

· 研究简报 ·

滑鼠蛇肝线粒体DNA的制备及性质测定

吴应积*

(生物学系)

摘 要

报导了用蛇肝脏制备线粒体DNA的简便方法。电镜分析结果表明,滑鼠蛇肝 mt DNA 为环状分子,周长 $5.23\mu\text{m}$ 。限制性内切酶 PstI, BamHI 和 EcoRI 在滑鼠蛇肝 mt DNA 上分别有 2、3 和 4 个点切。根据各酶切片段的大小测得 mt DNA 的平均分子量为 16.91kb 或 10.85×10^6 dalton。

关键词 滑鼠蛇肝, 线粒体DNA, 纯化和性质

自从60年代初发现线粒体DNA(mtDNA)以来,线粒体基因组的研究日益受到重视。本文对滑鼠蛇(Ptyas mucosus, 又名水律蛇)肝脏mtDNA进行了初步研究,建立了大规模制备的简便方法,进行了电镜观察和分子量测定,为建立滑鼠蛇mtDNA的限制酶图谱打下了基础。

1 材料和方法

1.1 材料 滑鼠蛇肝,由广州蛇餐馆供给。牛胰DNase(Sigma),4%珠状琼脂糖凝胶(上海东海制药厂),EcoRI与PstI(Boehringer Mannheim),BamHI(本室自制),其余均为常规生化试剂和国产分析纯试剂。

1.2 线粒体DNA的制备 参照赵邦梯等人^[1]的方法加以改进。

新鲜滑鼠蛇肝脏,除去肝膜及结缔组织后,将肝组织剪碎成小块。经洗涤除去血污及胆汁后,用DS-200高速组织捣碎机破碎细胞,匀浆液用3层纱布过滤。滤液用差速离心法分离线粒体。用牛胰DNase除去线粒体外的染色体DNA。经洗涤后,得到纯化的线粒体。

线粒体经裂解后,用氯仿抽提一次,接着用等体积的饱和酚—氯仿—异戊醇(v:v:v=25:24:1)反复抽提至界面不再出现变性蛋白为止。再用氯仿抽提一次除酚。用酒精沉淀mtDNA。离心分离后,沉淀直接用3—5 ml上柱洗脱缓冲液(0.01M Tris—

本文1987年9月收到

● 85届生化专业毕业生吴子宁、曾庆、陈英姿参加工作

HCl, 2M NaCl, 1mM EDTA, pH8.5)溶解, 然后上柱纯化。

4%珠状琼脂糖凝胶柱(72×2cm), 先用洗脱缓冲液平衡。样品上柱后, 用洗脱缓冲液洗脱, 流速为0.5ml/min, 每5ml收集一管。测定OD₂₆₀值, 将mtDNA峰的各管合并, 对TE缓冲液(0.01M Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8.0)透析, 换透析液3次。然后用聚乙二醇(M.W.12,000)反透析, 浓缩至2ml左右。加入0.1体积2M NaAc, 再加2.5倍体积预冷的95%乙醇, 混匀, 253.16°k冰箱过夜, 经277.16°k10000×g离心10分钟, 取沉淀。用70%乙醇洗沉淀一次, 即得纯化的mtDNA。真空干燥后, 溶于少量TE缓冲液中, 277.16°k冰箱保存。

1.3 琼脂糖凝胶电泳 用水平平板电泳仪, 电泳液为Tris-硼酸缓冲液(0.089M Tris, 0.089M硼酸, 2.5mM EDTA, pH8.3)。DNA鉴定用凝胶平板长10cm, DNA片段分子量测定用凝胶平板长20cm。电泳电压40—80V。

1.4 mt DNA 限制酶片段分子量的测定 BamHI反应液(20mM Tris-HCl, 7mM MgCl₂, 100mM NaCl, 2mM β-巯基乙醇, pH8.0), EcoRI反应液(50mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂, 50mM NaCl, 1mM二巯基苏糖醇, pH7.5), 以及PstI反应液(20mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂, 50mM (NH₄)₂SO₄, 100μg/ml牛血清白蛋白, pH7.5)均参照美国Bethesda研究实验室1983年产品目录(Bethesda Research Laboratories, Inc. 1983 Catalog)。反应总体积30—50μl。每个反应中加mtDNA约1μg, 37°C反应1—2小时。用终止液(50%甘油, 0.05%溴酚蓝, 0.2M EDTA, pH8.0)终止反应。以λDNA/BamHI, λDNA/EcoRI, λDNA/Hind III片段^[2]作为分子量标准。

1.5 化学分析 DNA含量测定采用吸收光谱法, RNA含量测定用地衣酚法, 蛋白质含量测定采用Lowry法。

1.6 mtDNA的电镜观察 根据Kleinschmidt^[3]和徐有成等^[4]的方法制样。DNA的展开在室温下进行。复盖碳膜的铜网蘸上DNA样品后, 用5×10⁻⁵M乙酸氧铀酰染色, 乙醇脱水。铂铱—钽合金旋转投影, 投影角7°。Hu—12A型电镜观察拍照。电镜照片用光学放大机投影在白纸上, 用铅笔描出DNA分子的轮廓, 测量其长度, 再根据放大倍数计算DNA分子的外形长度。

2 结果

2.1 滑鼠蛇肝mtDNA的制备与鉴定

每次实验用200克蛇肝, 分离粗制的mtDNA后, 上4%珠状琼脂糖凝胶柱, 经缓冲液洗脱纯化, 洗脱曲线如图1。经电泳鉴定, 峰I物质为mtDNA, 见图2。

经化学分析鉴定, 峰I物质主要为RNA及少量蛋白质。对提纯的线粒体测定蛋白质含量, 得每克蛇肝(湿重)可产线粒体蛋白4.5毫克左右。若mtDNA的量以1 OD₂₆₀值等于50微克计, 则每毫克线粒体蛋白可产mtDNA0.18微克左右。

2.2 滑鼠蛇肝mtDNA的分子形状

通过电镜观察, 发现滑鼠蛇肝mtDNA与其它高等动物mtDNA一样, 也是环形分

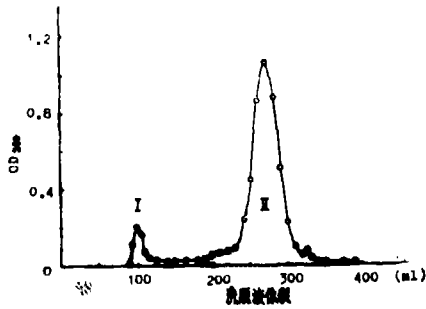


图1 4%珠状琼脂糖凝胶柱层析纯化滑鼠蛇肝mtDNA。层析条件见正文。峰 I 为 mtDNA, 峰 II 为 RNA 和蛋白质

Fig.1 4% Agarose Gel(Beads) column chromatographic purification of mtDNA of Ptyas mucosus liver

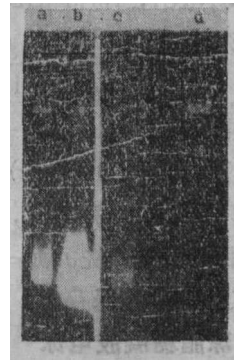


图2 滑鼠蛇肝 mtDNA 琼脂糖凝胶电泳。b 为粗制 mtDNA 上柱样品; a 和 c 为用不含 NaCl 的缓冲液洗脱的峰 I mtDNA; d 为按图 1 上柱洗脱的峰 I mtDNA

Fig.2. Agarose gel electrophoresis of mtDNA of Ptyas mucosus liver

子 (图 3), 有超螺旋型, 开环型及含 D-环型三种构型的分子。由电镜照片测得滑鼠蛇肝 mtDNA 环状分子的平均长度为 $5.23\mu\text{m}$ 。

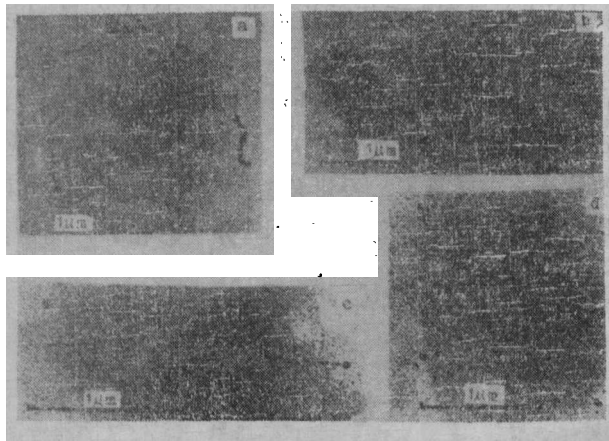


图3 滑鼠蛇肝 mtDNA 电镜照片
a 和 b 为开环型分子。c 为超螺旋型分子。d 为含 D-环型分子, 箭头指处为 D-环

Fig.3 Electronic micrograph of mtDNA of Ptyas mucosus liver

2.3 滑鼠蛇肝 mtDNA 的分子量

用 BamHI、EcoRI、PstI 完全消化滑鼠蛇肝 mtDNA, 经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测酶解产物。结果表明, PstI、BamHI 和 EcoRI 在滑鼠蛇肝 mtDNA 上分别有 2 个、3 个和 4 个切点 (图 4)。以 DNA 的 EcoRI、BamHI 和 Hind III 片段作为分子量标

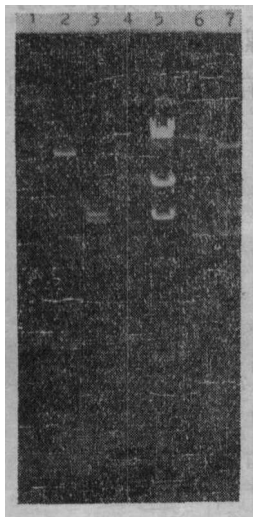


图4 滑鼠蛇肝mtDNA 限制酶水解片段琼脂糖凝胶电泳

Fig.4 Agarose gel electrophoresis of restriction fragments of mtDNA of Ptyas mucosus liver.

1. mtDNA 2. mtDNA + PstI 3. mtDNA + EcoRI 4. mtDNA + BamHI 5. λ DNA + HindIII 6. λ DNA + EcoRI 7. λ DNA + BamHI

准, 根据DNA片段的迁移率的倒数与其分子量成反比的关系^[6]测定各片段的分子量。对于分子量太大而不落在标准曲线的直线部分的片段, 则用 Southern^[6] 建立的计算方法进行测定, 结果见表1。从而求得滑鼠蛇肝 mtDNA 的分子量为 16.91kb 或 10.85×10 dalton。

表1 滑鼠蛇肝 mtDNA 限制片段
分子量(kb)

Tab.1 Size of restriction fragments of Ptyas mucosus mtDNA(kb)

PstI	BamHI	EcoRI
14.44	9.78	6.35
2.48	4.47	6.28
16.92	2.57	2.96
	16.82	1.19
		16.98

3 讨论

由于蛇肝内部存在结缔组织, 不能剔除干净, 且肝组织较坚实, 用带研杵的匀浆器难以制备肝匀浆。我们采用高速组织捣碎机制备蛇肝匀浆, 取得较好的结果。

我们制备蛇肝mtDNA时发现按赵法^[1]用2MNaCl沉淀除去大量RNA时, 有相当量的mtDNA共沉淀出来, 这样会影响 mtDNA 的收率。因此我们采用酚-氯仿抽提线粒体裂解液, 经乙醇沉淀粗mtDNA后, 用上柱缓冲液溶解沉淀, 所得样品直接上柱, 缩短了操作过程。

我们采用国产4%珠状琼脂糖凝胶柱层析纯化mtDNA, 获得比较满意的结果。上柱洗脱时, 珠状琼脂糖凝胶的分离效果受洗脱液的离子强度影响较大。我们曾用不含 NaCl 的缓冲液(0.01m Tris-HCl, 1mm EDTA, pH8.5)进行洗脱, 但洗脱效果差(见图2)。含 1MNaCl的缓冲液洗脱仍不能排除大分子RNA对mtDNA的污染。而用含 2m NaCl 的缓冲液洗脱, RNA除得干净, 所得mtDNA样品的纯度相当高。

用此法制得的蛇肝mtDNA,在电泳检测中可见到2条带(见图2)。根据电镜资料及前人报导的结果^[1,6]来分析,迁移率较大的为超螺旋型mtDNA分子,迁移率较小的为开环型分子。D-环分子的带和直线型分子的带没有看到,这可能是由于D-环分子和直线型分子含量较少,用电泳方法不能检测出来。

测试中心电镜室夏锋协助样品的投影及拍照工作。

参 考 文 献

- [1] 赵帮梯等,北京大学学报(自然科学版),1983年,1,72-77
- [2] D.L.Daniels et al., *Virology*, 117(1982), 81
- [3] A.K.Kleinschmidt, *Methods in Enzymology*, 12B(1968), 361-376
- [4] 徐有成等,生物化学与生物物理进展,1975,2,9-12
- [5] E.N.Southern, *Anal. Biochem.*, 100(1979), 319-323
- [6] P.J.Laipis, et al., *Biochem. Biophys. Acta*, 565(1979), 22-23

Preparation and Characteristic Determination of Mitochondrial DNA from *Ptyas mucosus* Liver

Wu Ying ji*

Abstract

A simple method for preparing mitochondrial DNA (mtDNA) from snake (*Ptyas mucosus*) liver is as follows: isolation of mitochondria by differential centrifugation, deproteinization of mitochondrial lysates with chloroform and phenol, precipitation of total nucleic acids with ethanol, and final purification by using chromatography on a 4% Agarose Gel (Beads) column. Electron microscopic analysis shows that the mtDNA is circular in shape. The mtDNA was digested with three restriction endonucleases. There are 2, 3 and 4 cleavage sites on the mtDNA corresponding complete digestion with restriction endonucleases PstI, BamHI and EcoRI, respectively. According to restriction fragment sizes obtained by three distinct single restriction enzyme digestions, the average molecular weight of the mtDNA is estimated to be 16.91 kb or 10.85×10^6 dalton.

Keywords mitochondrial DNA, *Ptyas mucosus* liver, purification and properties

• Department of Biology