

条纹斑竹鲨线粒体 DNA 的研究

吴冰^① 陈元霖^② 桂慕燕

(福建省厦门大学细胞生物研究室, 厦门 361005)

摘要 用 6 种限制性内切酶分析了 4 条条纹斑竹鲨的线粒体 DNA (mtDNA)。PstI、HpaI、XbaI、EcoRI、EcoRV、BglII 在条纹斑竹鲨 mtDNA 分子上分别具有 0 至 2 个切点, mtDNA 分子大小为 16.6kb, 根据单酶和双酶完全酶解片段的大小, 构建了条纹斑竹鲨 mtDNA 的限制性酶切图谱。

关键词 条纹斑竹鲨, 线粒体 DNA, 限制性酶切图谱

中图分类号 Q953, S917

Studies on Mitochondrial DNA of *Chiloscyllium plagiosum*

WU Bing CHEN Yuanlin GUI Muyan

(Laboratory of Cell Biology, Xiamen University of Fujan Province, Xiamen 361005)

Abstract Mitochondrial DNA(mtDNA) from 4 samples of *Chiloscyllium plagiosum* was analyzed by 6 kinds of restriction. The number of cleavage sites were as follow: 2 for HpaI, XbaI and EcoRI respectively; 1 for BglII and EcoRV respectively; None for PstI. Molecular size of mtDNA was found to be 16.6kb. According to analysis of single and double enzyme cleavage, the map of restriction enzyme was constructed.

Key words *Chiloscyllium plagiosum*, mtDNA, Restriction endonuclease map

高等动物的线粒体 DNA (mtDNA) 是核外遗传信息载体, 系共价闭合的环状分子, mtDNA 分子小, 基因组中一般没有间隔序列, 大多数鱼类 mtDNA 含 16.5 ± 0.5 kb, 呈母性遗传, 它在动物遗传多样性和进化遗传学研究中已成为一个新的生长点^[1]。目前, 有关鱼类 mtDNA 限制性酶切图谱研究已有了一些报道^[2-4]。条纹斑竹鲨是一种重要的经济鱼类, 也是软骨鱼类中的一种, 在鱼类系统学中属于比较低等的种类。本研究可为进一步研究条纹斑竹鲨的线粒体基因组结构与功能、基因定位和鱼类的分子进化提供实验依据。

1 材 料 和 方 法

1.1 材料

条纹斑竹鲨 (*Chiloscyllium plagiosum*) 购自厦门市农贸市场。XbaI、EcoRI、EcoRV、HpaI、BglII、PstI、RNase A (DNase free) 及分子量标记均购自华美生物工程公司。SDS 为 Servi 进口分装, 重结晶后使用。

1.2 方法

1.2.1 mtDNA 的提取与纯化 参照 Koichiro Tamura 碱变性法^[5], 以及我们以前的工作^[6-9], 取新鲜肝脏, 置 SE 中剪碎、匀浆, 经差速离心制备线粒体。加适量 STE 溶解线粒体, 再依次加 NS 冰浴变性和 KAc 冰浴复性后, 用苯酚-氯仿抽提数次去蛋白质, 乙醇沉淀, 得 mtDNA 粗品。用 RNase 处理, 苯酚-氯仿抽提, 乙

①吴冰, 女, 29岁, 硕士学位, 专业方向为细胞生物学; 现工作单位: 暨南大学“2112工程”办公室, 广州 510632。

②通讯联系人。

醇沉淀, 得纯净 mtDNA, 溶于适量 TE 贮存备用。

1.2.2 酶解条件 单酶解的反应总体积 20 μ l (内含 2 μ l 酶解缓冲液), 双酶解反应总体积 30 μ l (内含 3 μ l 酶解缓冲液), 含 mtDNA 0.1~0.3 μ g, 酶 4~10 个单位, 在 37 $^{\circ}$ C 消化处理, 单酶解 4h, 双酶解 8h。

1.2.3 凝胶电泳 配制 0.9% 的琼脂糖凝胶, 电泳缓冲液 (TBE) 为 89 mmol/L 硼酸, 2.6 mmol/L Na₂EDTA, 89 mmol/L Tris, pH8.3。电压 2~3V/cm, 在室温下电泳 14h。EB 染色, 紫外检测仪上观察、拍照。

以 λ DNA / *Hind*III 和 λ DNA / *Hind*III + *Eco*RI 作为分子量标记, 按照各片段的分子量的对数与其相对迁移率的倒数绘制标准曲线, 测定未知片段的分子量。

2 结果与讨论

2.1 mtDNA 单酶酶切片段分析

条纹斑竹鲨 4 条个体分别用 6 种限制性内切酶单酶酶解, *Xba*I、*Hpa*I、*Eco*RI 在 mtDNA 上各有两个切点, *Eco*RV 和 *Bgl*II 仅有一个切点, *Pst*I 无切点。个体之间没有表现差异。因 mtDNA 分子为环状结构, 所以每一种内切酶单酶酶解所产生的切点数与片段数相同。mtDNA 的分子大小为 16.6 kb。电泳图谱及片段大小见图 1 和表 1。

表 1 条纹斑竹鲨 mtDNA 单酶切片段大小 (kb)

片段序号	<i>Hpa</i> I	<i>Xba</i> I	<i>Eco</i> RI	<i>Bgl</i> II	<i>Eco</i> RV	<i>Pst</i> I
A	8.5	10.3	13.0	16.6	16.6	无切点
B	8.1	6.3	3.6			无切点
合计	16.6	16.6	16.6	16.6	16.6	无切点

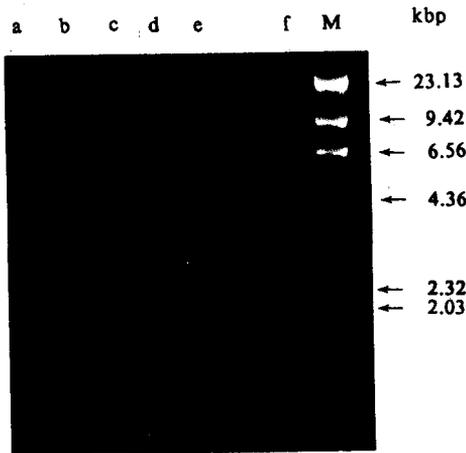


图 1 条纹斑竹鲨 mtDNA 单酶切电泳图谱

a. *Pst*I; b. *Xba*I; c. *Hpa*I; d. *Eco*RI;
e. *Bgl*II; f. *Eco*RV; M. λ DNA / *Hind*III。

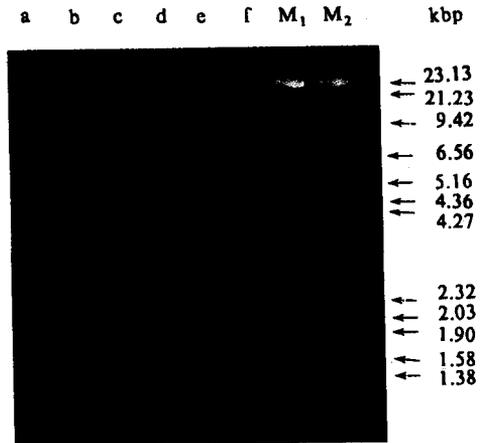


图 2 条纹斑竹鲨 mtDNA 双酶切电泳图谱

a. *Bgl*II / *Hpa*I; b. *Eco*RI / *Hpa*I; c. *Xba*I / *Hpa*I;
d. *Xba*I / *Bgl*II; e. *Xba*I / *Eco*RV; f. *Eco*RI / *Eco*RV;
M1. λ DNA / *Hind*III + *Eco*RI; M2. λ DNA / *Hind*III。

2.2 mtDNA 双酶酶解及限制酶图谱构建

我们用 6 对限制酶进行了双酶酶切: *Hpa*I / *Xba*I、*Hpa*I / *Eco*RI、*Hpa*I / *Bgl*II、*Xba*I / *Bgl*II、*Xba*I / *Eco*RV、*Eco*RI / *Eco*RV。电泳图谱及片段大小见图 2 和表 2。

根据单、双酶酶解片段分子量的计算, 可推知图 1b 中的 16.6 kb 片段及图 2c 中的 8.5 kb、8.1 kb 片段是由于

*Xba*I 酶解不完全产生, 图 2f 中的 13kb 片段是 *Eco*RV 酶解不完全的结果。这种酶解不完全的现象在实验中时有发生, 可能是酶解条件还不甚理想, 有待于进一步探索。

采用双酶法构建酶切图谱⁽¹⁰⁾。根据表 1、表 2 中单、双酶完全酶解的结果, 确定消失片段与新生片段的关系。选择 *Hpa*I 为中心酶进行片段间重叠与拼接, 判断各酶解片段的相对位置, 构建出 6 种酶的酶切图谱(图 3)。

表 2 条纹斑竹鲨 mtDNA 双酶切片大小 (kb)

片段序号	<i>Hpa</i> I / <i>Xba</i> I	<i>Hpa</i> I / <i>Eco</i> RI	<i>Hpa</i> I / <i>Bgl</i> II	<i>Xba</i> I / <i>Bgl</i> II	<i>Xba</i> I / <i>Eco</i> RV	<i>Eco</i> RI / <i>Eco</i> RV
1	5.8	6.6	8.5	10.3	10.3	7.5
2	4.5	6.4	6.8	5.3	3.2	5.5
3	4.0	2.1	1.3	1.0	3.1	3.6
4	2.3	1.5				
合计	16.6	16.6	16.6	16.6	16.6	16.6

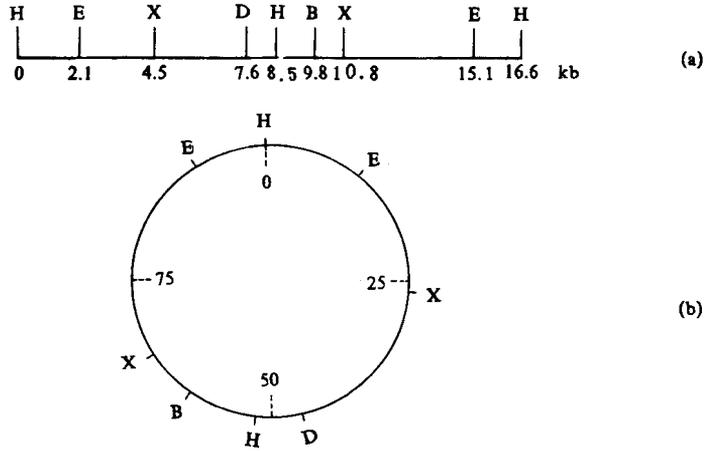


图 3 条纹斑竹鲨 mtDNA 限制性酶切图谱

a. 线型; b. 环型; H. *Hpa*I; E. *Eco*RI; X. *Xba*I; D. *Eco*RV; B. *Bgl*II。

由于 mtDNA 遵循严格的母系遗传, 所以选材不受性别限制, 并且无组织或器官特异性, 肝脏 mtDNA 能够反应条纹斑竹鲨的种类特性。我们对条纹斑竹鲨 4 个不同个体 mtDNA 限制性酶切片多态性 (RFLP) 的测定结果表明, 它们个体间的酶切类型是一致的, 这可能反应在厦门近海区分布的条纹斑竹鲨的种群是单一的, 对此尚待进一步证实。

参 考 文 献

- 1 桂建芳. 脊椎动物线粒体 DNA 的进化遗传学. 动物学杂志, 1990, 25(1): 50~55
- 2 樊连春等. 鳙鱼线粒体 DNA 的限制性内切酶图谱. 武汉大学学报 (自然科学版), 1994, 1: 121~125
- 3 戴建华等. 长吻鮠肝脏线粒体 DNA 的研究. 武汉大学学报 (自然科学版), 1994, 1: 115~120
- 4 戴建华等. 鳊鱼线粒体 DNA 的研究. 遗传, 1994, 16(5): 6~9
- 5 Koichiro Tamura *et al.* Rapid isolation method of animal mitochondrial DNA by the alkaline lysis procedure. Biochemical genetics, 1988, 26(11/12): 815~819
- 6 凌建华等. 蓖麻蚕蛹 mtDNA 的限制性内切酶图谱. 厦门大学学报 (自然科学版), 1993, 32(5): 641~646
- 7 凌建华等. 家蚕蛹线粒体 DNA 限制酶图谱初步研究. 厦门大学学报 (自然科学版), 1993, 32 (增刊1): 33~39
- 8 王 斌等. 天蚕、柞蚕线粒体 DNA 的限制性酶切电泳图谱. 蚕业科学, 1995, 21(2): 111~113
- 9 陈元霖等. 绢丝昆虫 mtDNA 多态性研究. 遗传, 1997, 19 (增刊): 43~45
- 10 余曙华等. 介绍几种限制性内切酶图谱分析方法. 生物化学与生物物理进展, 1985, 21(5): 66~70