DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.04.038

文章编号:1000-5404(2000)04-0391-02

技术方法

一种简单快速制备动物线粒体DNA的方法

A simple and rapid method for the preparation the mtDNA

戴纪刚[1],吴宇格[2],魏 泓[1],肖颖彬[3] ([1]第三军医大学实验动物中心,重庆 400038;[2]重庆北碚天府医院,重庆 400704;[3]第三军医大学附属新桥医院心血管外科,重庆 400037)

提 要:目的 探索通过核质分离的方法制备mtDNA。方法 利用Triton X-100等非离子型去污剂能溶解除核被膜以外的所有细胞膜的特点,通过适当离心,分离细胞核/细胞质来获取mtDNA。结果 所得mtDNA样品纯度产率较高,且无核DNA污染。结论 此方法简单快速,方法重复性好,值得推广应用。

高等动物线粒体DNA(Mitochondrial DNA, mtDNA)是一共价闭合的环状双链DNA分子,且有分子量小、结构简单、进化速度快、母性遗传、无组织特异性等特点。这些特点使得mtDNA成为目前研究动物起源进化及群体遗传分化的理想研究对象,而mtDNA的制备是进行这些研究的前提条件。关于mtDNA的提取方法,国内外已有较多报道。但这些方法存在所需细胞量大、实验设备及试剂昂贵、操作程序复杂等缺点。为此,我们建立了一种通过核质分离制备mtDNA的新方法。

1 材料和方法

1.1 取材

BALB/C、C57BL/6L、T739、615小鼠各1只。分别取其肝脏、心脏、脾脏及肌肉组织,立即使用或置于-20℃温水箱中保存备用。BALB/C等小鼠由第三军医大学实验动物中心提供。

1.2 试剂及溶液

琼脂糖系Serra产品,多聚酶链反应(PCR)试剂盒系德国宝灵曼公司产品。其它生化试剂系国产分析纯。

Triton溶解液:含50 mmol/L KCl,15 mmol/L Tris-HCl,pH 8.3,2.5 mmol/L $MgCl_2$,1% V/V Triton X-100。

RTE液:含10 mmol/L Tris-HCL,1 mmol/L EDTANa_2,20 μg/ml无DNA酶的RNA酶A,pH 8.0。

1.3 mtDNA的提取及纯化

取黄豆大小新鲜或冷冻的鼠肝脏、脾脏或肌肉组织。在铝箔中,用手术刀片将其仔细挑碎,然后使之悬浮在5 ml的Triton溶解液中。温和振荡片刻后,室温下放置10 min。反应完毕的溶液以8 000×g离心1 min,上清液即为mtDNA。小心取上清,加入半体积Tris饱和酚(pH<7.50),温和振荡10 min,再加入原上清半体积的氯仿/异丙醇(24/1),温和振荡5 min,以10 000×g离心10 min,轻取上层水相,加入2倍体积无水乙醇或等体积异丙醇混匀后冰浴30 min,以15 000×g离心10 min,用70%乙醇(0℃)洗沉淀,15 000×g离心2 min,彻底去上清,空气中自然干燥纯化的mtDNA,加入适量双蒸水或RTE溶解,-20℃保存。

1.4 总DNA的提取

按常规酶解法提取总DNA[1]。其中含有mtDNA和核DNA。取0.5 μg总DNA作PCR模板。

1.5 mtDNA样品的鉴定

1.5.1 紫外分光光度法测定 mtDNA样品经适当稀释,用UV-754型紫外分光光度计测定。

1.5.2 琼脂糖凝胶电泳 用0.8%琼脂糖制胶,含溴化乙锭0.5 μg/ml mtDNA样品与适量6倍上样缓冲液混合后点样,以3 U/cm恒压电泳2~3 h,紫外灯下观察并拍照。

1.5.3 PCR检测 分别以总DNA和mtDNA样品为模板,扩增定位于mtDNA和核DNA上的两个目的基因片段。mtDNA D环特异引物P1:5'-ATAAACATTACTCTGGTCTTGTAAACC-3',P2:5'-ATTAATTTAAAGGCCAGGACCAAACCT-3',预期扩增产物为1100bp。核DNA脂蛋白脂酶基因特异引物,P3:5'-ACAGAGAAACCCTGTCTCGG-3',P4:5'-GTATATCCCTTGAC-TCTTTC-3',预期扩增产物为534 bp。引物由中国科学院上海生物工程研究中心合成。PCR反应各成分及循环参数按PCR core kit说明书进行。产物鉴定同步骤"1.5.2"。

2 结果

2.1 mtDNA的紫外吸收光谱分析

测得mtDNA样品的光吸收最高峰在260 nm处,最低点在230 nm处,呈现出典型的核酸紫外吸收光谱曲线。所有标本所提取的mtDNA样品,其吸光度A_{260}/A_{280}值为1.79~1.90,A_{230}/A_{260}值为0.37~0.49。

2.2 mtDNA的琼脂糖凝胶电泳分析

结果可见16.3 kb左右的mtDNA条带,见图1。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39600079,39900173)、全军"九五"医药卫生科研基金资助项目(96M083)、重庆市攻关项目

作者简介:戴纪刚(1972-),男,湖南省娄底市人,硕士,医师,主要从事肿瘤遗传学方面的研究,现在附属新桥医院胸外科工作。电话:(023)67660997

收稿日期:1999-04-09;修回日期:1999-10-12

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



图 **1**　**mtDNA** 的琼脂糖凝胶电泳结果
1、2、3、4 分别为鼠肝脏、脾脏、心脏、肌肉组织细胞 mtDNA(各 1 例)；5 为人 DNA/Hind Ⅲ标记

2.3　PCR 产物分析

细胞总 DNA 样品既可扩增出 mtDNA D 环的 1 100 bp 片段，也可扩增出定位于核 DNA 上的脂蛋白脂酶基因 534 bp 片段。而本实验所获得的 mtDNA 样品，只能扩增出 mtDNA D 环的 1 100 bp 片段，见图 2。



图 **2**　**PCR** 产物分析结果
1 为 mtDNA 样品，引物 P1-P2；2 为总 DNA 样品，引物 P3-P4；3 为 mtDNA 样品，引物 P1-P2 加 P3-P4；4 为总 DNA 样品，引物 P1-P2 和 P3-P4；5 为 DNA Marker

3　讨论

本方法是利用非离子型去污剂 TritonX-100 能溶解除核被膜以外的所有细胞膜的特点[2]，通过适当离心，分离细胞核/细胞质，来获取 mtDNA。其主要优点是不需要分离细胞的总 DNA，也不需要分离和纯化细胞线粒体，而从完整细胞直接分离 mtDNA。方法简单快速，对实验设备和试剂要求不高，一般实验室均可应用。mtDNA 样品紫外吸收光谱分析结果表明，所得核酸样品纯度产率较高，方法重复性好。PCR 方法检测结果证实所得样品为 mtDNA，且该样品中无核 DNA 污染。由此可见，本方法制备 mtDNA 完全可以满足常规分子生物学和分子遗传学研究工作的需要，因此，值得推广应用。

关键词：mtDNA；制备方法
中图法分类号：　R394.3　文献标识码：B

参考文献：

[1]　金冬雁，黎孟枫 译．分子克隆实验指南[M]．第 2 版．北京：科学技术出版社，1992. 464－466.
[2]　Hymer W C，Kuff　E L. Isolation of nuclei from mammalian tissues through the use of Triton X-100[J]. J Histo Chem Cytochem，1994，312(12)：359－360.

（编辑　汪勤俭）

技术方法

文章编号：1000-5404(2000)04-0392-03

HPLC 法测定红豆杉皮粗提物中紫杉醇的含量

Determination of taxol in the crude extract of taxus bark by HPLC

刘松青，高振同，代　青，张春华　（第三军医大学附属西南医院药剂科，重庆　**400038**）

提　要：目的　建立测定红豆杉皮粗提物中紫杉醇含量的 HPLC 法。方法　以 C_{18} 柱为固定相，以甲醇-乙腈-水-四氢呋喃(体积比为 15∶40∶40∶5)为流动相，检测波长 254 nm，柱温(30±1)℃，流速 1.2 ml/min，以峰高外标法定量。结果　标准曲线：$C=0.1098+0.002613R$，$r=0.9996$，样品中紫杉醇含量为 12.61%，加样回收率 102.1%，日内精密度 RSD＜2%($n=7$)。结论　本法操作简便，灵敏度高，专属性强。

作者简介：刘松青(1964－)，男，湖南省安乡县人，博士，主任药师，主要从事医院药学方面的研究，发表论文 20 余篇。电话：(023) 68754225

收稿日期：1999-03-20；修回日期：1999-08-13

紫杉醇（Taxol）是继阿霉素后最热点的新抗癌药，它主要从红豆杉属植物的茎皮中提取分离获得。紫杉醇对晚期卵巢癌，转移性乳腺癌和非细胞性肺癌等多种癌症有显著疗效。目前国内外紫杉醇的供药主要依

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net