

②

364-366

中国白兔线粒体 DNA 限制性图谱

蒙世杰, 阎小毅

(西北大学生物学系, 陕西 西安 710069)

S829.1

Q959.836

摘要:用6种限制性内切酶分析了中国白兔的线粒体DNA(mtDNA)。测得其相对分子质量约为16.8, EcoRV, BamHI, PstI, EcoRI, HindIII在中国白兔mtDNA上分别有1, 2, 2, 2, 6个切点, SalI在其上没有切点。根据单酶降解和双酶降解片段的相对分子质量, 构建了中国白兔mtDNA的限制性内切酶图谱。

关键词:中国白兔; 线粒体DNA; 限制性内切酶图谱

中图分类号:Q3 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-274X(1999)04-0364-03

家兔

中国白兔(Chinese white rabbit)是家兔(*Oryctolagus cuniculus domesticus*)的一个品种, 在国内得到广泛养殖, 具有重要的经济意义。关于中国白兔的起源, 观点各异, 罗泽群认为所有家兔均起源于地中海周围地区的穴兔(*Oryctolagus cuniculus linnaeus*)^[1], 陈耀王则认为中国白兔有可能起源于中国^[2]。这两种观点都是由古文献和解剖学依据得来的, 因而从DNA分子水平为中国白兔的起源提供证据则显得尤为重要。

线粒体DNA存在于所有真核生物细胞质中。高等动物的mtDNA为闭合的双股环状分子, 相对分子质量小, 约16.5 kb左右。与核基因不同, mtDNA呈母性遗传, 在遗传过程中不发生重组^[3], 且其一级结构的突变率高, 其进化速率约为单拷贝核DNA的5~10倍, 这些特点使得mtDNA在动物起源与进化以及动物群体遗传结构的研究方面得到广泛应用。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

中国白兔肝脏, 取自长安县养兔场。

1.2 主要试剂

6种限制性内切酶, λ -DNA/HindIII和RNaseA购自华美生物工程公司。SDS为Serva进口分装(用时重结晶)。其他药品为国产分析纯。

1.3 mtDNA的提取与纯化

参照文献[4]的方法。

1.4 限制酶消化

酶切总体积20 μ L, 含2 μ L缓冲液(购酶时所附), 1 μ g左右的mtDNA, 2~3倍过量限制性内切酶, 37°C保温4~6 h, 65°C变性10 min, 以终止反应。

1.5 凝胶电泳

配0.8%琼脂糖凝胶(含0.5 μ g/mL溴化乙锭)。电泳缓冲液为TPE(0.089 mol/L磷酸-0.002 mol/L EDTA)。电压2 V/cm, 室温电泳4~6 h。紫外灯下观察、拍照。

1.6 相对分子质量测定

以 λ -DNA/HindIII片段为相对分子质量标准, 按照各片段的迁移率与其相对分子质量的对数成反比的关系绘制标准曲线, 根据未知片段的相对迁移率, 测定其相对分子质量。

2 结果与讨论

2.1 单酶降解

本文使用6种识别6碱基的限制性内切酶分析中国白兔的mtDNA。其中SalI没有切点, EcoRV, BamHI, PstI, EcoRI, HindIII分别有1, 2, 2, 2, 6个切点, 分别产生1, 2, 2, 2, 6个限制性片段。单酶降解电泳结果见图1, 各片段相对分子质量见表1。

收稿日期: 1998-09-02

作者简介: 蒙世杰(1945-), 男, 陕西泾阳人, 西北大学副教授, 从事遗传学研究。

表 1 中国白兔 mtDNA 单酶降解片段相对分子质量

Tab. 1 Size of mtDNA Fragments cleaved with Single-enzyme

限制酶	片段大小			
Sal I	16.8			
EcoR V	16.8			
BamH I	11.65	5.15		
Hind III	6.5	3.2	2.5	1.75
	1.65	1.2		
Pst I	10.65	6.15		
EcoR I	10.65	6.15		

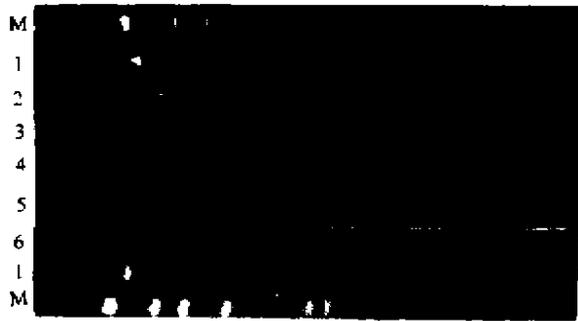


图 1 中国白兔 mtDNA 单酶降解电泳图谱

Fig. 1 Restriction patterns for mtDNA from Chinese white rabbit digested with single-enzyme

M λ -DNA/Hind III 1 EcoR V 2 BamH I
3 Hind III 4 Pst I 5 EcoR I 6 Sal I

本实验共分析了 2 只中国白兔的 mtDNA, 没有发现品种内多态性。可能的原因是 mtDNA 呈母性遗传, 一个个体即可反映一个母系集团的 mtDNA, 而这 2 只个体来自同一母系集团。

我们测得中国白兔 mtDNA 相对分子质量约为

表 2 中国白兔 mtDNA 双酶降解片段相对分子质量

Tab. 2 Size of mtDNA fragment cleaved with double enzymes

限制酶	片段大小								
EcoR V /BamH I	11.65	3.0	2.15						
EcoR V /Hind III	4.8	3.2	2.5	1.75	1.7	1.65	1.2		
EcoR V /Pst I	10.15	6.15	0.5*						
EcoR V /EcoR I	10.65	4.25	1.9						
BamH I /Pst I	7.15	4.5	3.5	1.65					
Pst I /EcoR I	8.25	3.75	2.4	2.4					
Hind III /EcoR I	3.6	3.2	2.9	2.5	1.75	1.6	1.2	0.05*	
Hind III /Pst I	5.3	3.2	2.5	1.75	1.65	1.2	0.8	0.4*	
BamH I /EcoR I	9.55	4.05	2.1	1.1					
BamH I /Hind III	4.7	3.2	2.05	1.8	1.75	1.65	1.2	0.45*	

* 不能在琼脂糖凝胶上检测到

由于技术限制, 一些小片段(表 2 中带“*”的片段)不能从琼脂糖凝胶上检测到, 但根据推测, 可能存在这些小片段。

16.8。用限制性内切酶分析福建黄兔的 mtDNA, 测得其相对分子质量为 18.45^[5]。高等动物同一物种不同品种间 mtDNA 相对分子质量出现如此大的差异, 其原因尚不清楚。

2.2 双酶降解

为了构建中国白兔的限制性酶图谱, 我们进一步做了双酶降解。由于 Sal I 在 mtDNA 上没有切点, 我们只用了 5 种酶(EcoR V, BamH I, Hind III, Pst I, EcoR I)进行双酶切。双酶消化电泳结果见图 2, 各片段相对分子质量见表 2。

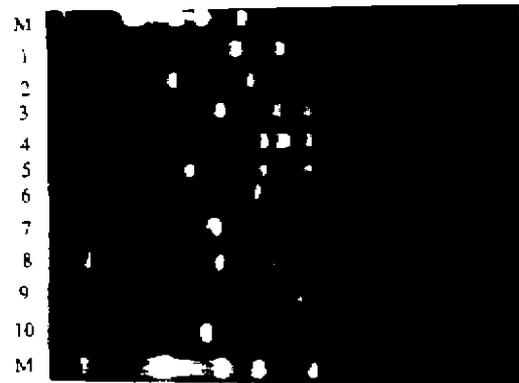


图 2 中国白兔 mtDNA 双酶降解电泳图谱

Fig. 2 Restriction patterns for mtDNA from Chinese white rabbit digested with double-enzyme

M λ -DNA/Hind III 1 BamH I /Hind III 2 BamH I /EcoR I
3 Hind III /Pst I 4 Hind III /EcoR I
5 Pst I /EcoR I 6 BamH I /Pst I 7 EcoR V /EcoR I
8 EcoR V /Pst I 9 EcoR V /Hind III 10 EcoR V /BamH I

2.3 限制性酶图谱

从图 1 可以看到 EcoR V 在中国白兔 mtDNA 上只有一个切点。我们以 EcoR V 切点为起点, 根据

单酶切和双酶切片段大小,确定各酶切点与 EcoR V 切点的相对位置,构建了中国白兔 mtDNA 的环形图谱和线形图谱(图 3)。由单酶切和双酶切结果共确定了 5 种酶 12 个切点在图谱中的位置。Hind III 有一个切点的位置难以由单酶切和双酶切结果确定。

今后有必要做 Hind III 的部分酶切以确定其另一个切点的位置。从限制性酶图谱中可以看出中国白兔 mtDNA 的限制性酶切点的分布是不均匀的,这意味着 4 种碱基的分布是随机的。这种现象在大熊猫和人类 mtDNA 上也有发现^[6-8]。

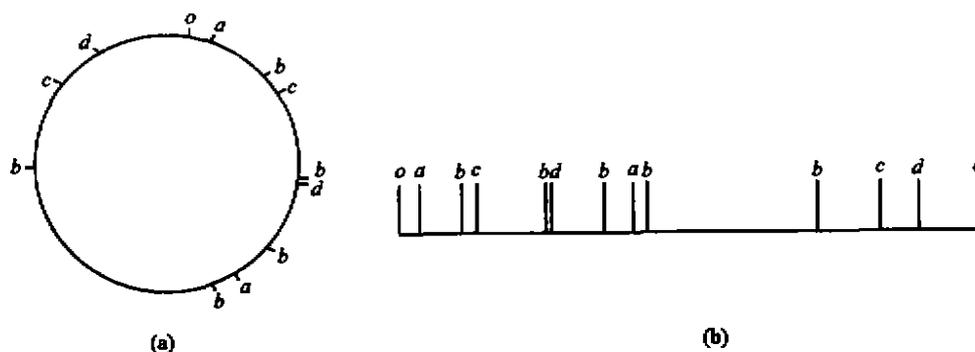


图 3 中国白兔 mtDNA 限制性图谱

Fig. 3 The restriction maps of mtDNA from Chinese white rabbit

(a) 环形图谱 Circular form; (b) 线形图谱 Linear form;

o EcoR V a Pst I b Hind III c BamH I d EcoR I

本工作用限制性内切酶分析了中国白兔的 mtDNA,并构建了 mtDNA 的限制性酶图谱。这些

结果为中国白兔 mtDNA 基因克隆及探讨中国白兔起源提供了重要资料。

参考文献:

- [1] 罗泽群. 我国家兔的起源[J]. 中国养兔杂志, 1983(2): 26-29.
- [2] 陈耀王. 关于我国家兔起源问题的商榷[J]. 中国养兔杂志, 1984(2): 37-43.
- [3] Claton, D. A. Replication of animal mitochondrial DNA[J]. Cell, 1982, 28: 693-705.
- [4] 王文, 施立明. 一种改进的动物线粒体 DNA 提取方法[J]. 动物学研究, 1993, 14(2): 197-198.
- [5] 秦树臻, 吴平, 周开亚, 等. 福建黄兔线粒体 DNA 的限制性内切酶分析[J]. 中国养兔杂志, 1993(5): 5-6.
- [6] 张亚平, 陈欣, 施立明. 大熊猫线粒体 DNA 的 9 种限制酶图谱[J]. 动物学研究, 1991, 12(2): 209-213.
- [7] 贺林, 穆金, 严明, 等. 中国人线粒体 DNA 的 8 种限制酶图及其电泳结构[J]. 遗传学报, 1988, 15(3): 215-222.
- [8] Tajima F, Nei M. Biases of the estimates of DNA divergence obtained by the restriction enzyme technique[J]. J. Mol. Evol., 1982, 18: 115-120.

(编辑 徐象平)

Restriction maps of mitochondrial DNA from Chinese white rabbit

MENG Shi-jie, YAN Xiao-yi

(Department of Biology, Northwest University, 710069 Xi'an, China)

Abstract: Six restriction endonucleases were used to analyze the mtDNA from Chinese white rabbit. There were 1, 2, 2, 2 and 6 cleavage sites in the mtDNA for EcoR V, BamH I, Pst I, EcoR I and Hind III, and no cleavage site for Sal I. The molecular weight was computed about 16.8 kb. Based on the results of single enzyme and double enzyme digestion, the restriction maps of mtDNA were constructed.

Key words: Chinese white rabbit; mtDNA; restriction endonuclease map