

# 一种改进的鱼类线粒体 DNA 的快速 制备方法

张 辉 吴清江

(中国科学院水生生物研究所, 武汉, 430072)

## A MODIFIED METHOD FOR THE RAPID ISOLATION OF MITOCHONDRIAL DNA FROM FISHES

Zhang Hui and Wu Qingjiang

(Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan, 430072)

**关键词** 鱼类 线粒体 DNA 制备方法

**Key words** Fish, Mitochondrial DNA, Preparation method

线粒体 DNA (mitochondrial DNA: mtDNA) 是双链环状核外遗传物质, 以其分子量小, 易于分离, 突变率高, 进化速度快和母系遗传等特性, 已广泛应用于分类学, 种系鉴定, 种群遗传学, 系统发育和进化研究<sup>[1,2,3,4]</sup>。关于 mtDNA 的制备方法, 有较多文献报道, 概括起来可分为: 超速离心法<sup>[5]</sup>、差速离心法<sup>[6]</sup>、碱裂解法<sup>[7]</sup>和柱层析法<sup>[8]</sup>。这些方法或是因为步骤繁琐, 费时或是因为处理样品量小等缺点而不能适应于需要大量样本的种群遗传学研究。国外学者常用探针杂交或末端标记研究 mtDNA 的 RFLP<sup>[4,5]</sup>, 但这种方法成本高, 实验条件要求苛刻, 国内许多实验室无法开展这方面的工作。致使国内在该领域的研究, 仅限于对少数位点的物理图谱的构建, 而不能深入到种群遗传结构研究。作者在进行鱼类种群遗传学研究中, 通过对 Chapman<sup>[9]</sup>等的方法进行修改, 建立了一套较为方便的快速大量制备鱼类 mtDNA 的方法, 现介绍如下, 希望能对国内同行在该领域的研究有所帮助。

### 1. 材料方法

**1.1 所用试剂** (1) STE: 0.25mol / L 蔗糖, 0.03mol / L Tris / HCl, 0.05mol / L EDTA, pH8.0. (2) TEK: 0.03mol / L Tris / HCl, 0.05mol / L EDTA, 1.5% KCl, pH7.5. (3) TE: 0.01mol / L Tris / HCl, 0.001mol / L EDTA, pH8.0.

以上各试剂在使用以前, 均需高压灭菌。

**1.2 实验材料** 性成熟白鲫 [*C. auratus cuvieri* (Linnacus)]。

**1.3 实验步骤** 活鱼解剖, 取肝脏和卵巢, 用 STE 洗去血污, 用剪刀除去结缔组织, 按 1:5 比例加 STE, 玻璃

本研究得到了国家自然科学基金 (项目编号: 39570572) 的资助。

1997年1月2日收到。

匀浆器匀浆,匀浆液在4℃ 3000r/m离心15min,取上清液,在4℃ 20000r/m离心30min,弃去上清液,沉淀(线粒体)用TEK悬浮(每g初始组织加0.5ml TEK),振荡均匀,加NP-40至终浓度为1%,混匀,静置5min,4℃ 12000r/m离心5min,取上清液,按1:1比例向上清液加酚和氯仿(酚:氯仿:异戊醇=25:24:1),轻轻振荡混匀5min,12000r/m离心5min,吸出水相,用酚和氯仿再抽提一次,吸出水相,按1:1比例加氯仿和异戊醇(24:1),轻轻振荡混匀5min,12000r/m离心5min,吸出水相,加2倍体积的无水乙醇,-20℃放置2h或在液氮中放置5min,12000r/m离心10min,沉淀mtDNA,弃去乙醇,沉淀在室温下干燥,待水分和乙醇蒸发完毕后,用TE溶解沉淀(每ml TE中含40μg无DNA酶的RNA酶),一般每g卵巢提取物加100μl TE,每g肝脏加50μl TE,mtDNA溶液,在65℃灭活10min,-20℃保存备用。

**1.4 mtDNA的限制性内切酶消化** 按厂家提供的条件进行消化,一般总反应体积为15μl:取5μl mtDNA,4单位限制性内切酶,2μl缓冲液,加水到15μl,消化1—2h。

**1.5 电泳** 常规琼脂糖凝胶电泳,TAE缓冲系统,凝胶浓度0.8%,其中含溴化乙锭(5μg/ml),电泳完毕,在紫外灯下观察,照相。

## 2. 结果和讨论

图1是用上述方法从白鲫卵巢中提取的mtDNA经Sca I消化后产生的电泳图谱,图中展示了8个个

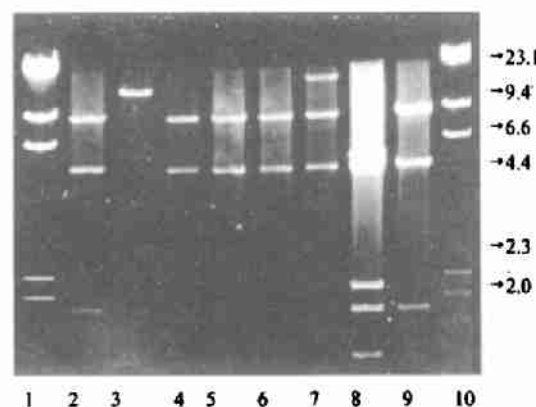


图1 白鲫8个个体mtDNA经Sca I酶切的电泳图谱,1和10道是λ-DNA / Hind III酶切分子重量标记

Fig.1 Electrophoregrams of mtDNA from 8 individuals of *C. auratus cuvieri* digested by Sca I, lane 1 and lane 10 are molecular markers(λ-DNA / Hind III)

体的酶切结果,由此结果可以看出,每克成熟卵巢制备的mtDNA,足够做20个酶切,用溴化乙锭染色,DNA带清晰可见。也没有核DNA污染,将RNA酶加入TE中,内切酶消化后,电泳凝胶中RNA量很少。用肝脏也可得到同样的结果,只是肝脏做材料,mtDNA的得率较低,一般每克肝脏制备的mtDNA可做10—15个酶切。

如上面所述,这种方法主要是通过改进Chapman等的方法所得,其主要改进的地方是:

(1)匀浆缓冲液,Chapman等是使用TEK,而作者应用STE,本来蔗糖和KCl在缓冲液中的主要作用是提供一个等渗环境,但用卵巢和肝脏做材料时,因其中含有大量的糖原,在TEK匀浆后离心时,糖原很容易凝集,极大地降低线粒体的得率,而用STE缓冲液可以避免糖原的凝集。(2)Chapman等为防止糖原凝集而影响线粒体的得率,采用了在匀浆液底部铺一层15%的蔗糖溶

液,这样的操作比较麻烦,并且一般要重复一到两次,费时费力。作者用STE匀浆液后不再需要用15%的蔗糖就可以后的高速离心时制备较纯的线粒体。(3)高速离心的时间:Chapman等一般用1—1.5h,作者经多次实验表明,4℃ 20000r/m离心30min已可较为彻底的沉淀线粒体,时间再增加,线粒体的得率也不会提高。总之,在不影响线粒体得率的同时,简化了实验步骤,节省了实验时间,这对需要检测大量样本的鱼类种群遗传学研究来说,是非常重要的。

这种方法也属于差速离心法,但与其他差速离心法相比有较大的优点,国内外常用的差速离心法制备线粒体DNA,Tamura等<sup>[9]</sup>通过改进提取质粒DNA的碱裂解法来提取线粒体DNA,这种方法的优点是简便快速,但缺点是微量制备,如果要检测大量个体,碱裂解法就会显得非常麻烦和费时。吴乃虎等<sup>[6]</sup>提出了一套分离纯化鲤鱼和草鱼线粒体DNA的方法,从报道看,操作步骤也比较多,需要的组织量也比较大,特别是为了除去核DNA和RNA,分别用DNA酶和RNA酶各消化一次,这样既增加了实验步骤和时

间,又会降低线粒体 DNA 的得率。我们这种方法,采用 NP-40裂解线粒体, NP-40只裂解线粒体膜而不裂解细胞核膜,因此,避免了核 DNA 的污染。Palva 等<sup>[6]</sup>建立了用分离质粒的柱层析法分离线粒体 DNA,这种方法可以快速获得纯净的线粒体 DNA,适用于末端标记,但由于层析用试剂合比较贵,制备多个样本时,需要多个层析柱,因此也不太适用于常规的需大量检测线粒体 DNA 的鱼类种群遗传学研究。

总之,我们通过改进 Chapman 等的方法,建立的大量快速制备线粒体 DNA 的方法,既有简便快速的特点,又可大量制备多个样本,经研究实验表明,这是鱼类种群遗传学研究中,线粒体 DNA 制备的非常实用的方法。

## 参 考 文 献

- [1] Avise J C & Bermingham E. Molecular zoogeography of freshwater fishes in the southeastern US. *Genetics*. 1986, **113**:939—965.
- [2] Billington N. Genetic variation in Lake Erie yellow perch (*Perca flavescens*) demonstrated by mtDNA analysis, *J. Fish Biol.*, 1993, **43**:941—943.
- [3] Seyoum S & Kornfield I. Identification of the subspecies of *Oreochromis niloticus* (Pisces: Cichlidae) using restriction endonuclease analysis of mitochondrial DNA *Aquaculture*, 1992, **102**:29—42.
- [4] Stellwag E J & Payne E S. Mitochondrial DNA diversity of Roanoke River striped bass. *Trans. Am. Fish. Soci.*, 1994, **123**:321—334.
- [5] Lansman R A *et al.* The use of restriction endonucleases to measure mitochondrial DNA sequence relatedness in natural populations. III. Techniques and potential applications. *J. Mol. Evol.* 1981, **17**:214—226.
- [6] 吴乃虎等. 草鱼和鲤鱼线粒体 DNA 的分离纯化及其 COI 基因的分子克隆. *动物学报*, 1991, **37**(4): 375—382.
- [7] Tamura K & Aotsuka T. Rapid isolation method of animal mitochondrial DNA by the alkaline lysis procedure. *Biochemical Genetics* 1988, **26**, 815—819.
- [8] Palva T K & Palva E T. Rapid isolation of fish mitochondrial DNA with a commercially available plasmid isolation kit. *The Progressive Fish-culturist*. 1993, **55**:125—127.
- [9] Chapman R W & Power D A. A method for the rapid isolation of mitochondrial DNA from fishes, Technical report, Maryland sea grant program. UM-SR / M-TS-84-05. 1984.