

三索线蛇与过树容蛇肝线粒体DNA 的纯化与限制酶图谱

罗进贤 陈守才* 吴应积

(生物学系)

摘 要

用Sepharose 4 B凝胶柱过滤和NaCl离心法纯化了三索线蛇及过树容蛇肝线粒体DNA(mtDNA),它们的分子长度分别为17.75kb及19.70kb.分别用EcoR I, Xba I, BamH I及Bgl I等4种限制酶消化这两种mtDNA,结果表明:EcoR I, Xba I, BamH I和Bgl I在三索线蛇肝mtDNA上分别有1, 1, 2及3个切点;在过树容蛇肝mtDNA上各有4, 1, 1和2个切点.根据mtDNA的单酶、双酶和部份酶解片段的分析,建立了三索线蛇及过树容蛇肝mtDNA的限制酶图谱.

关键词 物理图, mtDNA, 三索线蛇, 过树容蛇

线粒体DNA是细胞核外具有自主复制、转录和翻译能力的遗传因子^[1].由于结构和组成简单, mtDNA是研究真核细胞DNA复制、表达及其调控的良好模型^[2],成为分子生物学的重要领域. mtDNA还与真菌和植物细胞中的质粒有关,很可能成为真核遗传工程的有用载体^[3,4].

线粒体DNA的纯化和限制酶图谱的构建,是线粒体基因表达调控研究及分子克隆等研究的基础,也是研究高等生物进化及其亲缘关系的有用技术^[5~9].本研究纯化了三索线蛇(*Elaphe radiata*)及过树容蛇(*Dendrophis toiga toiga*)肝线粒体DNA,并构建了这两种mtDNA的限制酶图谱.

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 三索线蛇及过树容蛇肝 由广州市南方野生动物店提供.

1.1.2 重要的生化试剂 限制酶EcoR I, BamH I, Bgl I, Xba I为美国BRL公司产品,限制酶Hind III为本室制备. Sepharose 4 B为Pharmacia公司产品.

本文1988年2月17日收到

*华南热带作物学院

1.2 缓冲液

A: 0.25mol/L蔗糖—0.01mol/L Tris—1mmol/L EDTA (pH7.5);

B: 0.25mol/L蔗糖—0.05mol/L Tris—7mmol/L MgCl₂ (pH7.5);

C: 0.25mol/L蔗糖—0.05mol/L Tris—0.1mol/L NaCl—0.01mol/L EDTA (pH8.5);

D: 0.01MTris—2mol/L NaCl—1mmol/L EDTA (pH8.5).

1.3 线粒体DNA的纯化

1.3.1 线粒体的制备 把新鲜蛇肝剪去脂肪及结缔组织后称重,剪成小块,用DS-200型高速组织捣碎机破碎10~15s,加肝重6~8倍体积的缓冲液A稀释,纱布过滤,1000×g离心20min,取出上清液,15000×g离心40min沉淀线粒体,再悬浮于适量缓冲液B中,加牛胰DNase,使终浓度达到100μg/ml,25℃保温30min,冷却后加入2倍体积的0.25mol/L蔗糖—0.1mol/L EDTA (pH8.0)溶液,15000×g离心45min,沉淀再用上述溶液洗一次,得纯净线粒体。

1.3.2 线粒体DNA的纯化 将线粒体悬浮于适量缓冲液C中,加10%SDS至终浓度为1.0%,37℃保温10min,在冰浴中冷却后加5mol/L NaClO₄至终浓度为1mol/L,置冰箱放置2h,5000×g离心20min,上清液用0.5倍体积的氯仿—异戊醇(24:1)反复抽提数次,最后用2.5倍体积的冷乙醇沉淀mtDNA,收集沉淀溶于缓冲液D中,得粗mtDNA溶液。粗mtDNA的纯化采用如下两种方法:4%珠状琼脂糖(Sephrose 4B)凝胶柱过滤法:柱(72×2cm)先用缓冲液D平衡,上样后用同一缓冲液洗脱,流速0.4ml/min,每4ml收集一管,测OD₂₆₀,收集含mtDNA各管,对TE缓冲液(10mmol/L Tris, 1mmol/L EDTA, pH8.0)透析,用PEG20000浓缩,2.5倍体积冷乙醇沉淀,离心收集纯化mtDNA。

1mol/L NaCl离心法:粗mtDNA用RNase A处理除去RNA后用氯仿—异戊醇抽提两次,于5ml离心管中加4ml 1mol/L NaCl,上面加1ml粗mtDNA样品,用日立55P-2超速离心机40000rpm离心6h,收集沉淀溶于TE缓冲液中。

1.4 mtDNA的限制酶消化

酶解反应缓冲液按美国BRL公司提供配方。单酶切反应总体积20~30μl,mtDNA 0.5μg,37℃反应2h。双酶消化时,反应体积30~40μl,mtDNA 1μg,两种酶同时加入,缓冲液各取一半,37℃反应3h。

1.5 凝胶电泳和分子量测定

采用1%的琼脂糖平板(200×250×3.5mm)凝胶电泳,Tris—醋酸缓冲液,80V电泳8h,用0.5μg/ml溴化乙锭染色后照相。按Southern计算DNA片段MW的公式^[10]编写程序,以λ-DNA的Hind III单酶切或EcoR I, Hind III双酶切片段作为MW标准,将已知与未知MW片段大小及其迁移率输入微型计算机,测定未知大小的DNA片段的MW。

1.6 酶解片段的命名

单酶解片段根据MW由大到小的顺序，用该酶的名称及英文大写字母表示，如EcoR I -A, EcoR I -B, Xba I -A等。双酶解片段用两种酶的名称加英文大写字母表示，如Bgl II /EcoR I -A.部份酶解片段用该酶的名称及英文小写字母表示如EcoR I -a, EcoR I -b等。

2 实验结果与讨论

2.1 mtDNA的纯化与鉴定

经Sepharose 4 B凝胶柱过滤法，纯化三索线蛇肝mtDNA在OD₂₆₀处有二个峰(图1 a)，凝胶电泳分析表明：峰I为mtDNA，峰II为RNA。在琼脂糖凝胶电泳上此mtDNA表现为两条带(图1 b)，分别为超盘绕和开环两种构型。这两种mtDNA的分子长度按凝胶电泳估计分别为17.75kb(三索线蛇，图2，表1)及19.70kb(过树容蛇，图2，表1)

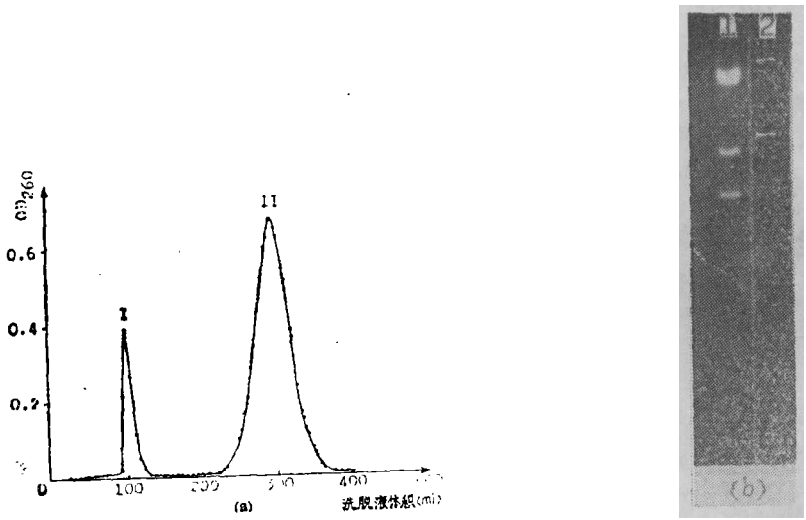


图1 (a) Sepharose 4 B柱过滤法纯化三索线蛇肝mtDNA.

(b) 纯化的三索线蛇肝mtDNA的电泳图

Fig.1 (a) Purification of liver mtDNA from Elaphe radiata on Sepharose 4B

(b) Agarose gel electrophoresis of purified liver mtDNA from Elaphe radiata

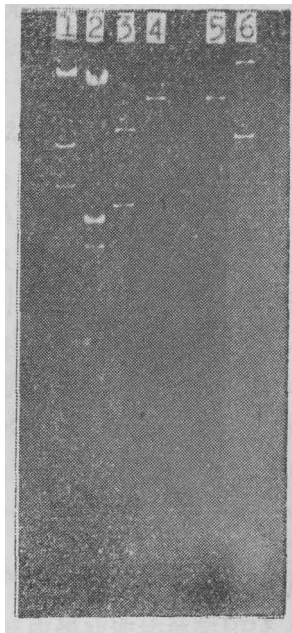
(1) λ-DNA + Hind III, (2) mtDNA

2.2 mtDNA的酶解反应

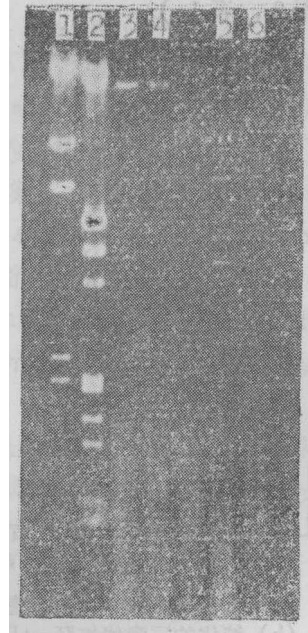
分别用EcoR I, BamH I, Xba I及Bgl II四种限制酶消化三索线蛇及过树容蛇肝mtDNA，结果如图2。从图上可见EcoR I, Xba I, BamH I及Bgl II在三索线蛇肝mtDNA上分别有1、1、2及3个切点；在过树容蛇肝mtDNA上有Xba I, BamH I切点各1个，Bgl II切点2个，EcoR I切点4个，片段大小列于表1。

表1 三索线蛇和过树容蛇肝mtDNA酶切片段大小
Tab. 1 Fragment size of liver mtDNA from *Elaphe radiata* and *Dendrophis boiga boiga*

	<i>Elaphe</i>	<i>Dendrophis</i>
ECORI	A:17.75(kb)	A:7.20 (kb) B:4.60 C:4.08 D:3.75
BamH I	A:12.54 (kb) 5.24	A:19.70 (kb)
Xba I	A:17.75 (kb)	A:19.70 (kb)
Bgl I	A:10.30 (kb) B: 5.84 C: 1.58	A:17.67 (kb) 2.10



A



B

图2 蛇肝mtDNA的酶解片段电泳图

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of restriction fragments of mtDNA

A. 三索线蛇 *Elaphe radiata*, B. 过树容蛇 *Dendrophis boiga boiga*

1. λ DNA + Hind III, 2. λ DNA + Hind III + EcoR I,
3. mtDNA + BamH I, 4. mtDNA + Xba I,
5. mtDNA + EcoR I, 6. mtDNA

为了建立mtDNA的限制酶图谱,用EcoR I, Xba I, BamH I及 Bgl I四种酶对以上两种mtDNA进行交叉双酶解,结果见图3及表2、表3。

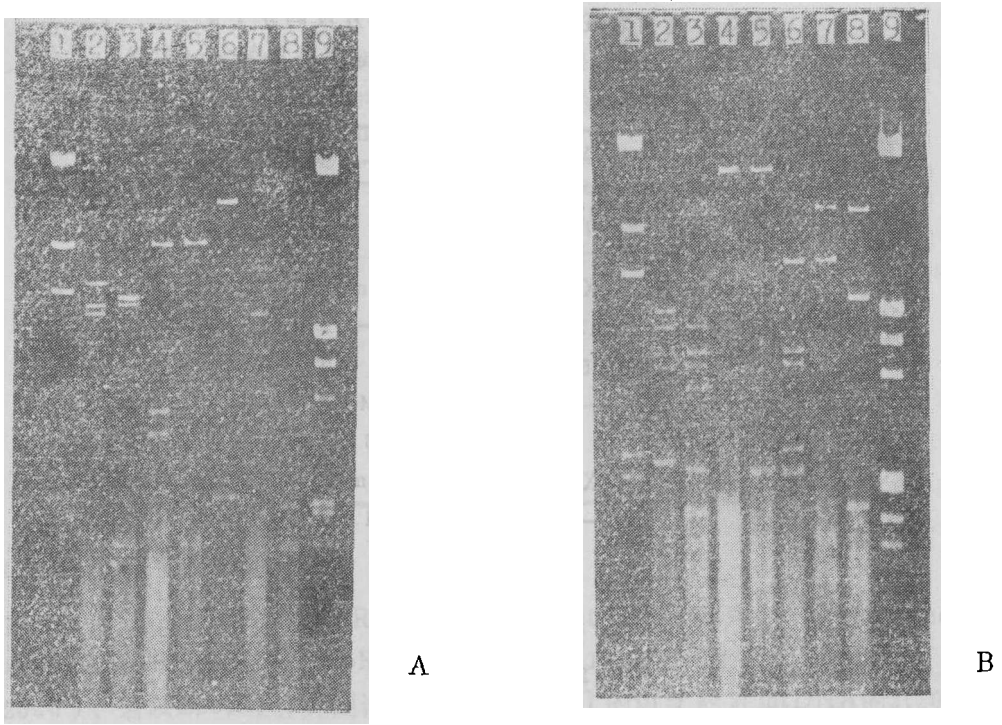


图 3 蛇肝mtDNA的双酶解电泳图

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of restriction fragments of double digestion of mtDNA

- A. 三索线蛇 *Elaphe radiata*, B. 过树容蛇 *Dendrophis boiga boiga*
 1. λ DNA + Hind III, 2. mtDNA + BamH I + EcoR I, 3. mtDNA + EcoR I + Bgl I
 4. mtDNA + BamH I + Bgl I, 5. mtDNA + Bgl I, 6. mtDNA + Xba I + EcoR I
 7. mtDNA + Xba I + BamH I, 8. mtDNA + Xba I + Bgl I, 9. λ DNA + Hind III + EcoR I

表 2 三索线蛇肝mtDNA双酶解片段分子量(kb)

Tab. 2 Fragment sizes of double digestion of liver mtDNA from *Elaphe radiata*

EcoR I	× Xba I			
A 17.75	A ₁ 15.55			
	A ₂ 2.20			
BamH I	× Xba I		× EcoR I	
A 12.54	A ₁ 7.80	A ₁ 7.00		
	A ₂ 4.80	A ₂ 5.55		
B 5.22	—	—		
Bgl I	× Xba I		× EcoR I	× BamH I
A 10.31	A ₁ 8.39	A ₁ 6.20	A ₁ 9.63	
	A ₂ 1.92	A ₂ 4.10	A ₂ 0.68	
B 5.86	—	—	B ₁ 3.12	
			B ₂ 2.77	
C 1.58	—	—	—	

表3 过树容蛇肝mtDNA双酶解片段的分子量
Tab. 3 Double digestion fragment sizes of liver mtDNA from *Dendrophis boiga boiga*

BanH I	× Xba I		
A 19.70	A ₁ 12.46		
	A ₂ 7.26		
Bgl I	× Xba I		× BamHI
A 17.60	A ₁ 12.00	A ₁ —	
	A ₂ 5.60		
B 2.10	B ₁ —	B ₁ 1.64	
		B ₂ 0.46	
EcoR I	× Xba I		× BamH I
A 7.22	—	A ₁ 5.01	× Bgl I
		A ₂ 2.22	A ₁ 3.37
			A ₂ 2.10
			A ₃ 1.76
B 4.46	B ₁ 2.38	—	—
	B ₂ 2.24		
C 4.08	—	—	—
D 3.78	—	—	—

(表2、3中,第一纵列为单酶解片段,其余为双酶解片段)

同时用EcoR I对过树容蛇肝mtDNA进行部份酶解,以弄清EcoR I切点的相对位置,结果如图4及表4。

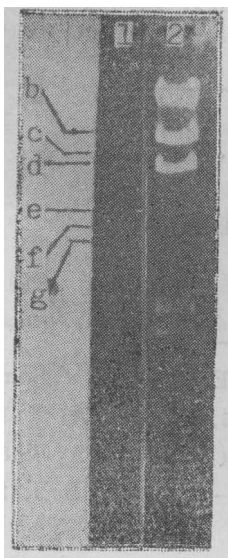


图4 过树容蛇肝mtDNA EcoR I部份酶解片段的电泳图

Fig. 4 Agarose gel electrophoresis of EcoR I partial digestion fragments of *Dendrophis boiga boiga* mtDNA

1. mtDNA + EcoR I
2. λDNA + Hind III

表4 过树容蛇肝mtDNA的EcoRI部份酶解片段大小
Tab. 4 Fragment sizes of *Dendrophis boiga boiga* mtDNA
by EcoR I partial digestion

Partial fragments	size (kb)	corres ponding complete fragments
EcoR I -b	11.33	A + C
c	8.40	B + D
d	7.22	A
e	4.62	B
f	4.08	C
g	3.78	D

2.3 mtDNA限制酶图谱的建立

2.3.1 三索线蛇肝mtDNA EcoR I和Xba I在此mtDNA上都只有一个切点,EcoR I与Xba I双酶解产生二个片段EcoR I/Xba I-A₁(15.55kb)及EcoR I/Xba I-A₂(2.20kb),若以EcoR I作为图谱的零点,则Xba I的切点应在mtDNA的2.20kb位置上,即在环形图谱的12.39%处。

BamH I在mtDNA上有两个切点产生BamH I-A(12.54kb)及BamH I-B(5.24kb)两个片段,BamH I-A被EcoR I切成BamH I/EcoR I-A₁(7.00kb)及BamH I/EcoR I-A₂(5.55kb)两个片段,Xba I亦把BamH I-A切成两个片段BamH I/Xba I-A₁(7.8kb)及BamH I/Xba I-A₂(4.8kb),由此可知,BamH I/EcoR I-A₁(7.00kb)片段应在零点的右边,BamH I的两个切点分别在mtDNA的7.00kb及12.22kb的位置上,分别对应于圆形图谱的39.44%及68.85%处。

Bgl II在此mtDNA上有三个切点,形成Bgl II-A(10.30kb),Bgl II-B(5.84kb)及Bgl II-C(1.58kb)三个片段,其中Bgl II-A被EcoR I切成Bgl II/EcoR I-A₁(6.20kb)和Bgl II/EcoR I-A₂(4.10kb)两个片段。由于Xba I在2.2kb处有一个切点,而Bgl II/Xba I-A₁片段为8.39kb=6.2kb+2.2kb,可见,Bgl II/EcoR I-A₁(6.2kb)应在零点左边。据此可以确定Bgl II的一个切点在4.1kb处,另一个切点在11.54kb处。从片段Bgl II/BamH I-B₁(3.12kb)和Bgl II/BamH I-B₂(2.87kb)可以推导出第三个切点在9.96kb的位置上,这三个切点分别在环状图谱的23.10%,56.11%及65.01%处。

根据上述数据得出三索线蛇肝mtDNA线状及环形图谱如图5。

2.3.2 过树容蛇肝mtDNA BamH I及Xba I在过树容蛇肝mtDNA上均只有一个切点,而BamH I及Xba I双酶解产生BamH I/Xba I-A₁(12.46kb)及BamH I/Xba I-A₂(7.24kb)二个片段,现以BamH I切点为环形图谱的零点,则Xba I切点应在环形图谱的36.75%处。

Bgl II在mtDNA上有二个切点产生Bgl II-A(17.67kb)及Bgl II-B(2.10kb)

两个片段。Bgl II—B被BamH I切成Bgl II/BamH I--B₁(1.64kb)和Bgl II/BamH I—B₂(0.46kb)两个片段,而Bgl II—A被Xba I切成Bgl II/Xba I—A₁(12.00kb)及Bgl II/Xba I—A' (5.60kb)二个片段,据此可知, Bgl II的两个切点在1.64kb和19.24 kb处, 对应于环形图谱8.32%和97.66%的位点上。

EcoR I在mtDNA上有四个切点,从EcoR I与Xba I, EcoR I与BamH I及EcoR I与Bgl II的双酶解片段分析,可以确定EcoR I的三个切点分别在5.01kb, 9.36kb和17.48kb处, 对应于环形图谱的25.43%, 48.88%和86.29%位置上。尚有一个切点尚未确定, 为此进行EcoR I的部份酶解, 结果如图6。根据EcoR I部份酶解片段分析, 部份酶解片段EcoR I—C(8.40 kb)刚好等于完全酶解片段EcoR I—B(4.62kb)与EcoR I—D(3.78kb)的和而EcoR I—b(11.33kb)等于EcoR I—A(7.72kb)及EcoR I—C(4.08kb)的和。可见, EcoR I单酶解片段的排列顺序是: A—B—D—C, 即待确定的切点应在mtDNA的13.41kb或环形图谱的68.07%处。根据以上数据建立过树容蛇肝mtDNA的限制酶图谱如图6。

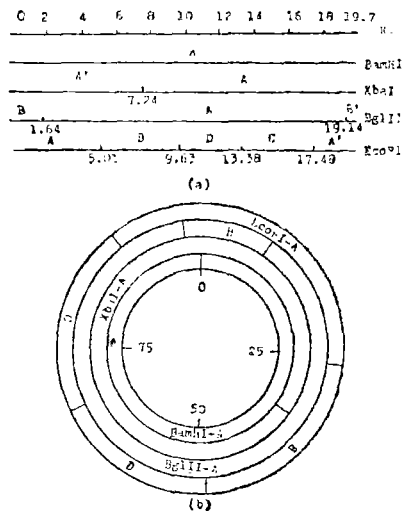
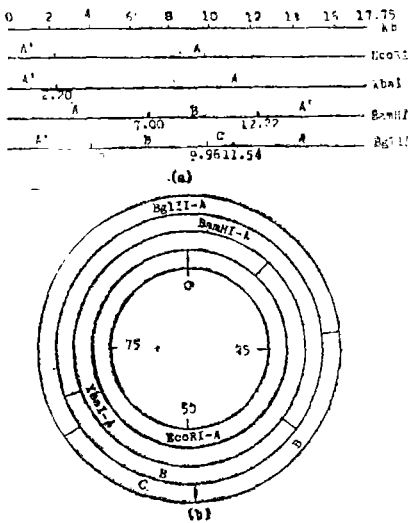


图5 三索线蛇肝mtDNA的限制酶图谱
(a) 线形图谱, (b) 环形图谱
Fig. 5 Restriction map of liver mtDNA from *Elaphe radiata*
(a) Linear map, (b) Circular map

图6 过树容蛇肝mtDNA的限制酶图谱
(a) 线形图谱, (b) 环形图谱
Fig. 6 Restriction map of liver mtDNA from *Dendrophis boiga boiga*
(a) Linear map, (b) Circular map

本文采用Sephrose 4 B柱过滤法及NaCl离心法纯化了三索线蛇及过树容蛇肝mtDNA, 并通过交叉双酶解及部份酶解法建立了这两种mtDNA的EcoR I, Xba I, BamH I及Bgl II四种限制酶的物理图。从酶解结果及限制酶图谱分析, 这两种 mtDNA之间在碱基上的同源性不大, 与已知的哺乳动、鸟类、两栖类等的mtDNA的酶切图谱比较, 差异更大, 这表明: mtDNA的碱基排列在进化上是变异迅速的。

参 考 文 献

- [1] Borst P, *Ann. Rev. Biochem.*, 41 (1981), 333
- [2] Clayton D A et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 96 (1984), 573
- [3] Atchison B A et al., *Ann. Rev. Biochem.*, 53 (1980), 580
- [4] Stahl U et al., *PNAS USA.*, 79 (1982), 3641
- [5] Ojala D et al., *Plasmid*, 1 (1979), 78
- [6] Kobayashi M et al., *Gene*, 6 (1979), 123
- [7] Bogler S A, *Mol. Biochem. Parasitology*, 8 (1983), 145
- [8] Berg W J, *Fish Aquat. Sci.*, 41 (1984), 1041
- [9] Johnson M J et al., *American Journal of Human Genetics*, 38 (1986), 341
- [10] Southern E M, *Analytical Biochemistry*, 100 (1979), 319

The Purification and Restriction Map of Liver Mitochondrial DNA from *Elaphe radiata* and *Dendrophis boiga boiga*

Luo Jinxian* Chen Shouchai Wu Yingji

Abstract

Liver mitochondrial DNA from *Elaphe radiata* and *Dendrophis boiga boiga* were purified by gel filtration on a sepharose 4B column or by ultracentrifugation in 1M NaCl. Their molecular sizes are 17.75Kb and 19.70Kb respectively as estimated by agarose gel electrophoresis. The mtDNAs were digested with restriction endonucleases EcoRI, XbaI, BamHI and BglII and, 1, 1, 2, and 3 cutting sites were found on *Elaphe radiata* mtDNA and 4, 1, 1 and 2 sites on *Dendrophis boiga boiga* mtDNA. The restriction maps were built according to the data from single, double and partial digestions of these mtDNAs by the above 4 restriction endonucleases.

keywords restriction map, mtDNA, *elaphe radiata*, *dendrophis boiga boiga*

*Department of Biology