

野鼠肝线粒体 DNA 的分离纯化

林栖凤 李冠一 周 强*

(武汉大学)

线粒体是真核细胞内重要的细胞器。线粒体 DNA (简称 mtDNA) 是一种细胞核外的基因组。1962 年纳斯 (Nass) 夫妇在鸡肝线粒体中发现了纤维状 DNA。1964 年勒克 (Luck) 等首次从红色面包霉中提取了 mtDNA。在此后的 20 年里, mtDNA 结构与功能的研究日益为人瞩目。人^[6]、鼠^[8]、牛^[7]的 mtDNA 的全碱基序列分析, 以及基因组的细微结构, 遗传信息表达机制等方面的研究已取得了迅速进展。目前国内对 mtDNA 的研究也日益重视, 开展了一些工作^[1]。

研究线粒体基因组结构与功能的必要前提是制备线粒体 DNA。本文报道一种分离纯化鼠肝 mtDNA 的快速、简便方法。

材料与方 法

(一) 材料 武昌野鼠 (Wuchang Wildly Rat Black)。

(二) 线粒体的分离纯化 参考文献 4, 9, 10。取数只已饥饿 24 小时(减少肝糖元)的成年鼠, 杀死, 迅速取出肝脏, 于冷的 A 溶液 (0.25 mol/L 蔗糖) 中充分洗除血污, 剔除脂肪和结缔组织, 剪碎。称取肝脏 50 克, 加 350 毫升冷的 A 溶液, 置匀浆器中, 2,000 rpm (转/分) 匀浆 5 分钟, 多层纱布过滤, 滤液经 2,500rpm 离心 15 分钟(4℃, 以下离心均在 4℃ 进行), 重复两次以除去细胞核和未破碎的细胞。取上清液 8,000 rpm 离心 20 分钟, 此时沉淀分为三层, 上层疏松, 中层和下层较致密, 分别为肉色和黑红色。倾去上清和上层疏松物。加入适量 A 液, 用玻棒轻轻搅动, 使中层沉淀悬浮, 收集于另

一只离心管中, 15,000 rpm 离心 15 分钟, 得沉淀湿重约 3 克。将沉淀悬于 4.5 毫升 B 溶液 (0.25mol/L 蔗糖, 0.05 mol/L MgSO₄, 0.01mol/L Tris-HCl, pH 6.5) 中, 加入脱氧核糖核酸酶 I (DNaseI) 使终浓度为 50 微克/毫升, 37℃ 水浴保温 30 分钟, 迅速冷却至 0℃, 加入两倍体积的 C 液 (0.1mol/L Na₂EDTA, 0.15 mol/L NaCl, 0.01mol/L Tris-HCl, pH 8.0), 15,000rpm 离心 15 分钟。收集沉淀, 加入 C 液重复离心一次, 即可除去粘附在线粒体表面的核 DNA, 制得纯净的线粒体。在实验过程中采用镜检方法对上述各步骤的制品进行检测。其作法是:

1. 取匀浆液一滴于载玻片上, 显微镜下观察细胞破碎情况。

2. 取 8,000rpm 离心所得各沉淀的悬液一滴, 置玻片上, 分别加一滴神绿 B (Janus Green B), 37℃ 保温 30 分钟, 然后镜检以确认线粒体层。

3. 在玻片的一侧置 15,000 rpm 离心所得沉淀的悬液和神绿 B 各一滴, 37℃ 保温 30 分钟; 在另一侧置悬液和 Wright 染料各一滴, 保温约 20 秒, 镜检观测不同颜色和大小颗粒的比例。

4. 取纯净的线粒体制得切片于电镜下观察

(三) mtDNA 的分离纯化 参考文献 4, 9, 10。将制得的线粒体沉淀悬浮于 10 毫升 C 液中, 加 0.8 毫升 10% SDS, 65℃ 保温 10 分钟, 悬液变为浅黄褐色半透明状, 迅速冷却至

* 现在杭州大学生物系。

0—4℃,加等体积用 1mol/L Tris 饱和的酚,充分振荡 15 分钟,4,000 rpm 离心 10 分钟。取水相重复抽提一次,然后再用氯仿—异戊醇(24:1, V/V) 抽提,至两相界面无变性蛋白为止。取上清液,加入 1M 醋酸钠使终浓度约为 0.2mol/L,加入两倍体积冷的无水乙醇,—10℃ 放置过夜,18,000 rpm 离心 30 分钟,将沉淀溶于 0.5 毫升 0.1×SSC (0.015mol/L NaCl,0.0015 mol/L 柠檬酸钠),加入固体 NaCl,使其终浓度为 2mol/L,—10℃ 放置 4 小时以上,12,000 rpm 离心 10 分钟。于上清液中加入核糖核酸酶 (RNase),使终浓度为 50 微克/毫升,置 37℃ 保温 30 分钟,冷却至 0℃,用饱和酚抽提两次,将上清液对 0.1×SSC 透析 12 小时,即得纯净 mtDNA 制品。

(四) 琼脂糖凝胶电泳 用 0.7% 琼脂糖制胶(内含溴化乙锭约 0.5 微克/毫升),水平凝胶板为 12×10×0.4 厘米。样品内含溴酚蓝 0.02%,甘油 10%。电泳缓冲液为 40 毫克 mol/L Tris,20 毫克 mol/L NaAc,1 毫克 mol/L EDTA,pH8.0,电压 100 伏,室温下泳动 2—3 小时,紫外灯下观察并拍照。

结果与讨论

(一) 线粒体的分离纯化 为了制得较纯净的线粒体,采用在温和条件下破坏细胞,反复多次离心除去细胞核和未破碎的细胞,并用 DNase 除去线粒体表面沾污的细胞核 DNA。同时还采用光学显微镜跟踪检测细胞破碎情况和不同阶段的线粒体制品纯度。

神绿 B 是一种对线粒体特异的活性染料,能与线粒体中的酶反应使线粒体呈绿色。而 Wright 试剂则是一种使细胞核呈紫红色的染料。若采用两种染料分别进行显微观察,并统计线粒体和核数目,即可大致判断线粒体的纯度。在所制得的线粒体中,观察到的细胞核仅占千分之几,结合线粒体的得率(50 克肝得线粒体 3 克)考虑,说明纯化的效果良好。

电镜观察线粒体的形态、大小(5 微米左右)与文献[11]基本相符。

(二) 线粒体 DNA 的纯化 为了了解 mtDNA 分离纯化的效果,制定出合理的实验方案,我们采用电泳进行检测。在 2mol/L NaCl 处理之前的电泳分析表明,样品中存在着大分子量 RNA,距 mtDNA 很近。用 2mol/L NaCl 处理后, RNA 谱带减弱并明显远离 mtDNA,表明 2mol/L NaCl 能有效地除去大分子 RNA。经过 RNase 处理后, RNA 基本消除,表明 RNase 能进一步除去 mtDNA 中残余的小分子 RNA。本法经过一系列纯化处理制得的 mtDNA 基本纯净。

(三) mtDNA 的分子形态 高等动物细胞的 mtDNA 分子都具有环状结构。在 mtDNA 制品中除闭环分子和开环分子外,还含有带 D-环的分子和直线型分子^[2,3,5]。在我们制备的武昌鼠肝 mtDNA 的琼脂糖凝胶电泳图谱上,也同样观察到四条带,按照它们的电泳迁移率由大到小,分别为闭环超螺旋分子,带有 D-环的分子,直线型分子和开环型分子。这些不同形态的分子是怎样引起的呢,现在一般认为大部分开环分子和线型分子是在制备过程中,由于分子的偶尔断裂所引起的^[3,5],但是 mtDNA 在复制过程中,必定会形成开环分子,所以开环 mtDNA 和线状 mtDNA 是否全部是制备过程引起的,尚不能肯定^[5],有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 赵邦悌等 1983 北京鸭肝脏线粒体 DNA 的制备及性质 北京大学学报(自然科学版) 1: 72。
- [2] 北京大学生物系遗传教研室 1983 核外基因组——线粒体 DNA 的制备 遗传学实验,方法和技术 113。
- [3] Г. Г. 高泽著 赵邦悌译 1982 线粒体 DNA 4—5。
- [4] 田頭勇作等 1975 ミトコンドリア DNA の調製核酸の化学 I (日本生化学会編) 82—88。
- [5] 米川博通等 1983 ミトコンドリア DNA とマウスの進化 遺伝 1: 29。
- [6] Anderson, S. et al. 1981 Sequence and organization of the human mitochondrial genome, *Nature* 290: 457。
- [7] Anderson, S. et al. 1982 Complete sequence of bovin mitochondrial DNA conserved features of the mammalian mitochondrial genome, *J. Mol Biol.* 156: 683。
- [8] Bibb, M. J. et al. 1981 Sequence and gene organization of mouse mitochondrial. *Cell*, 26:167。

- [9] Borst, P. et al. 1967 Preparation and properties of mitochondrial DNA from chick liver, *Biochim Biophys. Acta.* **140**: 149.
- [10] Robertis, E. De. 1965 The cytoplasmic vacuolar system and microsomes, *Cell Biology (4th Edition)*, 143.
- [11] Walter, C. et al. 1965 The isolation and some properties of rat liver mitochondrial deoxyribonucleic acid, *Proc. Natl. Acad. sci. USA.* **54**:1650.