

团头鲂线粒体 DNA 的限制性 内切酶图谱*

宋 平 李晓迎 熊全沫

(武汉大学生命科学学院, 430072)

提 要

用 BamH I , Bgl I , Bgl II , EcoR I , Hpa I , Kpn I , Pst I , Sac I , Sal I , Xba I , 和 Xho I 11 种限制性内切酶对团头鲂 (*Megalobrama amblycephala* Yih) 的线粒体 DNA (mtDNA) 进行了单酶切, 其切点数依次为 2, 3, 2, 3, 3, 1, 0, 1, 0, 0 和 0; 经琼脂糖凝胶电泳测算出各酶切片断大小, 得出团头鲂 mtDNA 分子长约 16020 ± 356 碱基对 (bp), 分子量 6.37×10^{18} u (原子质量), 构建了团头鲂 mtDNA 的限制酶图。

关键词 线粒体 DNA, 限制性内切酶, 团头鲂。

动物 mtDNA 相对于核 DNA 分子量小只有 16Kb 左右, 便于进行序列等分析研究; 同时因其具有半自主性的复制和转录能力, 是研究真核细胞基因转录, 复制及翻译的好模型。另一方面, 由于 mtDNA 母系遗传、基因组结构高度保守但一级结构却存在大量的分歧, 有利于进行种间和种内的遗传变异和进化研究, 其 mtDNA 限制性酶切图谱也是种质鉴定 (遗传标记) 的一种比较稳定的指标。基于上述等原因, 近年来在国外动物 mtDNA 研究进展迅速, 国内在哺乳类等动物的 mtDNA 研究方面也有不少报道^[1-7]。团头鲂, 是我国淡水鱼类中比较名贵的品种, 对其 mtDNA 的研究可为探索团头鲂及其相关鱼类的演化, 团头鲂的种群 (地理) 多态和为其品种改良提供基础资料。本文试图从这一目的出发, 报道了团头鲂 mtDNA 限制酶图谱。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂 团头鲂 (*Megalobrama amblycephala* Yih) 购自武汉市水果湖市场。本实验所用酶均购自华美公司, 其余试剂均为国产分析纯。溶液和器皿均经高压灭菌。

1.2 mtDNA 的提取 活团头鲂经鳃动脉放血后立即剖腹取出卵巢, 用 STE (缓冲液 A 0.25mol / L 蔗糖, 0.01mol / L Tris · HCl, 0.001 mol / L EDTA, PH8.0) 按 1 : 15 的重量体积比稀释, 置于 DS 200 高速组织捣碎器匀浆数次 (慢挡)。匀浆液以 1000 r / min,

* 本工作得到国家自然科学基金 (3880637) 的资助。

1993 年 7 月 15 日收到; 1995 年 8 月 14 日修回。

4℃离心15min,上清液以15000r/min,4℃离心30min。沉出的线粒体悬浮于适量的缓冲液B(0.25mol/L蔗糖,0.05mol/LTris·HCl,7mol/LMgCl₂,pH7.5)中,以15000r/min,4℃离心30min,重复一次。沉淀悬浮于缓冲液B中,加于DNaseI使终浓度达50ug/ml25℃冰浴保温30min,冰浴冷却至0℃,加于3倍体积的DNaseI反应终止液(0.25mol/L蔗糖,0.1mol/LEDTA,pH8.0),15000r/min4℃离心30min,所得沉淀即为纯线粒体。

线粒体用缓冲液·C(0.05mol/LTris·HCl,0.1mol/LNaCl,0.01mol/LEDTA,pH8.5)悬浮,加入SDS至终浓度1%,37℃保温15min,冰浴冷却后加等体积苯酚/氯仿/异戊醇(25/24/1)反复抽提至界面无蛋白为止。上层水相用氯仿/异戊醇(24/1)抽提2次。水相加入0.2倍体积的1mol/LNaAc混匀,再加入2倍体积预冷的无水乙醇混匀,-38℃过夜,15000r/min,4℃离心30min,沉淀mtDNA真空干燥后,以TEC0.01mol/LTris·HCl,0.001mol/LEDTA,pH8.0)溶解,4℃保存。

1.3 mtDNA的限制性酶解 对mtDNA单酶完全酶解时,将适量mtDNA与内切酶(4个单位,总体积30ul)及缓冲液于37℃水浴保温2h。双酶完全酶解时,将两种酶同时加入(各4个单位,总体积40ul),37℃水浴保温3h。以65℃15min终止反应后立即冰浴。

1.4 mtDNA酶解片断琼脂糖凝胶电泳 采用0.7%琼脂糖凝胶(制胶时加入EB至终浓度0.5ug/ml),水平板电泳10×13.5cm、50v、7℃稳压9—10h,紫外灯下拍照。

1.5 mtDNA酶解片断测定 以λ-DNA/HindⅢ和λ-DNA/EcoRⅠ·HindⅢ酶解DNA片断的电泳迁移率的倒数作纵坐标;分子量的对数值作横坐标作图,测得酶切各片断的分子量。

2 结果与讨论

2.1 mtDNA单酶完全酶解片断的测定(图1,表1)

限制性内切酶BamHⅠ,BglⅠ,BglⅡ,EcoRⅠ,HpaⅠ,KpnⅠ和SacⅠ对团头鲂mtDNA的切点数分别为2、3、2、3、3、1和1。其中BamHⅠ,BglⅠ,BglⅡ,和EcoRⅠ酶切结果与申宗侯等的基本一致^[1]。对于PstⅠ,SalⅠ,XbaⅠ,XhoⅠ我们除加大酶量、延长酶解时间,同时还采用双酶酶解法,经多次重复证明均无切点。

以λ-DNA/EcoRⅠ·HindⅢ的酶解DNA片断为分子量标准,计算出各个酶解mtDNA片断分子量,测出团头鲂mtDNA的分子量为 6.37×10^{18} u,其分子长约16020±356碱基对(bp)。

2.2 mtDNA双酶完全酶解片断的测定(图2,表2)

限制性内切酶EcoRⅠ/HpaⅠ对团头鲂mtDNA双酶完全酶解时,其片断D和E(均为1.74Kb)为大小很相近的两个片断,在本实验凝胶电泳中显示出一条重叠带、比相邻的DNA带明亮得多,同时经理论推导也证实了这一点。因技术原因,双酶解中有些小片断在电泳中未能检测出来,其分子量是根据两种相关单酶完全酶解片断的数量和mtDNA平均分子量或相关双酶有关片断的残留程度(一种酶其酶解的mtDNA片断被另一种酶酶解成两个或多个片断)来推算。

2.3 mtDNA酶切物理图谱的构建

以单个切点酶 $Kpn\ I$ 的切点为零点, 以 $Kpn\ I / Sac\ I$ 双酶解中, 其 $Kpn\ I \rightarrow Sac\ I$ 近点方向为基因排列的方向即顺时针方向; 同时以单酶完全酶解片断的大小确定切点间的距离, 以有关双酶完全酶解的结果来确定同一酶或不同酶切点间的相对位置。对于两个切点非常靠近的两种酶, 还辅以此两种酶为基础的有关双酶来进一步确定这两个切点的相对位置(这些酶的电泳图谱及有关片断的分子量本文未列出)。例如 $Bgl\ I$ (3-1) 切点与 $Hpa\ I$ (3-2) 切点比较靠近, 其先后位置还进一步经 $Bgl\ I / Hpa\ I$ 的双酶解来证实($Bgl\ I / Hpa\ I$ 双酶解使得 $Hpa\ I$ 中的 1.74 片断被 $Bgl\ I$ (3-1) 切点所切而保留 $Hpa\ I$ 1.67 等片断, 证明 $Bgl\ I$ (3-1) 切点在 $Hpa\ I$ (3-2) 切点之后; 其间的相对距离可通过计算确定)。同样, $Bgl\ I$ (2-2) 切点与 $EcoR\ I$ (3-3) 切点非常靠近, 其切点的相对位置和 $BamH\ I$ (2-2) 与 $Bgl\ I$ (3-2) 切点的相对位置等都采用类似的方法进一步明确。这样得出团头鲂 mtDNA 的线形和环形限制酶的物理图谱(图 3)。

表 1 单酶完全酶解 mtDNA 片断的分子量

Tab. 1 Molecular weights of the restriction fragments of mtDNA by single enzyme digestion

酶 Enzyme	片断 Fragment	分子量 Molecular weight ($\mu, \times 10^{18}$)	大小 Size(Kb)
$BamH\ I$	A	5.00	12.58
	B	1.35	3.40
	Total	6.35	15.98
$Bgl\ I$	A	3.74	9.41
	B	1.38	3.46
	C	1.30	3.26
	Total	6.42	16.13
$Bgl\ II$	A	5.36	13.49
	B	1.17	2.95
	Total	6.53	16.44
$EcoR\ I$	A	2.89	7.26
	B	1.72	4.32
	C	1.51	3.79
	Total	6.12	15.37
$Hpa\ I$	A	5.16	12.97
	B	0.69	1.74
	C	0.66	1.67
	Total	6.51	16.38
$Kpn\ I$	A	6.33	15.92
$Sac\ I$	A	6.33	15.92

a b c d e f g h i j k l m n o p



图1 单酶完全酶解和双酶酶解 mtDNA 片断电泳图

Fig.1 Agarose gel electrophoresis pattern of restriction digests of mtDNA

a.g.p. λ / Hind III ; h. λ / EcoR ; I .Hind III ; b.Bgl II / EcoR I ; c.Bgl I / BamH I ; d.Hpa I ; e.Sac I / Hpa I ; f.Kpn I / Hpa I ; i.Sac I ; j.Kpn I ; k.Hpa I ; EcoR I ; m. Bgl II ; n. Bgl I ; o.BamH I

a b c d e f g h i j k l m n o p

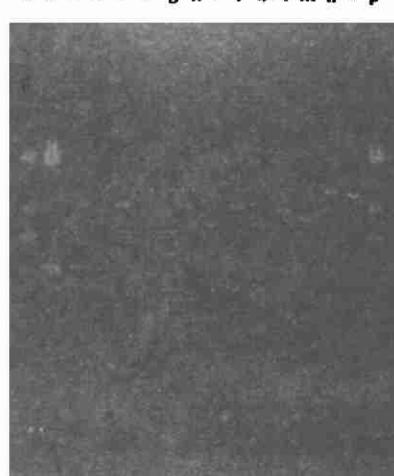


图2 双酶完全酶解 mtDNA 片断的电泳图

Fig.2 Agarose gel electrophoresis pattern of restriction digests of mtDNA

a.p. λ / Hind III ; b. λ / EcoR ; I .Hind III ; c.BamH I / Hpa I ; d.EcoR I / Hpa I ; e.Bgl II / Hpa I ; f.Bgl I / EcoR I ; g. Sac I / EcoR I ; h. Sac I / Bgl I ; i. Sac I / BamH I ; j. Sac I / Bgl II ; k.Kpn I / EcoR I ; l.Kpn I / Bgl I ; m. Kpn I / BamH I ; n.Kpn I / Bgl II ; o.Kpn I / Sac I

表2 双酶完全酶解 mtDNA 片断的分子量

Tab. 2 Molecular weights of the restriction fragments of mtDNA digested by double enzyme

酶 Enzyme	片断 Fragment	分子量 Molecular weight (μ , $\times 10^{18}$)	大小 Size(Kb)
Kpn I / Sac I	A	4.57	11.50
	B	1.63	4.11
	Total	6.20	15.61
Kpn I / Bgl II	A	4.95	12.46
	B	0.80	2.00
	C	0.44	1.10
	Total	6.19	15.56
Kpn I / BamH I	A	3.39	8.52
	B	1.65	4.15
	C	1.36	3.43
	Total	6.40	16.10

续表 2

Kpn I / Bgl I	A	3.67	9.23
	B	1.40	3.53
	C	0.88	2.21
	D	0.45	1.13
	Total	6.40	16.10
Kpn I / EcoR I	A	2.12	5.32
	B	1.72	4.32
	C	1.51	3.79
	D	0.78	1.96
	Total	6.13	15.39
Sac I / Bgl II	A	3.90	9.80
	B	1.23	3.10
	C	1.15	2.89
	Total	6.28	15.79
Sac I / BamH I	A	3.19	8.02
	B	1.84	4.63
	C	1.36	3.43
	Total	6.39	16.08
Sac I / Bgl I	A	2.95	7.41
	B	1.40	3.53
	C	1.32	3.33
	D	0.74	1.85
	Total	6.41	16.12
Sac I / EcoR I	A	2.34	5.88
	B	1.72	4.32
	C	1.51	3.79
	D	0.48	1.22
	Total	6.05	15.21
Bgl I / EcoR I	A	1.72	4.32
	B	1.35	3.40
	C	1.21	3.04
	D	1.08	2.72
	E	0.44	1.10
	F	0.33	0.82
Total		6.12	15.40

续表 2

Bgl II / Hpa I	A	4.05	10.20
	B	0.89	2.25
	C	0.69	1.74
	<u>D</u>	<u>0.33</u>	<u>0.82</u>
	<u>E</u>	<u>0.22</u>	<u>0.54</u>
	Total	6.18	15.55
EcoR I / Hpa I	A	1.72	4.32
	B	1.51	3.79
	C	0.85	2.14
	D	0.69	1.74
	E	0.69	1.74
	F	0.66	1.67
	Total	6.22	15.40
BamH I / Hpa I	A	2.03	5.12
	B	1.77	4.45
	C	1.36	3.43
	D	0.69	1.74
	E	0.66	1.67
	Total	6.51	16.41
Kpn I / Hpa I	A	4.81	12.09
	B	0.69	1.74
	C	0.66	1.67
	<u>D</u>	<u>0.12</u>	<u>0.30</u>
	Total	6.28	15.80
Sac I / Hpa I	A	4.76	11.97
	B	0.69	1.74
	C	0.66	1.67
	<u>D</u>	<u>0.16</u>	<u>0.40</u>
	Total	6.27	15.78
Bgl I / BamH I	A	2.61	6.57
	B	1.31	3.30
	C	1.22	3.07
	D	1.17	2.95
	<u>E</u>	<u>0.17</u>	<u>0.43</u>
	Total	6.48	16.32
Bgl II / EcoR I	A	1.72	4.32
	B	1.65	4.15
	C	1.46	3.68
	D	1.15	2.89
	<u>E</u>	<u>0.02</u>	<u>0.04</u>
	Total	6.00	15.08

注: 数字下有横线的指推算出的分子量。

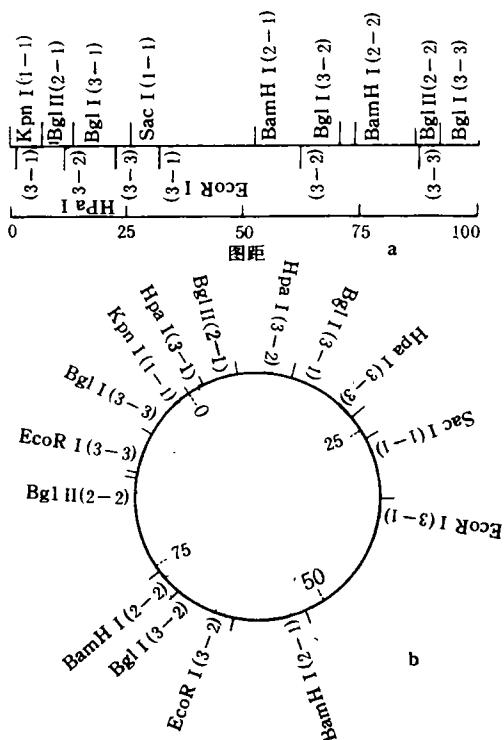


图 3 团头鲂 mtDNA 的限制酶图谱

Fig.3 The restriction map of mtDNA

a 线形图谱 linear form b 环形图谱 circular form

图注 Bgl I (3-1) 中的“3”指该酶的切点总数,而“1”指该酶的第一个切点,其余酶后面数字的意义类推。

mtDNA 限制酶分析方法结果可靠、方法稳定、重复性好, 实验手段要求不高, 其对于鱼类的种质鉴定(遗传标记), 种内和种间的遗传距离的测定, 相关鱼类的进化研究和分类难点的辅助研究, 不失为一种有效的手段。本文虽未能解决团头鲂的种群多态, 进化和相关鱼类间遗传距离等问题, 但可为这方面的研究提供基础资料。

参 考 文 献

- [1] 申宗侯等. 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. 水生生物学报, 1993, 17(2): 174—180.
 - [2] 张亚平等. 蜂猴和树鼩mtDNA10种限制酶物理图谱. 动物学研究, 1989, 10: 78—89.
 - [3] 张亚平等. 大熊猫线粒体mtDNA的九种限制酶图谱. 动物学研究, 1991, 12(2): 209—214.
 - [4] 张四明等. 方正银鲫、白鲫与鲫线粒体DNA限制性内切酶切比较. 水产学报, 1992, 16(2): 120—129.
 - [5] Brown W M. Polymorphism in mitochondrial DNA of humans as revealed by restriction endonuclease analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1980, 77: 3605—3609.
 - [6] Richard Beckwitt. Mitochondrial DNA sequence variation in domesticated goldfish, *Carassius Auratus*. *Copeia*, 1987, 1: 219—222.
 - [7] Yonekawa H, et al. Hybrid origin of Japanese mice "Mus musculus molossinus": evidence from restriction analysis of mitochondrial DNA. *Mol. Biol. Evol.*, 1988, 5: 63—78.

A MAP OF RESTRICTION ENDONUCLEASES OF *MEGELOBRAMA AMBLYCEPHALA* YIH

Song Ping, Li Xiaoying and Xiong Quanwei

(College of Life Science, Wuhan University, 430072)

Abstract

The mitochondrial DNA (mtDNA) of *Megelobrama amblycephala* were digested by 11 restriction endonucleases: BamH I, Bgl I, Bgl II, EcoR I, Hpa I, Kpn I, Pst I, Sac I, Sal I, Xba I, Xho I into different fragment: 2, 3, 2, 3, 3, 1, 0, 1, 0, 0, 0 respectively. Estimated by agarose gel electrophoresis, the size of mtDNA from *Megelobrama amblycephala* is 16020 ± 356 bp. When comparing the double restriction fragments with standard molecular weight of Mark I (Hind III digested λ DNA) and Mark II (EcoR I and Hind III digested λ DNA), we constructed the enzymes physical map.

Key words Mitochondrial DNA, Restriction endonuclease, *Megelobrama amblycephala*