

武昌鱼肝线粒体 DNA 限制性内切酶 酶解图谱与 12S rRNA 基因的 初步定位

申宗侯 李凌云 王鄂生 刘子铎 张晓东 马晓军

(武汉大学生化教研室, 430072)

提 要

武昌鱼肝线粒体(mt)DNA 经六种限制性内切酶 BamHI, BglII, BglI, EcoRI, HindII HpaII 单酶完全酶解分别得到 2, 2, 3, 3, 3 和 7 个片段。用琼脂糖凝胶电泳测得各个酶解片段的长度和分子量, 经计算该 mtDNA 长约 16.6kb, 分子量 10.2×10^6 道尔顿(dalton)。用七对限制酶双酶全酶解, 构建出五种限制性内切酶图谱。以酵母线粒体 15S rRNA 基因为探针针对武昌鱼肝 mtDNA 中的 12S rRNA 基因进行初步定位。

关键词 武昌鱼肝线粒体 DNA(mtDNA), 限制酶图谱, 12S rRNA 基因, 基因定位

线粒体基因组是自主复制的单位, 其基因的组织及表达具有独特性, 且其分子相对较小, 因此成为研究基因的结构、功能、表达调控以及进化的良好模型。限制性内切酶图谱的构建为上述研究提供必要的基础。迄今已对许多种动物及高等植物的 mt DNA 构建了限制性内切酶图谱, 但对鱼类 mtDNA 基因组的研究报道不多。本室选用武昌鱼为材料, 组建了武昌鱼肝 mtDNA 的物理图谱, 并以酵母 mtDNA 15S rRNA 基因为探针针对武昌鱼肝 mtDNA 中的 12S rRNA 基因进行了初步定位。

材料与方 法

1 材料与试剂 武昌鱼(*Megalobrama amblycephala*)购自武昌郊区渔场。各种限制性内切酶来自华美公司, α -32PdCTE 取自北京福瑞公司, 蛋白酶 K 由德国, 柏林格尔提供, 其他试剂为进口分装或国产。15S rRNA 基因探针系申宗侯在美国康乃尔大学构建。

2 武昌鱼肝线粒体(mt)DNA 的分离与纯化 按 Borst 方法^[1]制备线粒体。参考 Fujisawa 方法^[2]提取 mtDNA, 分别用低熔点琼脂糖法、透析袋电泳法及 RNase 处理纯化

· 国家自然科学基金资助项目。
1992 年 6 月 2 日收到。

mtDNA。纯化的 mtDNA 用甲酰胺法制片后进行电镜观察^[3]。

3 武昌鱼肝 mtDNA 的限制性内切酶酶解 按 Maniatis 方法^[4]用限制性内切酶进行单酶、双酶酶解 mtDNA,分别用 0.7% 及 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分离及鉴定酶解产物。酶解片段用 EB 染色后在紫外灯下拍照。

4 武昌鱼肝 mtDNA 上 12S rRNA 基因定位 鱼肝 mtDNA 的 BamHI 完全酶解产物经琼脂糖凝胶分离后按 Southern 方法^[5]转移至硝酸纤维素滤膜,用³²P 标记的酵母线粒体 15S rRNA 基因为探针进行分子杂交并放射性自显影。

结果与讨论

纯化后的武昌鱼肝 mtDNA 琼脂糖凝胶电泳为一条带,电镜下观察到该 mtDNA 为环形结构。其酶切和 12S rRNA 基因定位结果如下:

1. 武昌鱼肝 mtDNA 单酶解片段的测定

6 种限制性内切酶 BamHI, BglIII, BglI, EcoRI, HindIII 和 HpaII 对武昌鱼肝 mtDNA 的切点分别为 2.2.3.3.3 和 7(图 1)。而 PstI 和 SalI 无切点。以 HindIII 酶解的 λ DNA 片段为分子量标准,计算出各个片段的分子量,积加出武昌鱼肝 mtDNA 的分子量为 10.2×10^6 道尔顿,长约 16.6 kb(表 1)。

2. 武昌鱼肝 mtDNA 双酶全酶解片段的测定

武昌鱼肝 mtDNA 经 BamHI/EcoRI, BamHI/HindIII, BamHI/BglII 和 BamHI/BglI 四对酶酶解分别产生 5.5.4 和 4 个片段。经 EcoRI/BglI 双酶全酶解产生 6 个片段;BglI/HindIII 双酶解实际只得到 5 个片段。BglI/BglIII 双酶解产生 5 个片段(图 2)。各个片段的分子量见表 2。

3. 武昌鱼肝 mtDNA 物理图谱的构建

(1) **BamHI, BglII 酶切点的定位** BamHI 在该 mtDNA 上有两个切点,若以其中一个切点为零点,片段 A→B 顺时针方向为基因排列方向,则此两个切点可分别定位于基因组的零点和 76.18 处。在直线型图中为零点及 12.65 处。BglII 在 mtDNA 上也有两个切

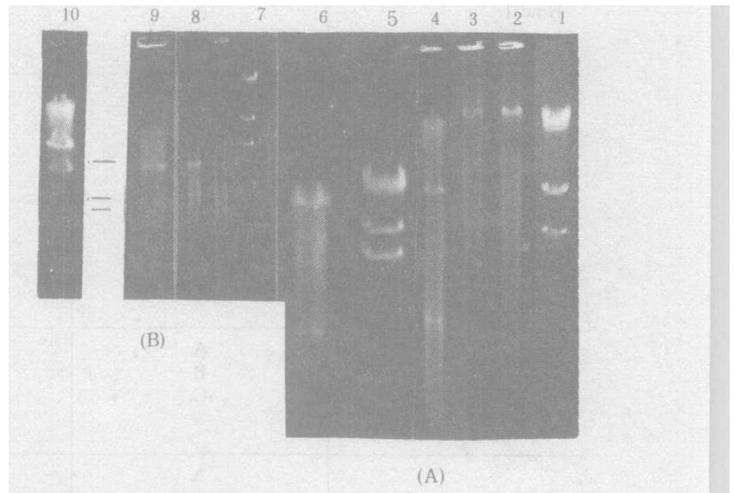


图 1 武昌鱼肝 mtDNA 单酶完全酶解片段的琼脂糖凝胶电泳图谱 1,5,7,10,用 HindIII 切割 λ DNA 作为标准分子量;2,mtDNA 用 PstI 酶解;3,SalI;4,BglI;5,BglIII;8,HindIII;9,EcoRI

Fig. 1 Agarose gel electrophoretic patterns of the fragments from *M. amblycephala* mtDNA obtained by single restriction endonuclease complete digestion. 1, 5, 7, 10, λ DNA cleaved by Hind III as the standard of molecular weight; 2, mtDNA cleaved by PstI; 3, SalI; 4, Bgl I; 5, BglII; 8, HindIII; 9, EcoRI

表1 武昌鱼肝 mtDNA 单酶解片段的分子量

Tab. 1 Molecular weight of the restriction fragments from *M. amblycephala* liver mtDNA by single enzyme digestion

Enzyme	Fragment	Molecular weight dalton (X 10 ⁶)	Size (kb)
BamHI	A	7.82	12.65
	B	2.44	3.95
		<u>10.26</u>	<u>16.60</u>
HindII	A	3.96	6.80
	B	3.30	5.30
	C	3.00	3.90
		<u>10.26</u>	<u>16.00</u>
BglI	A	5.66	9.16
	B	2.37	3.84
	C	2.24	3.63
		<u>10.27</u>	<u>16.63</u>
BglII	A	8.24	13.34
	B	2.02	3.27
		<u>10.26</u>	<u>16.61</u>
EcoRI	A	4.53	7.33
	B	3.03	4.91
	C	2.70	4.38
		<u>10.26</u>	<u>16.62</u>
HpaII	A	2.10	3.40
	B	1.94	3.13
	C	1.79	2.90
	D	1.56	2.53
	E	1.21	1.95
	F	0.36	2.56
	G	0.71	1.14
		<u>10.67</u>	<u>17.61</u>

点,它们均位于 BamHI-A 片段上。若以靠近零点为顺时针方向,则 BglII 的两个切点分别定位于基因组 43.40 处和 63.16 处。在线型图中分别位于 7.23 和 10.49 处(图 3)。

(2)BglI 位点的确定 从表 1 可知 BglI 在 mtDNA 上有三个切点,BamHI 有两个切点。因此 BamHI/BglI 双酶全酶解理应得 5 个片段,但实验中仅鉴定出 4 个片段,有可能这两种酶的一对切点相距很近,双酶解时产生了一个很小的片段(<0.3kb),这在此种琼脂糖凝胶电泳上很难检出的。根据 BamHI/BglI 双酶切各个片段给出的数据和计算,将 BglI 的两个片段定位在 BamHI-A 片段上。另一切点位于 BamHI-B 片段上。再根据 BglI/Bgl I 双酶解的结果,Bgl I 的三个切点分别定位于基因组上 32.90、54.74 和 77.81 三处。在线型图中定位于 5.47、9.10 和 12.94 三处(图 3)。

(3)Hind III 位点的确定 分析并比较 BamHI,Hind III 单酶全酶解和 BamHI/Hind III Bgl I /Hind III 双酶全酶解的结果,将 Hind III 的三个切点分别定位于基因组中 18.48、50.61 和 89.23 处。在线型图中,它们分别定位在 3.07、8.40 和 14.81 处(图 3)。

表 2 武昌鱼肝 mtDNA 双酶解片段的分子量

Tab. 2 Molecular weight of the restriction fragments from *M. amblycephala* liver mtDNA digested by double enzyme

Enzyme	Fragment	Molecular weight dalt (X 10 ⁶)	Size (kb)
BamHI/Hind III	A	3.30	5.33
	B	2.32	3.76
	C	1.90	3.07
	D	1.34	2.17
	E	1.10	1.79
		<u>9.96</u>	<u>16.12</u>
BamHI/BglII	A	4.47	7.23
	B	2.54	3.95
	C	2.02	3.27
	D	1.34	2.17
		<u>10.27</u>	<u>16.62</u>
BamHI/BglI	A	3.38	5.47
	B	2.28	3.69
	C	2.24	3.63
	D	2.21	3.57
		<u>10.11</u>	<u>16.36</u>
BamHI/EcoRI	A	4.53	7.33
	B	1.69	2.74
	C	1.60	2.60
	D	1.43	2.31
	E	1.01	1.63
		<u>10.29</u>	<u>16.61</u>
EcoRI/BglI	A	2.52	4.08
	B	2.24	3.63
	C	1.78	2.87
	D	1.69	2.73
	E	1.26	2.04
	F	0.60	0.96
		<u>10.06</u>	<u>16.31</u>
BglI/BglII	A	5.66	9.16
	B	1.51	2.45
	C	1.29	2.10
	D	1.02	1.65
	E	0.86	1.39
		<u>10.34</u>	<u>16.75</u>
BglI/HindIII	A	3.01	4.86
	B	2.75	4.45
	C	1.69	2.73
	D	1.49	2.41
	E	1.16	1.87
		<u>10.10</u>	<u>16.32</u>

(4) EcoRI 位点的确定 根据 BamHI, EcoRI, BglI 单酶全酶解和 BamHI/EcoRI, BglI/EcoRI 双酶全酶解的数据, 将 EcoRI 在 mtDNA 上的 5 个切点分别定位在基因组 16.48、60.56 和 90.12 三处。在线型图中定位于 2.74、10.07 和 14.98 三处(图 3)。

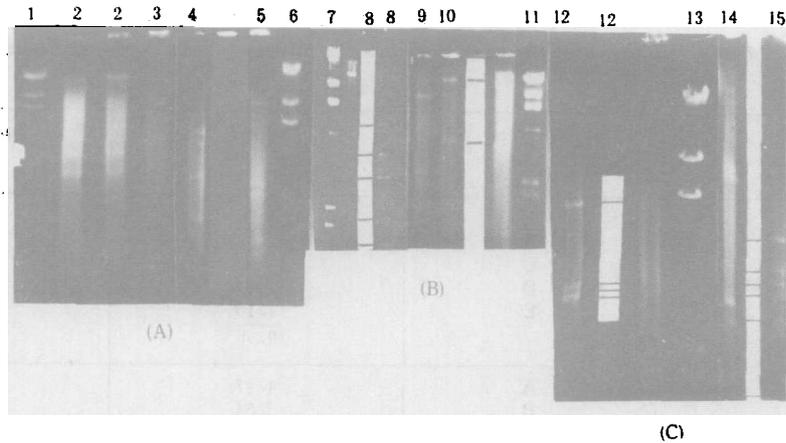


图2 武昌鱼肝 mtDNA 双酶完全酶解片段的琼脂糖凝胶电泳图谱(A,B)1,6,7,10 以 λ DNA 为分子量标准;2, Hpa I 酶解 mtDNA;3, BamHI/Bgl I , 双酶解;4, Bgl I /Hind III ;5, Bgl I /Bgl I ;8, BamHI/Hind III ;9, BamHI/EcoRI;10, BamHI(C);13,14, λ /Hind III 标准分子量;12, BamHI/BglII;15, BglII/EcoRI

Fig. 2 Agarose gel electrophoretic patterns of the fragments from *M. amblycephala* mtDNA obtained by double restriction endonuclease complete digestion. (A,B):1,6,7,10, λ DNA cleaved by Hind III as marker;2, HpaII; 3, BamHI/BglII;4, BglI/Hind III ;5, BglI/BglII;8, BamHI/Hind III ;9, BamHI/EcoRI; 10, BamHI. (C):13,14, marker;12, BamHI/BglII;15, BglII/EcoRI

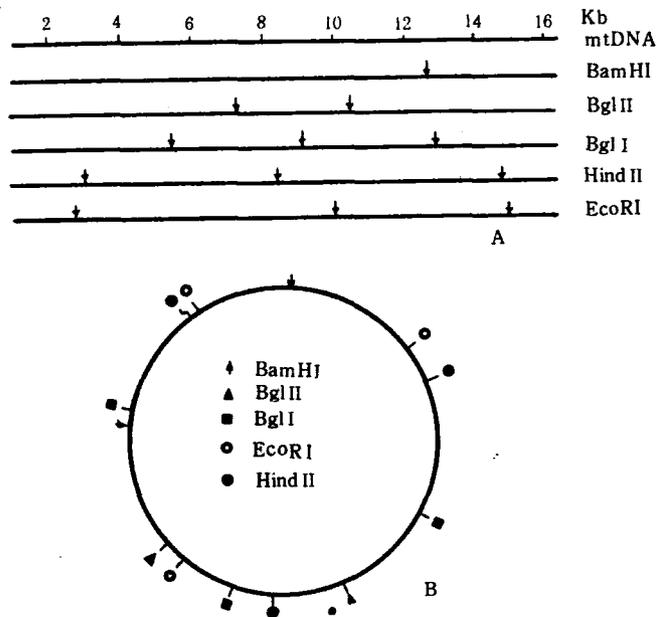


图3 武昌鱼肝 mtDNA 限制性内酶线型(A)和环型(B)图

Fig. 3 Linear(A) and circle(B) restriction endonuclease map of *M. amblycephala* liver mtDNA

综合以上结果可以绘制出武昌鱼肝 mtDNA 的五种限制性内切核酸酶 BamHI, BglII, BglIII, HindIII 和 EcoRI 的 13 个切点线型和环形的限制酶图谱(图 3)。这 13 个切点在线型和环形线粒体基因组中分布是不均匀的,其中 8 个位点分布在 50—100 图距单位范围内。限制酶切点分布不均匀性,文献中也曾有过报道。Potter^[6]指出不同动物 mtDNA 的酶切图谱完全不同。BamHI 对各种不同纲动物的 mtDNA 产生明显的带型差异。如对哺乳动物小鼠 mtDNA 产生 4 个片段,对中国人 mtDNA 仅有一个切点。同一属鱼的不同种鱼之间限制性酶切图谱也存在差异性,如鲤鱼 mtDNA 和鲫鱼 mtDNA 经 BamHI 酶解分别产生 3 和 2 个片段^[7,8]。武昌鱼 mtDNA 经 BamHI 酶解也产生 2 个片段,但切点的分布与鲫鱼的不同。

4. 武昌鱼 mtDNA 上 12s rRNA 基因的初步定位

构建的武昌鱼肝 mtDNA 物理图谱为基因定位提供了基础。文献^[9]报道不同种属的核糖体小亚基 rRNA 具有同源性。作者用切口平移法制备标记的酵母 mtDNA 15S rRNA 基因探针,用分子杂交法将武昌鱼肝 mtDNA 12S rRNA 基因定位于 3.95kb 的 BamHI 片段上(图 4)。

图 4 用酵母 15S rRNA 基因探针杂交印迹法将武昌鱼肝 12s-RNA 基因定位于 mtDNA BamHI-B 片段

Fig. 4 Preliminary localization of 12S rRNA gene on fragment BamHI-B of mtDNA from *M. amblycephala* liver using blot hybridization with 15S rRNA gene probe of yeast mtDNA

a. 杂交 hybridization;
b. 对照 control

x b

参 考 文 献

- [1] Borst P, et al. Mitochondrial DNA: I. Preparation and properties of mitochondrial DNA from chick liver. *Biochim. et Biophys. Acta*, 1967, **149**:140—155.
- [2] Fujisawa T, et al. Mitochondrial DNA polymerase from rat liver, *Biochim. et Biophys. Acta*, 1977, **475**: 611—622.
- [3] Rochaix J D. Electron microscope localization of chloroplast by R-100p analysis In: M. Edelman et al ed. Methods in chloroplast molecular Biology, Amsterdam New York Oxford; Elsevier Biomedical Press, 1984:469—476.
- [4] Maniatis T, et al. Setting up digestions with restriction enzymes. In: Maniatis, T. ed. Molecular Cloning, A Laboratory Manual New York, Cold Spring Harbor Laboratory, Press 1989, **5**: 31—5. 32.
- [5] Southern E M. Detection of Specific sequence among DNA fragments separated by gel electrophoresis, *J. Mol. Biol.*, 1975, **98**: 503—517.
- [6] Potter S S. Specific Cleavage Analysis of Mammalian Mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1975, **72**: 4496—4500.
- [7] Araya A, et al. Cloning Physical Mapping and Genome Organization of Mitochondrial DNA from *Cyprinus carpio* Oocytes. *Mol. Gen. Genet.*, 1984, **196**: 43—52.

- [8] 陈关君等。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, 1984, 11(2): 141-146.
- [9] Dams E. et al. Complication of small ribosomal RNA sequences. *Nucl. Acids Res.*, 1988, 16. Suppl: 87-173.

**RESTRICTION MAP OF MITOCHONDRIAL DNA
FROM *MEGALOBRAMA AMBLYCEPHALA*
LIVER AND PRELIMINARY LOCALIZATION OF
12S rRNA GENE OF THE mtDNA**

Shen Zonghou Li Lingyun Wang Esheng Liu Ziduo Zhang Xiaodong and Ma Xiaojun

(Department of biology, Wuhan University, 430072)

Abstract

Wuchang Fish (*M. amblycephala*) liver mtDNA was cleaved by the restriction endonuclease. Upon complete digestion numbers of restriction fragments of BamHI, BglII, BglI, EcoRI, HindIII and HpaII were determined to be 2, 2, 3, 3, 3 and 7 respectively. Molecular weight of the mtDNA was found to be 10×10^6 dalton or 16.6 kb. A restriction Map of five restriction endonucleases was constructed. 12S rRNA gene of the mtDNA was preliminarily localized by molecular hybridization using 15S rRNA gene from yeast mtDNA as the probe.

Key words Wuchang Fish (*Megalobrama amblycephala*) liver mtDNA, Restriction map, 12S rRNA gene, Gene localization