

[文章编号] 1000-2782(1999)04-0023-05

德国骑乘马线粒体 DNA 的限制性酶分析

陈 宏¹, Leibenguth F², 邱 怀¹

(1. 西北农业大学动物科学与动物医学学院, 陕西杨陵 712100)

(2. 萨尔大学遗传系, 德国萨尔布吕肯 D-66041)

[摘 要] 通过 5 种限制性内切酶获得了 13 匹德国骑乘马线粒体 DNA(mtDNA) 的切割图谱。结果发现, 限制性消化产生了 1(*Eco*RI), 3(*Bgl*II), 4(*Bam*HI) 或 5 个(*Hind*III 和 *Bam*HI) 限制性片段, 并确定了所有片段的分子大小。mtDNA 总的大小平均为 (16.48 ± 0.10) kb。除 *Bam*HI 外, mtDNA 的限制性切点对于所有的个体是完全一致的。用 *Bam*HI 检测到 mtDNA 的多态性, 通过带谱分析推断, 德国骑乘马的 B 型 mtDNA 是由 A 型 mtDNA 通过突变产生 1 个新的切割位点进化而来。

[关键词] mtDNA; 切割图谱; 限制性内切酶; 多态性; 马

[中图分类号] S821.2; S821.91 **[文献标识码]** A

高等动物的线粒体 DNA(mtDNA) 是一个约 16.5 kb 的封闭式环形分子。因为 mtDNA 的结构简单, 世代间没有重组, 并表现母性单性遗传和迅速的核苷酸替代率^[1], 所以 mtDNA 作为母性起源的遗传标记, 已成为研究动物种间或种内群体间亲缘关系的一个理想工具。在家畜 mtDNA 的研究中, 发现一些畜种 mtDNA 的多态性, 并已用于种间及品种间起源进化关系的分析^[2~10]。在马上, 关于 mtDNA 的限制性分析亦有报道^[11~14], 并发现在 11 种限制性内切酶上具有多态性。本文将描述德国骑乘马的另一种 mtDNA 多态性。

1 材料和方法

1.1 材料

试验动物 13 匹德国骑乘马的新鲜脾脏样品来自于德国萨尔布吕肯 (Saarbrücken) 屠宰场, 并立即速冻于 -80℃。

化学试剂 所用的 5 种限制性内切酶 (*Hind*III, *Bgl*II, *Eco*RV, *Eco*RI 和 *Bam*HI) 购于 United States Biochemical (Bad Homburg, 德国) 和 Pharmacia (Freiburg, 德国), 未变性的无水乙醇和其他化学试剂都是高纯度的商业制剂。

[收稿日期] 1999-03-16

[基金项目] 德国萨尔州自然科学基金资助项目

[作者简介] 陈 宏 (1955-), 男, 教授, 博士

1.2 方 法

mtDNA 的分离 mtDNA 的分离按 Tamura 等^[15]描述的方法并略有修改。约 1 g 脾脏组织完全匀浆于 5 倍体积的 $0.25 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖, $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA 和 $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液中。将匀浆液在 300 g , 4°C 离心 90 s , 获得线粒体。线粒体沉淀物再悬浮于 $400 \mu\text{L}$ 的 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl, $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 和 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA (pH 8.0) 溶液中, 然后加入 $800 \mu\text{L}$ 的 $0.18 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 和 $1 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ SDS 溶液并混匀, 在冰上放置 5 min 后, 加入 $600 \mu\text{L}$ 的醋酸钾溶液 ($6 \text{ mL } 5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸钾, 1.15 mL 冰醋酸, 2.85 mL 无离子水)。在冰上再潜伏 5 min 后, 这个混合物在 $11\,750 \text{ g}$, 4°C 离心 5 min , 然后通过苯酚和氯仿提除蛋白质, 用 2 倍体积未变性纯酒精从水相中沉淀出 mtDNA。经离心干燥后, 溶解在 TE 缓冲液中, 4°C 冰箱放置 $1 \sim 2 \text{ d}$ 。

限制性酶消化与电泳 mtDNA 用限制性内切酶在 37°C 温浴中 $4 \sim 8 \text{ h}$ 完全消化, 用未变性无水乙醇沉淀, 经离心干燥, 再溶解于 TE 缓冲液中。通过酶消化的 mtDNA 用 $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的琼脂凝胶在 TBE 缓冲液中, 以 $2 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$ 电泳 $8 \sim 10 \text{ h}$, 为了片断的荧光染色, 在凝胶中加入荧光染料 (bisbenzimidazole), 使终浓度为 $1.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

分析方法 电泳后, 凝胶在紫外光上检查、拍照。mtDNA 限制性片断的分子大小, 通过与标准限制性片断的相对移动距离的比较, 利用计算机程序“Fragment”确定。用 *Hind*III 消化的 λ -DNA 被用作分子大小的标准。

2 结果与分析

通过限制性内切酶分析, 检查了 13 匹德国骑乘马的 mtDNA 切割图谱。4 种限制性内切酶 *Hind*III, *Bgl*III, *Eco*RI 和 *Eco*RV 对于所有被测个体产生了重复、一致的切割图谱 (图 1)。然而, 对于 *Bam*HI 出现了多态性, *Bam*HI 的限制性图谱展示了 2 种不同类型的 mtDNA 分子, 被称作 A 型和 B 型 (图 1)。

*Bam*HI 的消化物产生了 2 个不同的切割图谱 (图 1), 在 A 型 mtDNA 中, 可观察到 4 个片断, 其分子大小分别为 9.78 , 3.18 , 1.92 和 1.57 kb 。在 B 型 mtDNA 中, 也出现 4 个片断, 但其之和仅为 14.54 kb 。2 种类型的 mtDNA 的差异仅出现在最大片断的分子大小上, 在

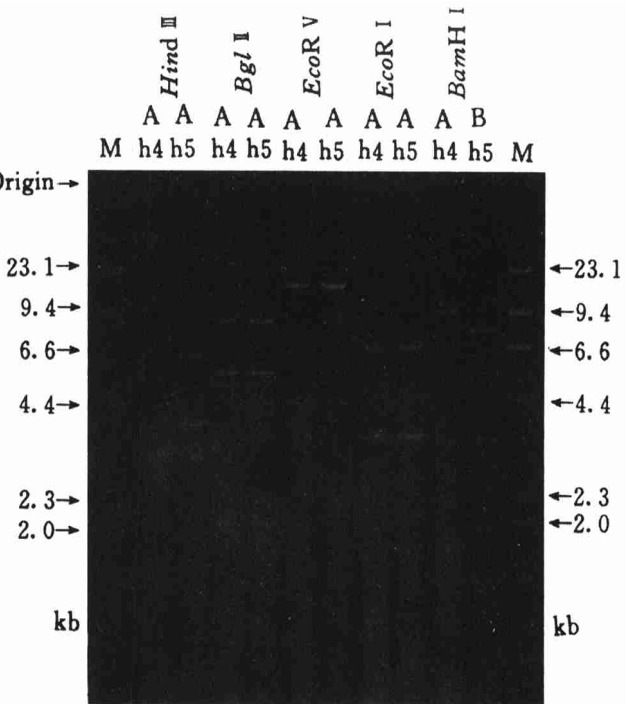


图 1 德国骑乘马 mtDNA 的 5 种限制性酶的切割图谱
M. λ -DNA/*Hind*III 片断标准; h4. 个体 4; h5. 个体 5

A型中为 9. 78 kb,在 B型中为 7. 85 kb.因为在 B型 mtDN A中,1. 93 kb片断表现了 1 个较宽的荧光带,所以,可以推测,用 *Bam* HⅠ 切割的这类 mtDN A产生了 5个而不是 4 个片断,即它们的分子大小分别为 7. 85,3. 18, 1. 93, 1. 93和 1. 57 kb.

德国骑乘马 mtDN A的 *Eco* RⅢ 消化物在凝胶上显示了 3条带,它们的大小分别为 6. 72,3. 35和 1. 50 kb,其总数仅为 11. 57 kb.因高等动物 mtDN A的大小约为 16. 5 kb,因此,可推测德国骑乘马 mtDN A对于 *Eco* RⅢ 有 5个切点而不是 3个切点.在这 3条带中,其中 2个各含有 2个相同大小的带,所以,5个片断的大小分别是 6. 72,3. 35,3. 35, 1. 50和 1. 50 kb,其和为 16. 42 kb.这种现象在牛^[2]、猪^[8]、山羊^[10]上也已被发现,通过 5种限制酶共揭示出 23个片断,每 1种酶所产生片断的数目和分子大小见表 1. mtDN A分子总的大小平均为 (16. 48± 0. 10) kb.

表 1 5种限制性酶的切点数和片断大小

限制性酶	mtDN A类型	个体数 /个	切割位点数 /个	片断分子大小 /kb	总的大小 /kb
<i>Hind</i> Ⅲ	A	13	5	6. 32, 3. 76, 3. 05, 1. 68, 1. 54	16. 35
<i>Bgl</i> Ⅱ	A	13	3	9. 10, 5. 35, 2. 15	16. 60
<i>Eco</i> RⅢ	A	13	5	6. 72, 3. 35, 3. 35, 1. 50, 1. 50	16. 42
<i>Eco</i> RV	A	13	1	16. 60	16. 60
<i>Bam</i> HⅠ	A	12	4	9. 78, 3. 18, 1. 93, 1. 57	16. 46
<i>Bam</i> HⅠ	B	1	5	7. 85, 3. 18, 1. 93, 1. 93, 1. 57	16. 46
					16. 48± 0. 10

因为小的片断通常在照片上不能很清楚地被识别,按试验结果,附带给出 1个德国骑乘马 mtDN A所有切割图谱的模式图(图 2).

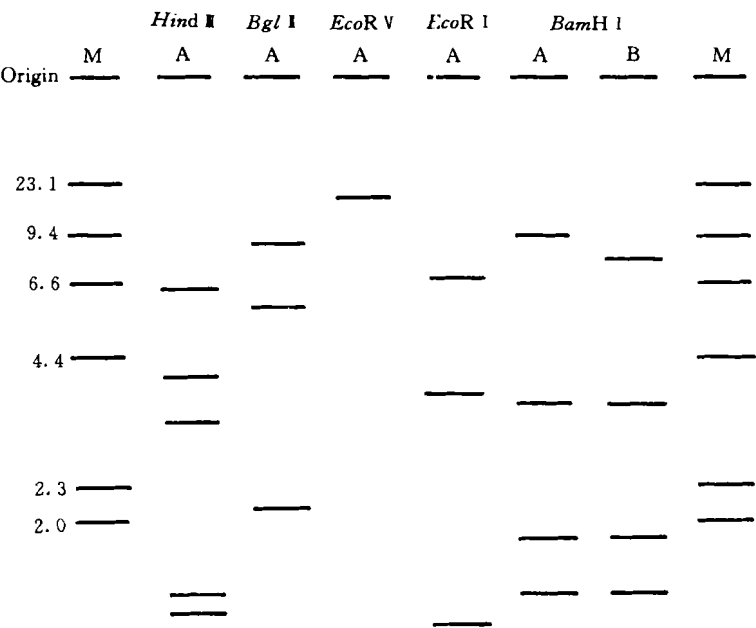


图 2 德国骑乘马 mtDN A的 5种限制性酶切割图谱模式图

3 讨 论

本研究中,通过 *Bam* H I 分析,揭示了在德国骑乘马中存在着 2 种不同类型的 mtDNA,其中所检测到的 B 型 mtDNA 是首次发现的。在所分析的 13 个个体中,其中 12 个个体表现了 A 型 mtDNA,而仅 1 个个体出现了 B 型 mtDNA,而且 2 种限制性切割图谱又那么相近,所以可推断,B 型 mtDNA 是从 A 型 mtDNA 通过突变,在 9.78 kb 片段内产生 1 个新的切割位点派生而来。

George 等^[13]用 16 种限制性酶分析了几个马属 (*Equus*) 动物的 mtDNA,发现蒙古野马 (*Equus przewalskii*) 和 4 个家马品种 (*Equus caballus*) 的 mtDNA 仅在 *Hinc* II, *Kpn* I, *Acc* I 和 *Bst* E I 的消化物上存在多态性。本研究结果表明,德国骑乘马 mtDNA 的 *Hind* III, *Bgl* II 和 *Bam* H I (A 型) 切割图谱与蒙古野马、阿拉伯马、秘鲁马 (Peruvian Paso)、Quarter 马和摩根马基本一致。但德国骑乘马 *Eco* R I 的切割图谱不同于蒙古野马和其他 4 个家马品种。后者 mtDNA 的 *Eco* R I 切割图谱表现了 6 个大小不同的片段。因此,德国骑乘马不仅对 *Bam* H I 表现了多态性,而且对 *Eco* R I 也表现了另一种新的分子类型。

Wang 等^[14]用 16 种限制性酶分析了中国云南一个较小区域 6 个家马品种的 mtDNA,结果表明,这个群体表现了高度的 mtDNA 遗传多样性。所有 6 个家马品种具有 1 个特殊的 mtDNA 基因型并带有多个母性起源的图谱。16 种限制性酶中的 6 个 (*Bam* H I, *Kpn* I, *Kpn* I, *Sac* I, *Stu* I 和 *Xba* I) 出现多态性。德国骑乘马 mtDNA 的限制性图谱与这 6 个中国云南家马品种的限制性图谱对于 *Hind* III, *Eco* R V 和 *Bam* H I (A 型) 一致,但对于 *Bgl* II 和 *Eco* R I 则不同,中国马对于 *Bgl* II 表现了 2 条带 (9.8 和 6.7 kb),而德国骑乘马则表现了 3 条带,对于 *Eco* R I 的切割位点数在中国马为 6,而在德国骑乘马为 5。

[参考文献]

- [1] Upholt W B, Dawid I B. Mapping of mitochondrial DNA of individual sheep and goats: Rapid evolution in the D-loop region[J]. Cell, 1977, 11: 571~ 583.
- [2] Watanabe T, Hayashi Y, Semba R, et al. Bovine mitochondrial DNA polymorphism in restriction endonuclease cleavage patterns and the location of the polymorphic sites[J]. Biochem Genet, 1985, 23: 947~ 957.
- [3] Watanabe T, Hayashi Y, Ogasawara N, et al. Polymorphism of mitochondrial DNA in pigs based on restriction endonuclease cleavage patterns[J]. Biochem Genet, 1985, 23: 105~ 113.
- [4] Watanabe T, Hayashi Y, Kimura J, et al. Hg mitochondrial DNA: polymorphism, restriction map orientation, and sequence data[J]. Biochem Genet, 1986, 24: 385~ 396.
- [5] Watanabe T, Masangkay J S, Wakana S, et al. Mitochondrial DNA polymorphism in native Philippine cattle based on restriction endonuclease cleavage patterns[J]. Biochem Genet, 1989, 27: 431~ 438.
- [6] Bhat P P, Mishra B P, Bhat P N. Polymorphism of mitochondrial DNA (mtDNA) in cattle and buffaloes[J]. Biochem Genet, 1990, 28: 311~ 318.
- [7] Lan H, Xiong X, Lin S, et al. Mitochondrial DNA polymorphism of cattle (*Bos taurus*) and Mithun (*Bos frontalis*) in Yunnan province[J]. Acta Genetica Sinica, 1993, 20: 411~ 425.
- [8] Lan H, Shi L. The origin and genetic differentiation of native breeds of pigs in southwest China: an approach from mitochondrial DNA polymorphism[J]. Biochem Genet, 1993, 31: 51~ 60.

- [9] Chen H, Leibenguth F. Restriction patterns of mitochondrial DN A in European wild boar and German Landrace [J]. *Comp Biochem Physiol*, 1995, 110B (4): 725~ 728.
- [10] Chen H, Leibenguth F. Restriction endonuclease analysis of mitochondrial DN A of three farm animal species cattle, sheep and goat [J]. *Comp Biochem Physiol*, 1995, 111B 643~ 649.
- [11] Hutchison C A III, Newbold J E, Potter S S, et al. Maternal inheritance of mammalian mitochondrial DNA [J]. *Nature*, 1974, 251: 536~ 538.
- [12] Potter S S, Nowbold J E, Hutchinson C A III, et al. Specific cleavage analysis of mitochondrial DN A [J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1975, 72 4496~ 4500.
- [13] George J M, Ryder O A. Mitochondrial DN A evolution in the Genus *Equus* [J]. *Mol Biol Evol*, 1986, 3 535~ 546.
- [14] Wang W, Liu A H, Lin H, et al. Multiple genotypes of mitochondrial DN A within a horse population from a small region in Yunnan province of China [J]. *Biochem Genet*, 1994, 32 371~ 378.
- [15] Tamura K, Aotsuka T. Rapid isolation method of animal mitochondrial DN A by the alkaline lysis procedure [J]. *Biochem Genet*, 1988, 26 815~ 819.

Restriction Endonuclease Analysis of Mitochondrial DN A of German Saddle-Horse

CHEN Hong¹ F Leibenguth² QUI Huai¹

(1. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Northwest
Agricultural University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

(2. Department of Genetics, Saarland University, Saarbrücken, FRG D-66041, German)

Abstract 13 German saddle-horses cleavage patterns of mtDN A from 5 restriction endonucleases (*Bam* H^I, *Hind* III, *Eco* R^I, *Eco* R V and *Bgl* II) were obtained. The restriction digests yielded one (*Eco* R V), 3 (*Bgl* II), 4 (*Bam* H^I) or 5 (*Hind* III and *Bam* H^I) fragments and all fragment sizes were given. The mean total size of mtDN A was calculated to be (16.48±0.10) kilobases. The restriction cleavage sites of mtDN A for all individuals except *Bam* H^I were completely identical. A polymorphism of mtDN A was detected with *Bam* H^I. The kind of polymorphism let us assume that B-type mtDN A of this horse had evolved from the A-type mtDN A by acquiring an additional cleavage site.

Key words mtDN A; cleavage pattern; restriction endonuclease; polymorphism; horse