

线粒体 DNA 的异质性与检测方法

刘艳 胡婧 黄原*

(陕西师范大学生命科学院 西安 710062)

摘要: 线粒体 DNA 的异质性在生物学、医学、法医、生物技术等领域有重要的应用。本文从自然发生(包括体细胞突变、父系渗入和杂交)和人工产生(包括转基因、细胞融合、核移植和转线粒体)两大方面系统地介绍了线粒体 DNA 异质性的产生机制及其遗传。并介绍了线粒体 DNA 异质性的检测方法, 已知突变位点 mtDNA 异质性的检测方法有原位 PCR 技术、PCR-RFLP 和实时荧光定量 PCR 技术, 未知突变位点 mtDNA 异质性的检测方法有长 PCR 技术、时相温度梯度凝胶电泳(TTGE)和变性高效液相色谱(DHPLC)等。最后对克隆生物中线粒体异质性检测的应用实例作了介绍。

关键词: mtDNA ; 异质性 ; 父系渗入 ; 细胞融合 ; 核移植 ; 转线粒体 ; 检测

中图分类号 : Q953 文献标识码 : A 文章编号 : 0250-3263(2006)05-120-07

mtDNA Heteroplasmy and its Detection Methods

LIU Yan HU Jing HUANG Yuan

(College of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

Abstract: The mtDNA heteroplasmy that occurs naturally (somatic mutation, paternal introgression, and hybridization) and mtDNA heteroplasmy that is induced artificially (transgenesis, cell fusion, nuclear transfer, and mitochondrial transfer) as well as the related mechanisms are reviewed. The methods for detecting mtDNA heteroplasmy are described in two categories. mtDNA heteroplasmy with known mutation sites is detected by using *in situ* PCR, PCR-RFLP, and real-time fluorescent quantitative PCR, while mtDNA heteroplasmy with unknown mutation sites is detected by using long PCR, Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis (TTGE), and DHPLC. Finally, some examples of detecting mtDNA heteroplasmy in cloned animals are introduced briefly.

Key words: MtDNA ; Heteroplasmy ; Paternal introgression ; Cellular fusion ; Nuclear transfer ; Mitochondrial transfer ; Detection

1 线粒体 DNA 的异质性

一个生物体中一般仅有一个类型的线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA)。当不止一种类型的 mtDNA 在单个个体中存在时称 mtDNA 的异质性 (heteroplasmy)^[1], 也就是说, 同一个体同时存在两种或两种以上类型的 mtDNA。并且异质性发生的频率和多态性水平在不同组织和个体中是不同的, 在肌肉组织和衰老个体中发生频率较高^[1, 2]。

异质性可分成长度异质性和位点异质性两

类。长度异质性 (length heteroplasmy) 的大多数情形是线粒体基因组的某一段, 主要是 D 环区的串联重复^[3]。现存的长度异质性多被认为是中性选择的结果^[3]。位点异质性 (site heteroplasmy) 表现在一个或多个核苷酸位点上

基金项目 国家自然科学基金 (No. 30470238), 陕西师范大学研究生培养创新基金 (No. 2006CXS023);

* 通讯作者, E-mail: yuanh@snnu.edu.cn;

第一作者介绍 刘艳, 女, 硕士研究生, 研究方向: 昆虫分子生物学, E-mail: yantong_1@yahoo.com.cn.

收稿日期: 2006-04-21, 修回日期: 2006-06-30

不同的 mtDNA,即主要是由于 DNA 上某个或数个碱基的转换、颠换、插入或缺失等点突变所产生的,引起个体内的 mtDNA 异质性。异质性点突变的速率是随年龄而增长的,如 C-stretch 区发生异质性突变的速率就反映此规律^[4]。位点异质性极少数是具有病理性的,大多都为中性突变。异质性的细胞在连续分裂过程中会发生遗传漂变,这使得细胞中突变型 mtDNA 的比例从 0% ~ 100% 之间变化。

线粒体 DNA 的异质性在生物学、医学、法医和生物技术等领域有重要的应用。本文系统地介绍线粒体 DNA 异质性的产生机制、遗传规律、检测方法及在克隆生物中的应用实例。

2 自然发生的线粒体 DNA 的异质性及遗传

2.1 体细胞突变形成的异质性

个体在生长发育过程中,体细胞中的 mtDNA 会发生突变,由此引起个体不同组织或细胞的线粒体具有异质性。mtDNA 缺乏组蛋白保护,与氧化磷酸化场所(线粒体内膜)相距甚近,较易受自由基攻击,氧化损伤从而引起突变,复制快速且无校对功能以及缺乏有效的 DNA 修复机制,因而具有较高的复制错误率及较低的修复能力^[5],所以其突变率是核 DNA 的 10 ~ 20 倍,其相应的进化速度比核 DNA 快 5 ~ 10 倍^[2]。因此,随着时间的推移,同一个体发生部分突变的 mtDNA 不断复制,进而形成了具有异质性的细胞亚群。

体细胞突变可发生在个体的不同时期,并且这种突变能引起个体病变。通常是随着个体年龄的增加,它们的突变数目也随之增加,当 mtDNA 突变数目达到某一阈值(threshold level),大多为 60% 或更高,便可引起某组织或器官功能的病变^[6],即阈值效应(threshold effect)。这个阈值的变化范围是依赖于突变类型、组织类型和需氧条件等因素^[11],但最主要的影响因素是年龄,且这种阈值随年龄的变化而影响显著,年龄越大的个体,其阈值越低。

20 世纪 90 年代早期,在多种动物(秀丽线虫 *Caenorhabditis elegans*、黑腹果蝇 *Drosophila*

melanogaster、小鼠 *Mus musculus*、恒河猴 *Macaca mulatta*、黑猩猩 *Pan troglodytes* 和人类 *Homo Sapiens*) 中发现线粒体基因组的重组现象也与衰老密切相关^[7,8]。年龄相关的 mtDNA 突变主要发生在后有丝分裂的组织中,大多情况下,这些突变都是异质性的(突变和野生型 mtDNA 共存)并且小比例的野生型基因具有强的保护效应来对抗线粒体的代谢缺陷症^[8]。

线粒体 DNA 也普遍存在多缺失(multiple deletions)现象,研究表明这种 mtDNA 的多缺失是与各种病变情况相关,特别是肌病(myopathy)、多肌肉痛、风湿性关节炎、心肌症以及自然衰老的疾病有关^[9]。

2.2 父系渗入产生的异质性

通常人们认为,动物的 mtDNA 是严格母性遗传的,但已有研究发现,在果蝇、鼠、扇贝和人类中,线粒体有双亲传递现象,父本的线粒体能渗入至下一代^[10,11]。据现今对 mtDNA 的认识,mtDNA 父系遗传可能存在有两种机制^[12],一是父系 mtDNA 的渗入机制,通过对小鼠精子线粒体示踪标记的研究表明,随着受精卵的发育,精子线粒体在受精卵中所占的比率逐渐下降甚至完全消失。这说明 mtDNA 父系遗传涉及到受精过程中父系 mtDNA 在受精卵中的存留,同时在动物受精过程中肯定存在某种机制来限制外源 DNA 在胞质中的扩散。另一种可能的机制是 mtDNA 的重组。有实验报道 mtDNA 之间存在重组, Awadalla 等人通过对灵长类 mtDNA 的连锁不平衡分析研究发现, mtDNA 同样广泛存在重组现象,而且重组的最大可能就是父母 mtDNA 之间的重组^[13]。

2.3 杂交形成的异质性

mtDNA 的异质性在近缘种间杂交个体中是一个较为普遍的现象。mtDNA 主要由卵子传递,各杂交动物 mtDNA 大多都表现为母系遗传^[14]。mtDNA 严格的母系遗传方式有助于依据 mtDNA 的差异追溯不同的母系起源,同时也可预测杂交的方向。但近期研究检测表明,杂交后代中也具有极微量的父系 mtDNA^[15]。通过对小鼠种内杂交的实验显示,杂交样本中父系 mtDNA 在胚胎发育的前核后期被降解,牛和恒河猴在八细胞期之前降

解^[6]。这说明杂交形成的异质性是由于细胞内识别异源 mtDNA 的特异性降低,导致依赖于泛素识别异源物质的降解机制或者类似于泛素机制的缺乏,从而允许精子 mtDNA 在杂交后代中的遗传(尽管以很低水平)^[16,17],同时也说明了线粒体遗传中“瓶颈效应”的作用。

3 人工产生的线粒体 DNA 的异质性及遗传

3.1 转基因生物中的异质性 截止目前,人们对转基因生物中的 mtDNA 异质性研究很少,相关的报道大多集中在核移植和胞质移植方面。有人对转基因鱼进行了研究,发现往往在胚胎发育的晚期发生异源基因的整合,经过注射的 DNA 在整合之前的细胞中均能检测到,也就是说囊胚期能检测到异源线粒体,出生后的个体不一定能检测到^[18]。

3.2 细胞融合形成的异质性 细胞融合 (cellular fusion) 使供体和受体两种 mtDNA 存在于融合的细胞质中,并且供体来源的线粒体在胚胎发育过程中占主导地位。对包含有不同突变 mtDNA 数量的胞质杂合体研究显示,绝大多数 DNA 突变的线粒体仍能具有其正常功能,其遗传表现是隐性的。也就是说,细胞在发生呼吸链缺损之前能够容忍具有高百分比(70%~90%)的突变 mtDNA。通过对野生型和突变型两种 mtDNA 共存的转基因小鼠模型分析表明,生命体中存在着“线粒体间的互补效应机制 (inter-mitochondrial complementation mechanism)^[15]”,使细胞融合的杂合体具有修复缺损呼吸链的作用^[19]。融合产生的 mtDNA 异质性的遗传方式通常是以非随机的遗传漂变机制进行的。

3.3 核移植形成的异质性 核移植 (nuclear transfer, NT) 是把供体的核质体(细胞核及其周围的部分胞质)直接注入去核的受体卵胞质,或者是应用电融法把整个供体细胞放至去核的受体卵周隙内。但这两种方法都不可避免地会将一部分(或全部)供体细胞的胞质带入受体卵内,因此在重构胚胞质中含有供体细胞和受体

卵母细胞两种来源的线粒体^[20],即细胞线粒体的异质性。

种内异质性小鼠的产生是通过把胚胎细胞质与单细胞胚融合(fusing embryos)或者是胚胎胞质与一些由胞质包裹的胚胎前核进行融合^[21],并且子代中常发生供体 mtDNA 的分离 (mtDNA segregation),也就是说供体 mtDNA 的遗传方式具有多样性,其在后代总 mtDNA 中可能只占很少比例也可能不存在,这都是由随机遗传漂变所引起的^[22]。然而,在这些小鼠中发现各种 mtDNA 的表型在一定程度上是受组织特异性和年龄的影响^[23]。也就是说,哪种 mtDNA 占优势是由各种因素综合决定。

对于核移植个体的线粒体存在着几种不同的遗传方式^[24]:一种是与正常受精胚胎发育中线粒体变化相似,供体来源的线粒体被受体卵胞质中的泛素标记,随后被蛋白质水解作用降解并消失,最后只剩下受体类型的线粒体;另一种是供体细胞和受体细胞的线粒体都被复制,导致线粒体的异质性;再一种是受体来源的线粒体被选择性降解,供体来源的线粒体选择性复制,核移植个体中以供体类型的线粒体占主导。近年来对牛核异质的 mtDNA 研究表明,供体 mtDNA 明显具有复制性优势^[25]。这些 mtDNA 组成上占优势的变化可能是与 NT 操作过程中差异以及核质间相互作用的不同而不同。供体 mtDNA 存在的比率是与重建后供体胞质存在的数量有关^[25]。

3.4 转线粒体细胞中的异质性 转线粒体 (mitochondrial transfer) 最早可追溯到 1989 年, Ebert 等将异源线粒体注入小鼠胚胎,经过注射的胚胎移植后发育正常,但在出生的仔鼠中检测不到异源线粒体。通常显微注射线粒体产生的转线粒体小鼠都具有异质性细胞(突变和野生线粒体基因组共存)。现在发展起来的转线粒体细胞是应用细胞融合和显微注射等分子细胞生物学技术,以无线粒体 DNA 细胞即 ρ^0 为中介,将细胞中全部线粒体 DNA 被外源的线粒体 DNA 所替换,而其核基因仍保持不变的细胞系。研究表明,转线粒体细胞中的临界线粒体

数目大约是100 000个,这样才能提供足够的能量来保证胚胎发育、细胞分裂及细胞的动态变化等过程,即最低 ATP 含量阈值(minimum threshold of ATP content)^[17, 26-28]。同时实验结果表明,这种细胞中不只存在一种线粒体基因型,并且其中一种基因型常发生选择性遗传漂变和扩增,这是由真核有机体中存在消除外源 mtDNA 的机制所决定的。该技术在研究与线粒体基因组的相互作用以及线粒体 DNA 突变的分子致病机制等方面发挥重要作用,在一些线粒体相关疾病的研究中得到广泛应用。

4 线粒体 DNA 异质性的检测

4.1 对已知突变位点 mtDNA 异质性的检测

4.1.1 原位 PCR 技术 原位 PCR 技术(*in situ* PCR, ISPCR)是随原位杂交技术检测扩增产物而发展起来的,是在细胞水平上研究 mtDNA 突变的分布及定位的一种比较理想的方法,它使 PCR 反应可直接作用在组织切片、细胞涂片上,并能对原细胞位点上的 DNA 直接进行扩增。这种方法能更好的分析重组或突变 mtDNA 在细胞及其各种组织中的分布,为解析异质性的分布提供可靠的技术支持。同时,结合酶组织化学方法能使 mtDNA 突变和其单个细胞的生物能缺陷(bioenergy defects)之间的关系相联系起来^[29]。这个方法比原位杂交更灵敏,仅用低 PCR 循环数目就能检测到4 977 bp长的 mtDNA 缺失,但此方法不能测到更长片段的缺失^[29]。

4.1.2 PCR-RFLP PCR-RFLP 是针对已知点突变 mtDNA 的检测。此法首先是对含有突变位点片段的 mtDNA 和野生型 mtDNA 分别 PCR 扩增,接着再以扩增好的产物为模版,采用相应的限制性内切酶分别对突变和野生的 DNA 片段进行酶切,消化产物电泳并比较分析野生与突变的酶切图谱。常见用于分析人类线粒体 DNA 突变点为 A3243G,引物 3 116 ~ 3 134F 和 3 353 ~ 3 333R 扩增 238 bp 长的含 A3243G 的 DNA 片段,变性 94℃ 45 s,复性 55℃ 45 s,延伸 72℃ 45 s,30 个循环,扩增产物再用 *Hae* III 酶切消化 37℃、2 h,产物直接电泳检测即可^[30]。

4.1.3 实时荧光定量 PCR 实时荧光定量 PCR 技术(Real-time fluorescent quantitative PCR)自 1996 年由美国应用生物系统公司推出后,很快就应用到对线粒体异质性的检测。通过该技术可以对发育至不同阶段的克隆动物 mtDNA 的变化趋势进行实时监控,并可定性及定量检测突变型 mtDNA^[31]。此法是基于已知突变位点的检测,涉及一特定 PCR 引物的合成,此引物序列在 3' 末端含有两个错配碱基(野生或突变碱基),从而特定扩增野生或突变 DNA 序列,即用特定等位基因引物来定量确定异质性突变的比率。此法可快速定量检测异质性 mtDNA,比 PCR-RFLP 检测低频率突变体更为精确。Langping He 等人用此方法与 Southern blotting 和三引物竞争 PCR 等技术进行了比较检验分析,发现用此技术检测 mtDNA 异质性的灵敏度高,达到了单个细胞、单个碱基的水平,成功地检测到单个 COX 缺陷型细胞 mtDNA 的单缺失和多缺失,以及缺失的相对含量等^[32]。

4.2 对未知突变位点 mtDNA 异质性的检测

4.2.1 长 PCR 技术 长 PCR 技术(Long PCR)是分析多种 mtDNA 基因重排的好工具,这是由于它能独立分析远大于4 977个碱基长度的缺失^[17]。这个技术也广泛应用于全线粒体基因组的扩增。一般的 PCR 技术只能用于检测到 < 5 kb 大小的目标片段,并不能充分解释所观察到的多 mtDNA 基因重组现象^[33]。长 PCR 不仅能检测到一般的缺失,而且能检测到其他主要类型的缺失和发生在线粒体基因组的多重组现象。

4.2.2 时相温度梯度凝胶电泳 TTGE TTGE 是一种新型的检测 DNA 片段中单个碱基突变的电泳方法。它是基于突变的单碱基对在变性凝胶电泳中的溶解特性从而分离异源双链(heteroduplex)与同源双链(homoduplex),即突变型与野生型 DNA 片段^[34]。变性聚丙烯酰胺凝胶电泳的同时增加温度梯度,使野生型与突变型 DNA 随温度的增加而逐步解链变性。由于变性温度因 DNA 序列不同而异,当有单碱基发生突变时其解链的变性温度也不一样,从而在达

到相同温度时各自的迁移位置发生变化。突变序列因电泳阻力大而迁移缓慢,故可根据迁移率的不同而区分同源与异源双链 DNA 分子。此方法简便快速且灵敏性强,易于在小型实验室使用,若结合 PCR 测序,可精确分析突变碱基位点,现已广泛应用于线粒体突变相关疾病的研究。

4.2.3 变性高效液相色谱 DHPLC DHPLC 技术是 1995 年由 Oefner 和 Underhill 等人研发的,不仅能自动监测到单碱基突变替换,而且对于短片段的插入缺失也能精确识别出来^[35]。DHPLC 的基本原理类似于 TTGE,即在一系列优化温度条件下分离野生型与突变型 DNA 片段。分离介质是基于逆向相位液层析(reversed-phase liquid chromatography)原理的疏水性层析柱。DHPLC 最主要的优点是能快速、全自动、高通量、高灵敏度检测突变 DNA 片段,但此仪器使用复杂繁琐且价格昂贵。

近年来也发展了一些检测突变碱基的其他方法,如 Pyrosequencing、Biplex invader assay、amplification refractory mutation system、直接序列分析法(direct sequence analysis)、碳酸银染色法(silver carbonate staining)等。Pyrosequencing 技术是新发展的 DNA 序列分析技术,通过核苷酸和模板结合后释放焦磷酸从而引发酶级联反应,促使荧光素发光并进行检测,此技术不需要电泳及荧光染料,能快速精确地检测到异质性 SNP 位点^[36];Biplex invader assay 则不需要 PCR 扩增,是基于一种耐热侧翼内切酶(thermostable flap endonuclease)的活性,此酶能使两特异引物与靶序列匹配的重叠区域进行剪切,剪切的片段经荧光反应从而能高通量准确检测异质性突变位点^[37];而 Amplification refractory mutation system(ARMS)是一种可以检测任何已知点突变或小基因片段缺失的扩增技术,此方法简便、可靠^[38]。直接序列分析法(direct sequence analysis)是通过目标序列直接进行测序反应,所得数据再比对分析找出突变位点;碳酸银染色法(silver carbonate staining)是在形态水平上对病变的异质性线粒体检测的技术,依赖于线粒体

某些酶活性程度和注射银染的反应水平,能在光镜下直接定位观察^[39]。

4.3 克隆生物中线粒体异质性的检测 自 1997 年体细胞克隆绵羊“Dolly”降生后,体细胞克隆猪、山羊以及异种体细胞盘羊等研究相继获得成功,遗传物质的检测是这些研究中鉴定体细胞克隆动物来源的主要依据^[40]。在体细胞克隆研究中,无论是将体细胞注入去核(遗传物质)卵母细胞透明带下经电融合融入,还是直接将体细胞核注入去核(遗传物质)卵母细胞中,都不可避免的将来自体细胞的 mtDNA 带入卵母细胞中。此时来自体细胞的核 DNA、少量 mtDNA 和卵母细胞自身的 mtDNA 在重构胚中共存。由于胞质遗传物质(主要是 mtDNA)在胚胎发育中起着重要的作用,因此克隆动物的 mtDNA 检测也成为动物克隆研究的热点问题。

对于同种动物克隆的研究,由于 mtDNA 的差异较小,故需选用保守性较差的、个体间具有差异的调控区 D 环(D-loop)作为遗传标记,利用 D 环两端相对保守的序列设计引物,经 PCR 扩增后测序分析来检测 mtDNA 的特征。如 Evans^[41]等通过对扩增出的长度为 544 bp 的 D 环片段进行测序分析,结合建立在多态性分析基础上的 PCR-RFLP 分析证明了 10 头体细胞克隆绵羊的 mtDNA 均来源于受体卵母细胞。而对于亚种间或不同品系间动物克隆的 mtDNA 检测,则要在测出各亚种或各品系大量个体的 D 环序列后对所测序列进行比对分析,找出在亚种内或品系内的保守序列设计引物,特异地扩增出亚种或品系的特征片段,再测序检测。

对于异种动物克隆的 mtDNA 检测,可选用较保守的细胞色素 *b*(*cyt b*)、12S rRNA 等为研究对象,分别扩增供体、受体的序列并进行测序分析,即可进行 mtDNA 的鉴定。

现阶段该领域的研究是以测序为主检测 mtDNA 的异质性,但测序工作复杂、繁琐、费用昂贵。我们在对 GenBank 中检索获得到的所有人和猪 mtDNA *cyt b* 基因进行序列比对的基础上,对人和猪的某些特异性的 DNA 片段序列进行分析。同时还依据人和猪 mtDNA *cyt b* 氨基

酸序列组成不同设计各自特异性引物,运用 PCR 技术扩增特异片段,其各自扩增片段的长度大小不一(人扩增的产物大小为 500 bp 左右,而猪的扩增产物为 300 bp 左右),电泳分离不同分子大小的扩增产物,为快速、简易、灵敏地鉴别异源 mtDNA 提供方法以及为检测异源 mtDNA 提供思路(未发表资料)。根据人 mtDNA *cyt b* 的同源序列设计本实验的引物:正向引物 HR:5' CAC CAG TCT TGT AAA CC 3',反向引物 HF:5' TGA AGT AGG AAC CAG AT 3'。人的特异性引物扩增出的片段应在 500 bp 左右。运用 ClusaIX 软件把从 GenBank 中获得的 10 条猪线粒体 *cyt b* 的基因与人的全线粒体基因组进行序列比对,分析序列同源性和序列的相似度。以相似度较低或同源性较差的一段序列作为设计引物的范围,设计出最佳引物。SR:5' TAT AGGAATC CGT AGT ATA 3';SF:5' ACA TCC GAA AAT CAC AC 3',扩增产物的长度为 315 bp。2 个 PCR 反应在相同条件下进行,扩增条件:预变性 94℃ 2 min,变性 94℃ 40 s,复性 43℃ 1 min,延伸 72℃ 1 min,32 个循环。PCR 反应结束后直接通过凝胶电泳即可分析异源 mtDNA 的存在,为快速简便的鉴定异种移植细胞 mtDNA 的类型提供方法。

参 考 文 献

- [1] Lisa M K ,Erica B R ,David M R . Aging ,mating ,and the evolution of mtDNA heteroplasmy in *Drosophila melanogaster* . *Pro Nat Acad Sci* ,1998 **95** :2 372 ~ 2 377 .
- [2] Reynier P ,Malthiery Y . Accumulation of deletions in mtDNA during tissue aging : analysis by long PCR . *Biochem Biophys Res Commun* ,1995 **217** (1) :59 ~ 67 .
- [3] Casane D , Gueride M . Evolution of heteroplasmy at a mitochondrial tandem repeat locus in cultured rabbit cells . *Curr Genet* 2002 **42** (1) :66 ~ 72 .
- [4] Calloway C D ,Reynolds R L ,Herrin G L Jr , et al . The frequency of heteroplasmy in the HVII region of mtDNA differs across tissue types and increases with age . *Am J Hum Genet* , 2000 **66** (4) :1 384 ~ 1 397 .
- [5] Khaidakov M , Heflich R H , Manjanatha M G , et al . Accumulation of point mutations in mitochondrial DNA of aging mice . *Mutation Research* 2003 **526** (1 ~ 2) :1 ~ 7 .
- [6] Sutovsky P ,Moreno R D ,Ramalho-Santos J ,et al . Ubiquitin tag for sperm mitochondria . *Nature* ,1999 **402** (6 760) :371 ~ 372 .
- [7] Kaneda H ,Hayashi J ,Takahama S , et al . Elimination of paternal mitochondrial DNA in intraspecific crosses during early mouse embryogenesis . *Pro Nat Acad Sci* ,1995 **92** :4 542 ~ 4 546 .
- [8] Melov S ,Schneider J A ,Coskun P E ,et al . Mitochondrial DNA rearrangements in aging human brain and *in situ* PCR of mtDNA . *Neurobiology of Aging* ,1999 **20** (5) :565 ~ 571 .
- [9] Reynier P ,Chretien M F ,Savagner F ,et al . Long PCR analysis of human gamete mtDNA suggests defective mitochondrial maintenance in spermatozoa and supports the bottleneck theory for oocytes . *Biochemical and Biophysical Research Communications* ,1998 **252** (2) :373 ~ 377 .
- [10] Rokas A ,Ladoukakis E D ,Zouros E . Animal mitochondrial DNA recombination revisited . *Trends in Ecology and Evolution* 2003 **18** :411 ~ 417 .
- [11] Coller H A ,Bodyak N D ,Khrapko K . Frequent intracellular clonal expansions of somatic mtDNA mutations significance and mechanisms . *Ann N Y Acad Sci* 2002 **959** :434 ~ 447 .
- [12] 赵兴波 ,储明星 ,李宁等 . 绵羊线粒体 DNA 的父系遗传 . *中国科学 (C 辑)* 2000 **30** (6) :642 ~ 646 .
- [13] Awadalla P ,Eyre-Walker A ,Smith J M . Linkage disequilibrium and recombination in hominid mitochondrial DNA . *Science* , 1999 **286** (5 449) :2 524 ~ 2 525 .
- [14] Uphot W B ,Dawid I B . Mapping of mitochondrial DNA of individuals sheep and goats : rapid evolution in the D-loop region . *Cell* ,1977 **11** :571 ~ 583 .
- [15] Westermann B . Merging mitochondria matters cellular role and molecular machinery of mitochondrial fusion . *European Molecular Biology Organization* 2002 **3** (6) :527 ~ 531 .
- [16] Gyllenstein U , Wharton D , Josefsson A , et al . Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice . *Nature* ,1991 **352** (6 332) :255 ~ 267 .
- [17] Shitara H ,Hayashi J I ,Takahama S , et al . Maternal inheritance of mouse mtDNA in interspecific hybrids : segregation of the leaked paternal mtDNA followed by the prevention of subsequent paternal leakage . *Genetics* ,1998 **148** (2) :851 ~ 857 .
- [18] 刘建忠 ,熊远著 ,蒋思文等 . 转基因动物研究新进展 . *生物技术通报* 2000 **4** :10 ~ 14 .
- [19] Eyre-Walker A ,Smith N H ,Smith J M . How clonal are human mitochondria ? *Proc Biol Sci* ,1999 **266** (1 418) :477 ~ 483 .
- [20] Han Z M ,Chen D Y ,Li J S , et al . Mitochondrial DNA heteroplasmy in calves cloned by using adult somatic cell . *Molecular Reproduction and Development* 2004 **67** (2) :207 ~

- 214
- [21] Steinborn R , Schinogl P , Wells D N , *et al.* Brem G . Coexistence of *Bos taurus* and *B. indicus* mitochondrial DNAs in nuclear transfer-derived somatic cattle clones. *Genetics* , 2002 , **162** (2) : 823 ~ 829 .
- [22] Jenuth J P , Peterson A C , Fu K , *et al.* Random genetic drift in the female germline explains the rapid segregation of mammalian mitochondrial DNA. *Nat Genet* , 1996 , **14** (2) : 146 ~ 151 .
- [23] Jenuth J P , Peterson A C , Shoubridge E A . Tissue-specific selection for different mtDNA genotypes in heteroplasmic mice. *Nat Genet* , 1997 , **16** (1) : 93 ~ 95 .
- [24] 杨彩侠 , 文端成 , 张可莹等 . 哺乳动物核移植中线粒体命运 . 生物化学与生物物理进展 , 2003 , **30** (4) : 514 ~ 517 .
- [25] Takeda K , Akagi S , Kaneyama K , *et al.* Proliferation of donor mitochondrial DNA in nuclear transfer calves (*Bos taurus*) derived from cumulus cells. *Molecular Reproduction and Development* 2003 , **64** (4) : 429 ~ 437 .
- [26] Reynier P , May-Panloup P , Chretien M F , *et al.* Mitochondrial DNA content affects the fertilizability of human oocytes. *Molecular Human Reproduction* 2001 , **7** (5) : 425 ~ 429 .
- [27] Hsieh R H , Tsai N M , Au H K , *et al.* Multiple rearrangements of mitochondrial DNA in unfertilized human oocytes. *Fertility and Sterility* 2002 , **77** (5) : 1 012 ~ 1 017 .
- [28] Barritt J A , Brenner C A , Malter H E , *et al.* Mitochondria in human offspring derived from ooplasmic transplantation. *Human Reproduction* 2001 , **16** (3) : 513 ~ 516 .
- [29] Kovalenko S A , Harms P J , Tanaka M , *et al.* Method for *in situ* investigation of mitochondrial DNA deletions. *Human Mutation* , 1997 , **10** (6) : 489 ~ 495 .
- [30] Lee-Jun C , Wong , Richard G . Boles . Mitochondrial DNA analysis in clinical laboratory diagnostics. *Clinica Chimica Acta* 2005 , **354** : 1 ~ 20 .
- [31] He L , Chinnery P F , Durham S E , *et al.* Detection and quantification of mitochondrial DNA deletions in individual cells by real-time PCR. *Nucleic Acids Research* 2002 , **30** (14) : e68 .
- [32] Szuhai K , Ouweland J , Dirks R , *et al.* Simultaneous A8344G heteroplasmy and mitochondrial DNA copy number quantification in myoclonus epilepsy and ragged-red fibers (MERRF) syndrome by a multiplex molecular beacon based real-time fluorescence PCR. *Nucleic Acids Research* , 2001 , **29** (3) : e13 .
- [33] Reynier P , Malthiery Y . Accumulation of deletion in mtDNA during tissue aging : analysis by long PCR. *Biochem Biophys Res Commun* , 1995 , **217** : 59 ~ 67 .
- [34] Wong L J , Chen T J , Tan D J . Detection of mitochondrial DNA mutations using temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Electrophoresis* 2004 , **25** : 2 602 ~ 2 610 .
- [35] Biggin A , Henke R , Bennets B , *et al.* Mutation screening of the mitochondrial genome using denaturing high-performance liquid chromatography. *Mol Genet Metab* 2005 , **84** : 61 ~ 74 .
- [36] Nirupma Pati , Valerie Schowinsky , Obrad Kokanovic , *et al.* A comparison between SNaPshot , pyrosequencing , and biplex invader SNP genotyping methods : accuracy , cost , and throughput. *J Biochem Biophys Methods* 2004 , **60** : 1 ~ 12 .
- [37] Yukihiko Mashima , Makoto Nagano , Tomoyo Funayama , *et al.* Rapid quantification of the heteroplasmy of mutant mitochondrial DNAs in Leber ' s hereditary optic neuropathy using the Invader technology. *Clinical Biochemistry* 2004 , **37** : 268 ~ 276 .
- [38] Min-Ju Park , Myung Kyum Kim , Jun-Gyo In , *et al.* Molecular identification of Korean ginseng by amplification refractory mutation system-PCR. *Food Research International* , 2006 , **39** : 568 ~ 574 .
- [39] José M , López-Cepero . Silver carbonate staining reveals mitochondrial heterogeneity. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 2004 , **52** (2) : 211 ~ 216 .
- [40] 韩之明 , 陈大元 . 哺乳动物体细胞克隆遗传物质的检测 . 生物化学与生物物理学报 , 2002 , **34** (6) : 681 ~ 684 .
- [41] Evans M J , Gurer C , Loike J D , *et al.* Mitochondrial DNA genotypes in nuclear transfer-derived cloned sheep. *Nat Genet* , 1999 , **23** : 90 ~ 93 .