

南方鲇肝脏线粒体 DNA 的简便分离纯化方法*

谢志雄 杨代淑 郝广勤 熊全沫

(武汉大学生命科学学院 武汉 430072)

摘 要 摸索出可消除南方鲇肝脏 mtDNA 制备中出现的白色干扰物的方法,采用该方法处理后的 mtDNA 可用于限制性分析。

关键词 南方鲇 线粒体 DNA(mtDNA) 分离纯化 电泳

采用差速离心法制备鱼类肝脏线粒体 DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)时,有时会出现一种白色胶状物,此物对酚不敏感,用乙醇沉淀时可随 mtDNA 一同沉淀,且可溶于 TE 缓冲液(10mmol/L Tris, HCl, 1mmol/L Na₂EDTA, pH8.0),使制备的 mtDNA 呈乳白色胶体状。该物质的存在严重干扰了 mtDNA 的限制性分析,目前还未见到此种情况下 mtDNA 纯化方法的报道。本文介绍制备南方鲇 mtDNA 时出现此白色胶状物时的纯化方法,以供参考。

1 材料和方法

1.1 实验材料 南方鲇(*Silurus meridionalis*)于1995年4月和12月由湖北省水产科学研究所提供。

1.2 试剂 DNase I、RNase、SDS 及限制性内切酶均购自华美生物工程公司,SDS 用试剂重结晶;其他试剂为国产分析纯。

1.3 南方鲇肝脏 mtDNA 的分离纯化

(1)方法一^[1] 活鱼剪鳃放血取肝,冰浴匀浆,差速离心法制备线粒体;用 DNase I 纯化,SDS 破膜;蛋白抽提液(饱和酚:氯仿:异戊醇=25:24:1)除去蛋白,乙醇沉淀得 mtDNA 粗品;用 RNase 处理,除去 RNA,乙醇沉淀 mtDNA,溶于适量 TE 中。

(2)方法二^[2,3] 线粒体制备方法同上;将线粒体悬浮于适量 Buffer I (10mmol/L Tris, EDTA, 0.15mol/L NaCl, pH8.0)中,加入 2 倍

体积新鲜配制的 Buffer II (0.18mol/L NaOH, 1% SDS),轻轻混合,置冰上 20 分钟;迅速加入 0.5 倍总体积冰浴冷却的 Buffer III (KAc, 钾的浓度为 3mol/L, 乙酸根浓度为 5mol/L),立即混合,置冰上 30~45 分钟;离心,取上清液,蛋白抽提液抽提一次,乙醇沉淀 mtDNA,适量 TE (含 20μg/ml DNase-free 的 RNase)溶解, -20℃ 保存。

1.4 含白色胶状物的 mtDNA 的纯化 采用方法一和方法二制备 12 月份取材的南方鲇肝脏 mtDNA 时均有白色胶状物出现,合并两种方法制备的 mtDNA 保存于 TE 中。

将保存于 TE 中的 mtDNA 置于 -20℃ 冷冻, 2 小时直至过夜,时间长短视所含白色胶状物多寡而定,然后取出置室温解冻,反复数次,至溶液中出现白色絮状物为止;13 000g 离心,5 分钟,取上清液,乙醇沉淀 mtDNA,溶于适量 TE 中。

1.5 限制性内切酶酶切 酶反应条件参照华美生物工程公司提供的反应体系,37℃ 保温 2~4 小时,65~70℃ 保温 10 分钟终止反应。

1.6 琼脂糖凝胶电泳 采用无桥水平板电泳装置,琼脂糖胶浓度 0.8%,溴化乙锭加入胶中,终浓度 0.5μg/ml,缓冲系统为 0.5× TBE (45mmol/L Tris, 硼酸, 1mmol/L Na₂EDTA, pH8.3),恒压,3V/cm,室温下电泳 4~6 小时。

* 国家自然科学基金资助课题;

第一作者介绍:谢志雄,男,27岁,硕士;

收稿日期:1996-10-22,修回日期:1997-02-28

电泳完毕,置紫外灯下观察拍照。

2 结果

采用两种方法制备 12 月取样的南方鲇肝脏 mtDNA 时均出现白色胶状物,mtDNA 经限制性内切酶酶切后的电泳图谱(图 1-a 和 1-d 见封 3,下同)经冷冻处理后的 mtDNA 的限制性内切酶酶切电泳图谱(见图 1-b)。制备 4 月取样的南方鲇肝脏 mtDNA 时没有出现此种白色胶状物,mtDNA 经限制性内切酶酶切后的电泳图谱(见图 1-c)。

白色胶状物存在时,限制性内切酶可以切割 mtDNA,且电泳图谱中的片段大小与没有白色胶状物存在时的片段大小基本一致(见图 1-a、1-c),但电泳图谱中的带为弯月形,中间向前凸出,且分子大小在 2kb 以下的带收缩变形。冷冻处理后的 mtDNA 的限制性内切酶酶切电泳图谱中带的变形现象基本消除(见图 1-b、1-d)。

3 讨论

以往制备鱼类肝脏 mtDNA 时遇到白色胶状物出现时,往往将样品弃掉,改取肌肉或卵巢作材料,而以肌肉为材料制备 mtDNA 收得率相对较低且匀浆有一定困难,以卵巢为材料又受生殖季节的限制,因此有时不得不放弃以某种鱼为材料继续进行实验。有人提出利用密度梯度离心法进行纯化,但一般实验室条件难以做到。本文介绍的冷冻消除制备南方鲇肝脏 mtDNA 时出现的白色胶状物的纯化方法,操作简单,也不需要特别的仪器设备,就可使处理后的 mtDNA 适合限制性分析用,为鱼类肝脏 mtDNA 的制备纯化提供参考。

此种白色胶状物水溶性极好,且可使 DNA 片段在电泳中形成的带变形,推测该物质带有一些电荷,并与 mtDNA 间存在一定相互作用。是否属粘多糖或多糖等大分子亲水性物质尚有

待进一步分析鉴定。图 1-a 中,由于此物质的存在,泳道上荧光强,可能是其裹带 mtDNA、溴化乙锭所致。图 1-a、1-c 中,mtDNA 经相应的限制性内切酶切割后的所得片段大小基本一致,表明此物质存在对限制性内切酶切割 mtDNA 的活性影响不大,对酶活性抑制不明显。而对 mtDNA 在电场中的泳动有明显影响,严重干扰限制性分析。

本室在以往的研究工作中出现过类似现象,认为是由于匀浆条件过于剧烈所致,但经反复调整匀浆条件,制备 12 月取样的南方鲇肝脏 mtDNA 时白色胶状物最多有少许减少,却不能大部消除,表明匀浆条件的选择不是该现象产生的主要原因。制备 1995 年 4 月取样的南方鲇(体重 450g 左右)肝脏 mtDNA 时没有出现白色胶状物,酶切后的电泳图谱中带形正常(见图 1-c),而采用两种常用方法制备同年 12 月取样的南方鲇(体重 1 280~2 000g)肝脏 mtDNA 时均出现了白色胶状物,这是否提示该现象出现与鱼体大小、成熟程度或取材季节有关。另外,同期制备黄颡鱼(*Pseudobagrus fulvidraco*)肝脏 mtDNA 时没有出现白色胶状物,1994 年 11~12 月间,本室在制备鲫鱼(*Carassius auratus*)肝脏 mtDNA 时也出现过该现象,而与其同期制备鳊鱼(*Siniperca chuatsi*)、大眼鳊(*Siniperca kneri*)、鲤鱼(*Cyprinus carpio*)和草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)肝脏 mtDNA 时没有出现类似现象,表明该现象出现与鱼的种类有一定关系,这些尚待进一步探讨。

参 考 文 献

- 1 戴建华,殷文莉,杨代家等. 鲇鱼线粒体 DNA 的酶切图谱. 水产学报, 1994, 18(4): 312~320.
- 2 彭秀玲,袁仅英. 基因工程实验技术. 长沙:湖南科学技术出版社, 1987. 5~21.
- 3 Tamura, K., T. Aotsuka. Rapid Isolation Method of Animal Mitochondrial DNA by the Alkaline Lysis Procedure. *Biochem. Genet.*, 1988, 26(11~12): 815~819.

《南方鲇肝脏线粒体 DNA 的简便分离纯化方法》

一文之附图

(正文见第 28 页)

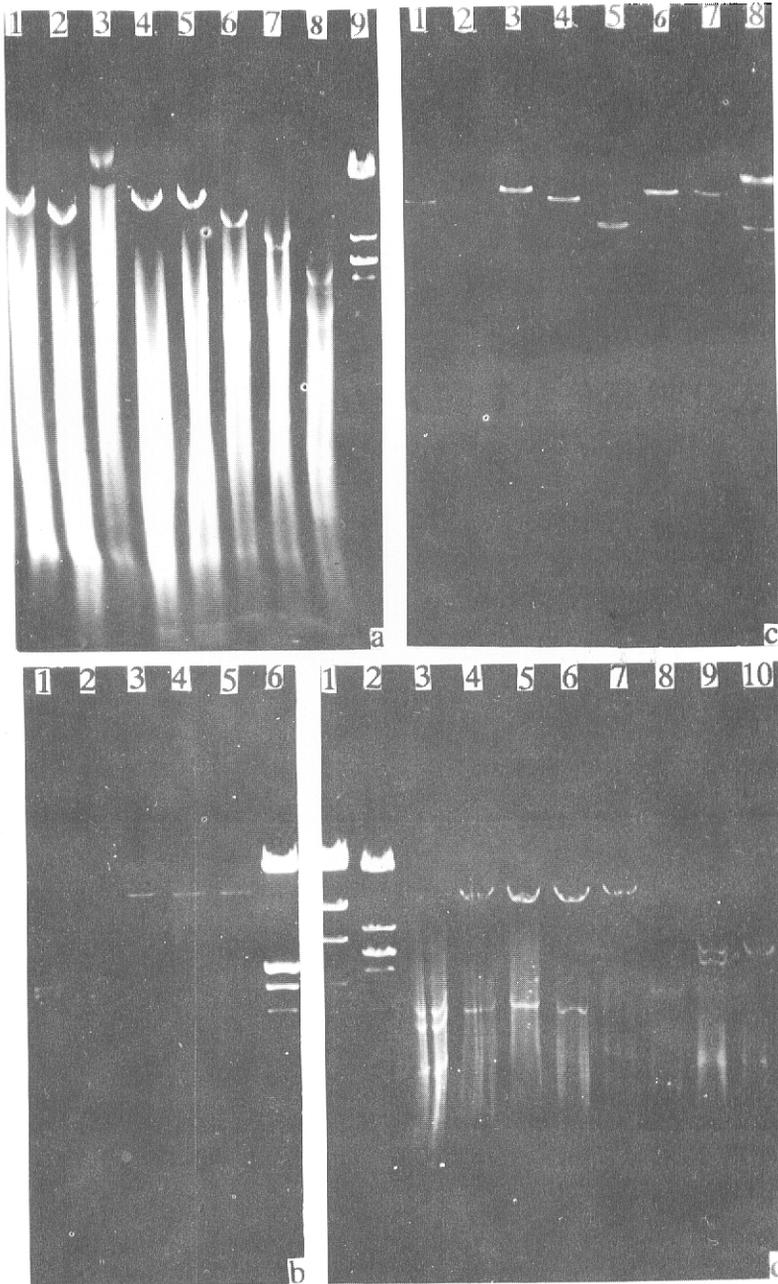


图 1 南方鲇 mtDNA 限制性内切酶酶切电泳图谱

a. 含白色胶状物的 mtDNA 的限制性内切酶单酶酶切图 1. *EcoR* I ; 2. *Pst* I ; 3. *Sal* I ; 4. *Pvu* II ; 5. *Bgl* II ; 6. *Bam*H I ; 7. *Bgl* I ; 8. *Hind* III ; 9. λ DNA/*EcoR* I b. 含白色胶状物的 mtDNA 经纯化后的限制性内切酶双酶酶切图 1. *Pst* I/*Hind* III ; 2. *Xho* I/*Pst* I ; 3. *Bgl* II/*EcoR* I ; 4. *Xho* I/*EcoR* I ; 5. *Pvu* II/*EcoR* I ; 6. λ DNA/*EcoR* I + *Hind* III c. 不含白色胶状物的 mtDNA 的限制性内切酶单酶酶切图 1. *Bam*H I ; 2. *Hind* III ; 3. *Bgl* II ; 4. *Pst* I ; 5. *Bgl* I ; 6. *Pvu* II ; 7. *Xho* I ; 8. λ DNA/*Hind* III d. 含白色胶状物的 mtDNA 的限制性内切酶双酶酶切图 1. λ DNA/*Hind* III ; 2. λ DNA/*EcoR* I ; 3. *Hind* III/*Bam*H I ; 4. *Bgl* II/*EcoR* I ; 5. *Xho* I/*EcoR* I ; 6. *Pvu* II/*EcoR* I ; 7. *Pst* I/*Bam*H I ; 8. *Pst* I/*Hind* III ; 9. *Xho* I/*Pst* I ; 10. *Pst* I/*Bgl* II