜爱的重要养殖对象,有许多亚种、地方种群和引进品种,遗传背景十分复杂。了解这些资源的遗传背景,无论是对水产养殖业还是对其系统进化,都有重要意义。目前已积累了一些零星资料。黄生民等(1988)从生化遗传学角度研究了滇池高背鲫、方正银鲫和云南本地鲫的酯酶、乳酸脱氢酶的酶谱。王蕊芳等(1988)从染色体水平对不同地理区域的鲫鱼进行了染色体组型与核仁组织区的分析。本文从分子生物学角度,运用 mt DNA 限制性内切酶分析技术探讨方正银鲫、白鲫和鲫的遗传差异。

材 料 与 方 法

一、材 料 方正银鲫(*Carassius auratus gibelio*)原产于黑龙江省;白鲫(*Carassius auratus cuvieri*)原产于日本;鲫(*Carassius auratus auratus*)系湖北省沙市市地方种。三种鲫鱼均取材于作者所在研究所鱼种场。

限制性内切酶及其缓冲液均从华美生物工程公司北京分公司购买。

二、方法 按张四明和龙华(1991)方法作进一步改进,具体步骤如下(在 0—4°C 下进行):

1 线粒体的提取 取新鲜卵巢(或肌肉)组织若干克,加 5 倍体积 STE-蔗糖缓冲液(10mM NaCl, 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 0.25M 蔗糖, pH7.5)。用玻璃匀浆器将细胞破碎。匀浆液用 1500 × g 离心 10 分钟,去胞核及碎片,重复两次。上清用 7000 × g 离心 25 分钟,连续两次,收集沉淀,再将沉淀用 STE-蔗糖缓冲液悬浮,用 20000 × g 离心 25 分钟收集线粒体。

2 mt DNA 提取 用适量 TE-葡萄糖缓冲液(50mM 葡萄糖, 10mM EDTA, 25mM Tris-HCl, pH8.0)悬浮线粒体,加两体积 SDS-碱性液(0.2M NaOH, 1% SDS)轻轻混合,冰浴 5—10 分钟,加 1/2 体积 5M 乙酸钾冰浴 5 分钟,20000 × g 离心 25 分钟,取上清用等体积苯酚/氯仿/异戊醇(25/24/1)抽提两次,取上清加两体积无水乙醇室温过夜,次日用 20000 × g 离心 30 分钟,收集 mt DNA,溶于适量灭菌水中,置 4°C 冰箱备用。

3 mt DNA 的酶切反应 单酶酶切时,在离心管中加十倍酶反应缓冲液 1.5μl 及适量 mt DNA,最后加限制性内切酶(约 2—3μl),反应总体积为 15μl,按各酶的最佳反应温度在水浴中反应 3.5 小时,再加 10mg/ml 的 RNA 酶 2μl,反应 0.5 小时,65°C 水浴 5 分钟终止反应。双酶酶切时,酶反应缓冲液各取一半,酶量各取一半,两酶同时加入,其它条件与单酶酶切相同。

4 琼脂糖凝胶电泳 凝胶浓度为 0.7%,溴化乙锭浓度为 0.5μg/ml,用 0.05% 溴酚蓝作指示剂,点样量为 20μl。室温电泳,电压 60 伏,时间 4—5 小时,电泳完毕,紫外灯下拍照。

5 酶切片断大小计算 每块凝胶均有 Lambda-DNA/Hind III + Eco RI 或 Lambda-DNA/Hind III 作为标准分子量,据标准片断的相对迁移率及已知的分子量绘出标准曲线,再据各片断的相对迁移率计算出该片断大小。

结 果

一、方正银鲫、白鲫和鲫的 mt DNA 大小比较

通过对方正银鲫、白鲫和鲫 mt DNA 单、双酶酶切片断的综合分析,得出方正银鲫、白鲫和鲫的 mt DNA 大小分别为 15990 ± 90 bp、16600 ± 130 bp 和 15540 ± 140 bp。据 1000 bp 相当于 0.66 × 10⁶ 道尔顿,三种鲫鱼的 mt DNA 分子量分别为(10.55 ± 0.06) × 10⁶ 道尔顿、(10.96 ± 0.09) × 10⁶ 道尔顿和(10.26 ± 0.09) × 10⁶ 道尔顿。

二、方正银鲫、白鲫和鲫 mt DNA 单酶酶切片断分析

在单酶酶切中,Hpa II、Msp I 和 Sau 3A I 是识别四碱基对序列的,Hinf I 是识别五碱基对序列的,它们产生的酶切片断多且小,在电泳图谱上带型复杂,很难进行定量分析。定性分析结果是:方正银鲫、白鲫和鲫的 mt DNA 经这四种酶酶切后,在电泳图谱上有明显差异(图 1),还观察到方正银鲫 mt DNA 经 Hpa II 酶切后的图谱,个体间亦有差异(图 2)。

在其余九种识别六碱基对的酶中,Eco RI、Dra I、Hind III、Pst I、Xba I 和 Sal I 在酶切 mt DNA 后,所产生的片断数目相同,即每种酶在三种鲫鱼 mt DNA 上的酶切位点数目分别相等,但并不意味着切点位置相同。而在经过 Bam HI、Sma I 和 Xho I 酶切后,则出现了一定差异(图 1,表 1)。

三、方正银鲫、白鲫和鲫 mt DNA 双酶酶切片断分析

双酶酶切时出现的片断较多,只选用其中八种识别六碱基对序列的酶进行双酶酶切

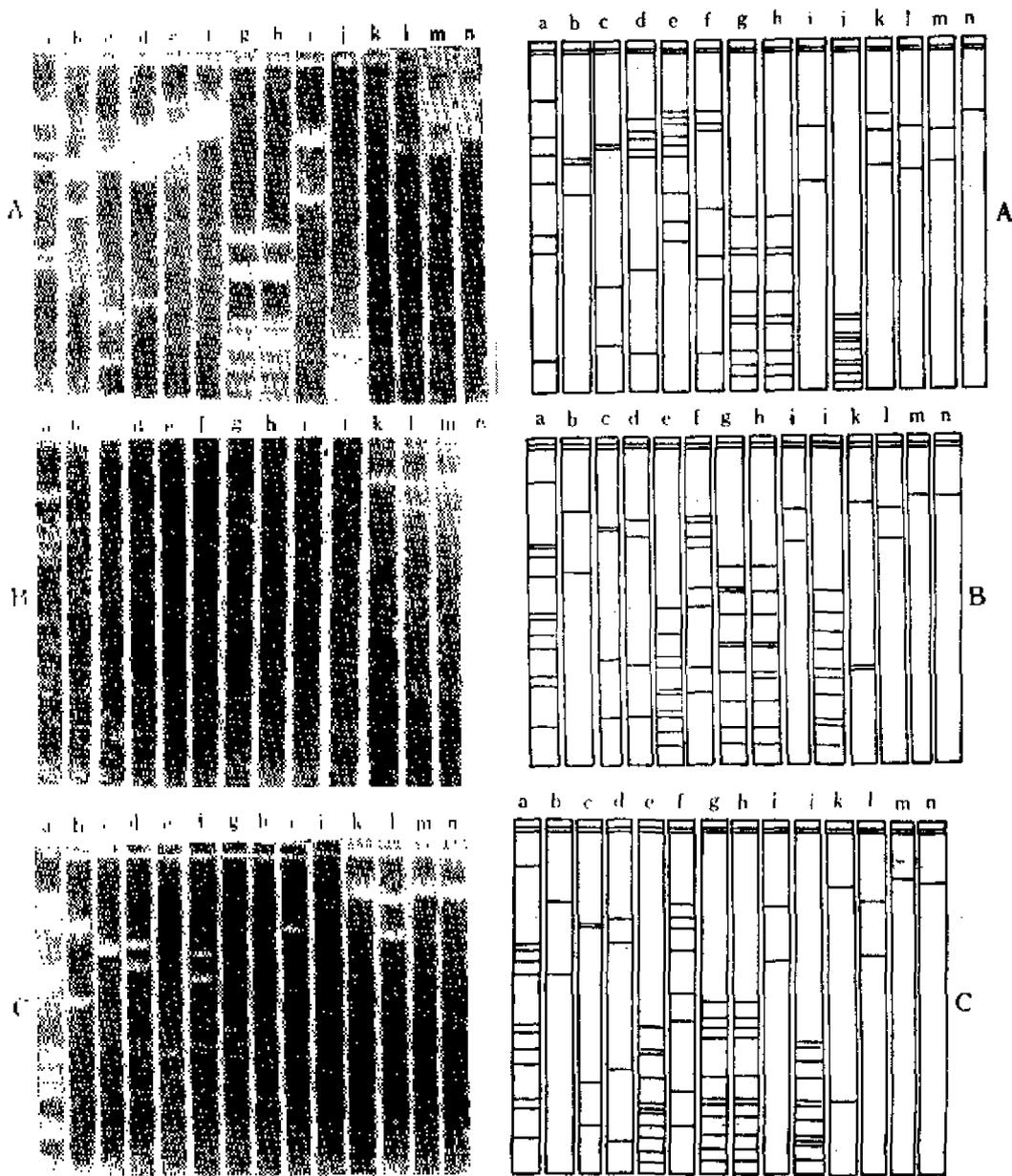


图1 方正银鲫(A)、白鲫(B)和鲫(C)mt DNA 单酶酶切电泳图(右:模式图)

Fig. 1 Agarose gel electrophoretic patterns of mt DNAs from *C. auratus gibelio* (A), *C. auratus cuvieri* (B) and *C. auratus auratus* (C) obtained by single-enzyme digestion (right: diagram)

aa, Lambda-DNA/HindIII; a, Lambda-DNA/Eco RI + Hind III; b, mt DNA/Bam HI; c, mt DNA/Eco RI; d, mt DNA/Dra I; e, mt DNA/Hinf I; f, mt DNA/Hinf III; g, mt DNA/Hpa II; h, mt DNA/Msp I; i, mt DNA/Pst I; j, mt DNA/Sau 8AI; k, mt DNA/Sma I; l, mt DNA/Xho I; m, mt DNA/Xho I; n, mt DNA/Sal I



图2 方正银鲫 mt DNA 的 Hpa II 酶切电泳图, 出现 a、b 两种带型

Fig. 2 Agarose gel electrophoretic patterns of mt DNA from the *C. auratus gibelio*, "a" and "b" represent two different patterns obtained with Hpa II digestion

表1 方正银鲫、白鲫与鲫 mt DNA 单酶酶切片断

Table 1 Fragments size of mt DNAs of *C. auratus gibelio*, *C. auratus cuvieri* and *C. auratus auratus* obtained by single enzyme digestion

酶	鱼名	酶切片断大小(kb)	合计
Bam HI	A	6.40+6.00+3.60	16.00
	B	13.00+3.60	16.60
	C	12.00+3.50	15.50
EcoRI	A	7.00+7.00+1.20+0.70	15.90
	B	7.30+7.30+1.20+0.60	16.40
	C	7.00+7.00+1.10+0.60	15.70
Dra I	A	7.50+6.30+1.50+0.60+ <u>15.90</u> + <u>9.60</u> + <u>6.90</u>	15.90
	B	9.00+6.00+1.10+0.60	16.70
	C	8.40+5.20+1.30+0.50	15.40
Hind III	A	9.80+2.70+1.70+1.10+0.60+ <u>16.10</u> + <u>12.50</u>	16.10
	B	7.40+4.90+2.30+1.10+0.80+ <u>9.70</u> + <u>6.00</u> + <u>3.10</u>	16.50
	C	6.80+4.80+2.20+1.00+0.60+ <u>11.60</u> + <u>8.40</u> + <u>2.80</u>	15.40
Pst I	A	11.50+4.40	15.90
	B	11.50+5.00	16.50
	C	11.00+4.40	15.40
Sma I	A	10.50+5.40+ <u>15.90</u>	15.90
	B	14.80+1.10+0.90	16.80
	C	14.50+0.90	15.40

续表

酶	鱼名	酶切片断大小 (kb)	合计
Xba I	A	11.00+4.90	15.90
	B	11.50+5.20	16.70
	C	11.00+4.60	15.60
Xho I	A	10.50+5.60	16.10
	B	16.70	16.70
	C	15.50	15.50
Sal I	A	16.20	16.20
	B	16.60	16.60
	C	15.40	15.40
平均长度	A		15.99±0.12
	B		16.61±0.31
	C		15.48±0.11

注: (1) A:方正银鲫; B:白鲫; C:鲫

(2) 数据下有横线者表示不完全酶切片断, 具体如下: 15.90=7.50+6.80+1.50+0.60; 9.60=7.50+1.50+0.60; 6.90=6.80+0.60; 16.10=9.80+2.70+1.70+1.30+0.60; 12.50=9.80+2.70; 9.70=7.40+2.30; 6.00=4.90+1.10; 8.10=2.80+0.80; 11.60=6.80+4.80; 8.40=6.80+1.00+0.60; 2.80=2.20+0.60; 15.90=10.50+5.40

反应, 结果见图 3 和表 2。

四、方正银鲫、白鲫和鲫 mt DNA 限制酶酶切图谱的建立

虽然进行了八种酶的双酶酶切, 但其中的 Sma I、Xho I、Hind III 和 Sal I 等四种酶在酶切图谱中的位置仍难确定。借助单、双酶酶切结果和酶切反应中部分不完全酶切片断数据(见表 1、表 2), 分别建立了方正银鲫、白鲫和鲫 mt DNA 由 Eco RI、Bam HI、Pst I 和 Xba I 等四种酶构建的酶切图谱(图 4)。

讨 论

本文报道的方正银鲫、白鲫和鲫 mt DNA 大小与已报道鱼类 mt DNA 大小基本相符(见表 3)。有关方正银鲫和白鲫 mt DNA 研究尚未见报道, 陈关君等(1984)只报道了鲫鱼 mt DNA 经 Bam HI 和 Eco RI 两种限制性内切酶的单、双酶的酶切结果, 鲫鱼 mt DNA 大小为 15210 bp, 与本文中鲫鱼 mt DNA 大小 15540 ± 140 bp 比较接近。Beckwitt 和 Aayagi (1987) 报道金鱼的 mt DNA 大小为 16100 ± 220 bp (引自 Billington 和 Hebert, 1988), 与本文结果相差较大, 这可能是因为金鱼是鲫鱼的变种所致。Billington 和 Hebert (1988) 发现 *Stizostedion vitreum* 的 mt DNA 分子大小为 168600 ± 160 bp, 而该种的 THA22 和 THA32 两系的 mt DNA 大小则分别为 18520 ± 110 bp 与 18540 ± 160 bp, 说明同种而不同系的鱼的 mt DNA 大小是有差异的。

再比较陈关君等(1984)的 Bam HI 和 Eco RI 单酶酶切片断, Bam HI 的酶切结果与本文结果基本一致, 均有两个大小基本相同的片段, 但 Eco RI 的酶切结果则与本文有

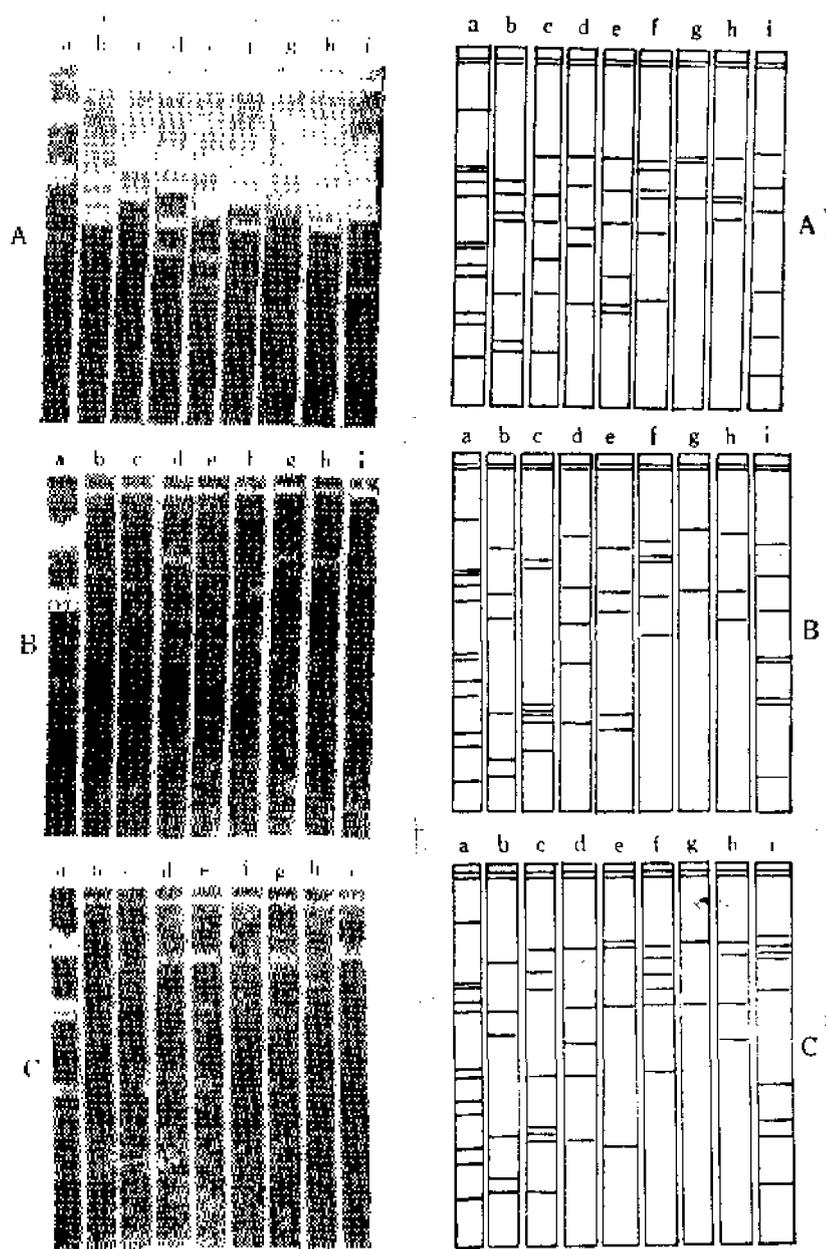


图3 方正银鲫(A)、白鲫(B)和鲫(C)mt DNA 双酶酶切电泳图(右:模式图)
 Fig. 3 Agarose gel electrophoretic patterns of mt DNAs from *C. auratus gibelio* (A), *C. auratus cuvieri* (B) and *C. auratus auratus* (C) produced by double-enzyme digestion (right: diagram)

a, Lambda-DNA/Eco RI + Hind III b, mt DNA/Bam HI + Eco RI c, mt DNA/Bam HI + Hind III
 d, mt DNA/Bam HI + Pst I e, mt DNA/Bam HI + Sma I
 f, mt DNA/Bam HI + Xba I g, mt DNA/Bam HI + Xho I
 h, mt DNA/Bam HI + Sal I i, mt DNA/Eco RI + Pst I

表2 方正银鲫、白鲫与鲫 mt DNA 双酶酶切片断
 Table 2 Fragment size of mt DNAs of *C. auratus gibelio*, *C. auratus cuvieri* and *C. auratus auratus* obtained by double enzyme digestion

酶	鱼名	酶切片断大小 (kb)	合计
Bam HI + Eco RI	A	4.40+3.60+2.90+2.60+1.20+0.70+0.60	16.00
	B	7.30+3.70+3.10+1.20+0.70+0.60	16.60
	C	7.00+3.50+2.70+1.10+0.70+0.60	15.60
Bam HI + Hind III	A	6.30+3.50+2.60+1.70+1.20+0.60	15.90
	B	6.10+5.10+1.30+1.10+1.10+1.00+0.80	16.50
	C	6.70+4.70+1.20+1.10+1.00+0.60+ <u>11.50</u> + <u>1.80</u>	15.90
Bam HI + Pst I	A	6.20+4.00+2.50+2.00+1.00	15.80
	B	10.70+2.80+1.90+1.00+ <u>3.80</u>	16.40
	C	10.20+2.50+1.80+1.00+ <u>3.50</u>	15.60
Bam HI + Sma I	A	6.70+3.80+2.60+1.40+1.00+0.90	16.00
	B	7.40+3.70+3.30+1.20+0.90	16.50
	C	11.00+3.50+0.90+ <u>14.50</u>	15.40
Bam HI + Xba I	A	5.00+4.00+3.50+2.30+1.10+ <u>6.10</u>	15.90
	B	5.40+5.20+3.50+2.40+ <u>7.60</u>	16.50
	C	5.40+4.60+3.50+2.10+ <u>11.00</u> + <u>8.90</u>	15.60
Bam HI + Xho I	A	6.30+6.20+3.50	16.00
	B	13.10+3.60	16.70
	C	12.00+3.50	15.50
Bam HI + Sal I	A	6.30+3.50+3.50+2.80	16.10
	B	10.00+3.60+2.80	16.40
	C	9.50+3.50+2.50+ <u>12.00</u>	15.50
Pst I + Eco RI	A	6.60+4.00+3.00+1.20+0.70+0.40	15.90
	B	7.30+4.70+1.70+1.30+1.20+0.60+ <u>3.00</u> + <u>1.80</u>	16.80
	C	7.00+4.30+1.70+1.20+0.90+0.60+ <u>15.70</u> + <u>9.90</u> + <u>8.50</u>	15.70
平均长度	A		15.95±0.09
	B		16.55±0.14
	C		15.53±0.13

注: (1) A:方正银鲫; B:白鲫; C:鲫

(2) 数据下有横线者表示不完全酶切片断, 具体如下: 11.50=6.70+4.70; 1.80=1.20+0.60; 3.80=2.80+1.00; 3.50=2.50+1.00; 14.50=11.00+3.50; 6.10=5.00+1.10; 7.60=5.20+2.40; 11.00=8.90+2.10; 8.90=5.40+3.50; 12.00=9.50+2.50; 3.00=1.70+1.30; 1.80=1.20+0.60; 15.70=7.00+4.30+1.70+1.20+0.90+0.60; 9.90=7.00+1.70+1.20; 8.50=7.00+0.90+0.60。

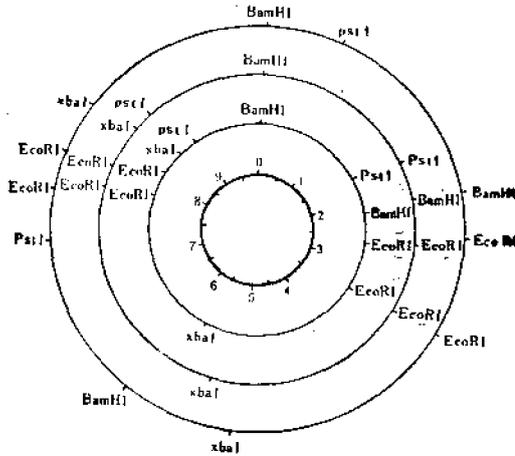


图4 方正银鲫、白鲫和鲫 mt DNA 限制酶酶切图谱(外、中、内三圈分别代表方正银鲫、白鲫和鲫的 mt DNA)

Fig. 4 Restriction maps of mt DNAs from *C. auratus gibelio*, *C. auratus cuvieri* and *C. auratus auratus* (outside, middle and inside circles represent mt DNAs of *C. auratus gibelio*, *C. auratus cuvieri* and *C. auratus auratus* separately)

表3 已报道鱼类 mt DNA 分子大小

Table 3 Reported molecular lengths for mt DNAs in fish species

鱼 名	大小 (bp)	文 献
<i>Lepomis macrochirus</i>	16200	未注明出处的均引自 本文文献[9]。
<i>Katsuwonus pelamis</i>	16900	
<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	16670	
<i>Salmo gairdneri</i>	16670	
<i>Salmo trutta</i>	16670	
<i>Salvelinus fontinalis</i>	16670	
<i>Scorpaena guilata</i>	19500 ± 300	
<i>Sebastes atrovirens</i>	17300 ± 400	
<i>Sebastes caurinus</i>	17400 ± 400	
<i>Sebastes melanostomus</i>	17200 ± 400	
<i>Sebastes mystinus</i>	16900 ± 400	
<i>Scomber japonicus</i>	16700	
<i>Salmo salar</i>	16500 ± 500	
<i>Oncorhynchus kisutch</i>	16500 ± 500	
<i>Oncorhynchus nerka</i>	16500 ± 500	
<i>Oncorhynchus gorbuscha</i>	16500 ± 500	
<i>Oncorhynchus keta</i>	16500 ± 500	
<i>Salmo gairdneri</i>	16500 ± 500	
<i>Carassius auratus</i>	16100 ± 220	
<i>Salvelinus namaycush</i>	16800 ± 200	
<i>Stizostedion canadense</i>	16700 ± 260	
<i>Stizostedion lucioperca</i>	16700 ± 280	
<i>Stizostedion vitreum</i>	16860 ± 160	
<i>Stizostedion vitreum</i> (THA22)	18520 ± 110	
<i>Stizostedion vitreum</i> (THA32)	18540 ± 160	
<i>Carassius auratus</i>	15210	陈关君等(1984) 陈关君等(1984) 张四明、龙 华(1991)
<i>Cyprinus carpio</i>	16990	
<i>Ophiocephalus argus</i>	17200	
<i>Carassius auratus gibelio</i>	15990 ± 90	
<i>Carassius auratus cuvieri</i>	16600 ± 130	
<i>Carassius auratus auratus</i>	15540 ± 140	本项研究 本项研究

较大差异,前者有三个片断,本文结果有四个片断。产生以上差异的原因,可能是由于遗传多态性所致。至于同种鱼出现的某一酶的酶切位点多态现象,则在淡水鱼类中广泛存在^[7~9,11~12,14~17]。

从分析过的十三种限制性内切酶酶切结果以及建立的方正银鲫、白鲫和鲫 mt DNA 限制性酶切图谱看来,可以初步判断:三者相比,白鲫与鲫在遗传关系上稍近些;方正银鲫、白鲫、鲫同属一个种。由于方正银鲫在核染色体倍性(三倍体)与生殖方式(雌核发育)上与白鲫和鲫不同,这些差异是否也反映到 mt DNA 结构上,还待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 王蕊芳等,1988.不同地理区域鲫鱼染色体银染—核仁组织者的比较研究。动物学研究,9(2):165—170。
- [2] 陈关君等,1984.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,11(2):141—146。
- [3] 张四明,龙华,1991.乌鳢线粒体 DNA 限制性内切酶酶切分析。淡水渔业,4:88—99。
- [4] 黄生民等,1988.滇池高背鲫和方正银鲫酯酶、乳酸脱氢酶同工酶的比较研究。动物学研究,9(1):69—78。
- [5] Avise, et al., 1979. The use of restriction endonuclease to measure mitochondrial DNA sequence relatedness in natural population. I. Population structure and evolution in the genus *peromyscus*. *Genetics*, 92: 279—295.
- [6] Avise, J. C. et al., 1984. Characterization of mitochondrial DNA variability in hybrid swarm between sub-species of bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*). *Evolution*, 38: 931—941.
- [7] ———, 1986. Mitochondrial DNA differentiation in North Atlantic eel: population genetic consequence of an unusual life history pattern. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 83: 4350—4354.
- [8] Avise, J. C. and N. C., Saunders, 1984. Hybridization and introgression among species of sunfish (*Lepomis*): analysis by mitochondrial DNA and allozyme markers. *Genetics*, 108: 237—255.
- [9] Billington, N. and P. D. N., Hebert, 1988. Mitochondrial DNA Variation in great lake walleye (*Stizostedion Vitreum*) population. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 45: 648—654
- [10] Brown, W. N. et al., 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 76: 1967—1971.
- [11] Fundenstein, B. et al., 1990. Restriction site polymorphism of mitochondrial DNA of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*) broodstock in Eilat, Israel. *Aquaculture*, 89: 217—223.
- [12] Grewe, P. M. and P. D. N. Hebert, 1988. Mitochondrial DNA diversity among broodstocks of the lake trout, *Salvelinus namaycush*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 45: 2114—2122.
- [13] Gyllenstein, V. et al., 1985. Maternal inheritance of mitochondrial DNA during back crossing of two species of mice. *J. Hered.*, 76: 321—324.
- [14] Lansman, R. A. et al., 1981. The use of restriction endonucleases to measure mitochondrial DNA sequence relatedness in natural population, *J. Mol. Evol.*, 17: 214—226.
- [15] Moritz, C. et al., 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Ann. Rev. Ecol. sys.*, 18: 289—292.
- [16] Palva, T. K. et al., 1989. Identification of anadromous and nonanadromous salmon stock in Finland by mitochondrial DNA analysis. *Aquaculture*, 81(314): 237—244.
- [17] Parker, R. C. et al., 1977. Mapping of closed circular DNAs by cleavage with restriction endonuclease and calibration by agarose gel electrophoresis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 74: 851—855.

COMPARATIVE STUDY ON RESTRICTION ENDONUCLEASE
DIGESTION OF mtDNAs FOR *CARASSIUS AURATUS*
GIBELIO, *CARASSIUS AURATUS CUVIERI* AND
CARASSIUS AURATUS AURATUS

Zhang Siming, Long Hua and Zhaug Xingzhong

(Yangtze River Fisheries Research Institute, Shashi 434000)

ABSTRACT The mitochondrial DNAs (mtDNAs) of *Carassius auratus gibelio*, *Carassius auratus cuvieri* and *Carassius auratus auratus* were digested by thirteen restriction endonucleases, viz. *Bam* HI, *Eco* RI, *Dra* I, *Hinf* I, *Hind* III, *Hpa* II, *Msp* I, *Pst* I, *Sau* 3AI, *Sma* I, *Xba* I, *Xho* I and *Sal* I. The double enzyme digestions were conducted by using *Bam* HI, *Eco* RI, *Hind* III, *Sma* I, *Xba* I, *Sal* I and *Pst* I. The fragments were obtained and their molecular sizes were estimated by agarose gel electrophoresis. The size of mtDNAs for *C. auratus gibelio*, *C. auratus cuvieri* and *C. auratus auratus* are $15990 \pm 90\text{bp}$, $16600 \pm 130\text{bp}$ and $15540 \pm 140\text{bp}$ respectively. The experimental results demonstrated that the electrophoretic patterns of mtDNAs for *C. auratus gibelio*, *C. auratus cuvieri* and *C. auratus auratus* obtained by either single or double enzyme digestion were significantly different, and the patterns of *C. auratus gibelio* were obviously different among individuals by using *Hpa* II. Besides, the restriction maps of mtDNAs from above species were constructed by using *Bam* HI, *Pst* I, *Eco* RI and *Xba* I.

KEYWORDS mitochondrial DNA, restriction endonuclease, *Carassius auratus gibelio*, *Carassius auratus cuvieri*, *Carassius auratus auratus*