

马粪海胆卵母细胞线粒体 DNA 和 RNAs 的分离*

于富才 马丽

(中国科学院海洋研究所, 青岛 266071)

提要 于1982年12月—1984年5月,以青岛汇泉湾习见的马粪海胆为材料,运用0.5 mol/L KCl 或0.5 mol/L LiCl 诱导法得到其卵母细胞;差速离心技术提取其线粒体;SDS 萃取得到线粒体核酸;再以羟基磷灰石柱层析分离出线粒体核酸各组分。结果表明,从所得各种分离产物测不出任何蛋白质。所以,应用上述各种方法和技术,能够有效地分离出海胆卵母细胞线粒体中的 DNA, rRNA, tRNA 和多核苷酸。

关键词 马粪海胆 卵母细胞 线粒体 差速离心 羟基磷灰石柱层析 核酸

线粒体是卵子发生早期出现并储存于卵细胞中的细胞器。在正常的卵子形成过程中,伴随着线粒体 DNA 和 RNA 的逐渐积累 (Anderson, 1986) 线粒体也形成。卵母细胞线粒体含有环型结构的 DNA 和特殊的 RNA, 线粒体 DNA 的合成(复制)具有独立于核 DNA 合成的调节机理,并不与细胞周期中的某一时期相联系。卵母细胞线粒体的 rRNA 和 tRNA, 在基本结构特点上不同于细胞质的。因此,对于具有特殊结构和功能的线粒体 DNA 和 RNA 进行深入地研究,必定会丰富核酸的化学知识。本文报告马粪海胆卵母细胞的收集处理,线粒体的萃取及 DNAs 和 RNAs 的分离方法。

1 材料与方法

于1982年12月—1984年5月,在青岛汇泉湾潮下带采集马粪海胆 (*Hemicentrotus pulcherrimus*)。

1.1 卵母细胞的收集和处理 用新鲜过滤海水洗去马粪海胆体表的异物,按作者以前用的方法 (Yu-Fucai, 1985), 将动物置于含有 0.5 mol/L KCl 或 0.5 mol/L LiCl 溶液的烧杯上,使生殖孔浸泡于溶液中,在 K^+ 或 Li^+ 诱导下,动物排卵于烧杯中;待卵母细胞充分沉积于容器底部,倾去上层液,用无菌海水悬浮洗涤 3 次,然后移入离心管内,在 4°C 下以 3000r/min 转速离心 5min; 弃去上清液,细胞混悬于 0.25 mol/L 蔗糖溶液中,重复离心处理。沉积物称重,保存于 5°C 冰箱中。

1.2 线粒体的萃取 (Borst et al., 1972) 把已得到的卵母细胞悬浮于 8 倍体积的冰冷的 0.4 mol/L TE 蔗糖缓冲液 (Tris-HCl, 0.01 mol/L; EDTA, 0.001 mol/L, pH = 7.6) 中,用玻璃匀浆器匀浆 10 次。将匀浆液中的蔗糖浓度调至 1 mol/L。在 50ml 离心管中,

* 中国科学院海洋研究所调查研究报告第 1873 号,自选课题。

收稿日期: 1993 年 7 月 16 日,接受日期: 1993 年 9 月 30 日。

将 20ml 匀浆液铺在等体积的 1.5mol/L 蔗糖+1mmol/L EDTA 液上,在 5℃ 下以 40 000 r/min 转速离心 30min,浓稠的细胞颗粒积聚在离心管底部,线粒体移至 1.0—1.5mol/L 蔗糖界面处,而卵黄颗粒漂在梯度液的顶部。用吸管吸取线粒体部分,并用同样的缓冲液洗涤一次,最后悬浮于 KTE 缓冲液(KCl, 0.5mol/L; Tris-HCl, 0.01mol/L; EDTA, 0.001mol/L, pH = 7.6)中,于 5℃ 下以 15 000r/min 转速离心 20min。线粒体沉积于管底部,吸去上清液后再重复上述处理步骤,即获得纯净的马粪海胆卵母细胞线粒体。

1.3 线粒体 DNA 和 RNAs 的抽提 将线粒体沉积物移入 200ml 容积的玻璃烧杯中,外套以金属保护套,中间添加冰块。向杯中加入 100ml 抽提液(SDS, 0.5%; EDTA, 0.1%; 皂土, 12.5 μg/ml),以 10 000r/min 速度搅动 3min,再加入 90% 饱和酚(内含 0.1% 8-羟基喹啉)100ml,快速搅动 3min;然后在 0℃ 下以 8 000r/min 转速离心 20min,将上清液加 NaCl 使之成为 2% 浓度,再加 2.5 倍体积的无水乙醇,于 -20℃ 下放置过夜(1)。向沉淀物加入 30ml 缓冲液(NaCl, 0.5mol/L; Tris-HCl, 0.1mol/L; EDTA, 0.01mol/L, pH = 8.0),于 0℃ 下放置 24h(2)。将(1)和(2)离心后的沉淀合并,溶于 50ml 缓冲溶液(配比: Tris, 0.01mol/L; NaCl, 0.1mol/L; MgCl₂, 0.001mol/L; CaCl₂, 0.0001mol/L, pH = 7.4)中,再加蛋白酶 K 50mg/ml,于 37℃ 温育 1h,以等体积的重蒸水配的饱和酚振荡 15min,以 12 000r/min 转速离心 20min;取出的水相以氯仿-异戊醇 4 次抽提去蛋白;得到的上清液,加入 3 倍体积的 95% 冷乙醇,冰箱放置过夜。离心后的沉淀物溶于 10m mol/L 磷酸钠缓冲液内,经紫外吸收测定后,作进一步分离纯化。

1.4 羟基磷灰石柱层析

1.4.1 羟基磷灰石的处理 商品羟基磷灰石(HAP)在用之前,要经过浮选处理,除去微小颗粒。一般作法是,称取一定量的产品,放在一个适当容量的烧杯内,加入 10 倍体积(V/W)重蒸水浸泡 2h;然后用玻璃棒轻轻搅动,使其泛起,待大颗粒沉积后,倾去含有微细颗粒的上层液,继之加入同样体积的 10mmol/L 磷酸钠缓冲液(pH = 6.8),反复漂洗多次;最后用 1m mol/L 磷酸钠洗一次,并于 5℃ 冰箱内保存备用。

1.4.2 样品的制备 在制取的线粒体 DNA 和 RNA 混合液(本文“1.3”节)中,加 2.5 倍体积的 95% 冷乙醇,于 -20℃ 下放置 5h;离心后用滤纸吸去离心管壁附着的液滴,加入少量 1m mol/L 磷酸钾缓冲液(pH = 6.8),使核酸沉淀物溶解,并以紫外分光光度计测光吸收,求出 A₂₆₀ 吸收单位总数。

1.4.3 装柱 取 φ1cm × 25cm 的具砂芯滤板玻璃层析柱,先注入 0.5mol/L 磷酸钾缓冲液(pH = 6.8),然后慢慢加入羟基磷灰石悬浮液,同时开启出口夹,使缓冲液慢慢流出,并将柱连接在 BF-核酸蛋白检测仪上,先以 0.5mol/L 磷酸钾缓冲液洗涤至仪器基线,再换用 0.001mol/L 磷酸钾缓冲液(pH = 6.8)洗至基线后,便可上样。

1.4.4 样品的加入 用微量进样器,取 10A₂₆₀ (一个 A₂₆₀ 单位约等于 50 μg 核酸)卵母细胞线粒体核酸溶液(含线粒体 DNA 和 RNAs 的混合物),沿层析柱壁轻轻注入羟基磷灰石柱床顶部。当样品全部进入层析床后,即开始用洗脱液洗脱。

1.4.5 洗脱 依次用 0.0001, 0.01, 0.05, 0.07, 0.1, 0.15, 0.25, 0.5mol/L 磷酸钾缓冲液(pH = 6.8)进行洗脱,流速为 0.5ml/min,用核酸蛋白检测仪监测各洗脱峰。收集管置于冰浴中,分别收集各种浓度磷酸钾缓冲液的洗脱峰,记下体积,用 751G 分光光度

测定各管洗脱液中的 DNA 和 RNAs 等的含量。

1.4.6 产物的鉴定 用已知纯度的环状 DNA (BDH 公司产品), rRNA (Sigma 公司产品)和 tRNA (上海东风生化试剂厂产品),作出标准羟基磷灰石柱层析分离图谱,同待测样品的分离结果比较。用 Follin-酚法 (Lowry et al., 1951) 测定蛋白质,以牛血清白蛋白作标准。用台黑酚-FeCl₃ 法 (Schjeide, 1969) 测定 RNA,以酵母 RNA 作标准。用二苯胺法 (Burton, 1956) 测定 DNA,以小牛胸腺 DNA 作标准。

2 结果

2.1 卵母细胞的纯度 用 K⁺ 或 Li⁺ 离子诱导法排放的卵母细胞,细胞的分化程度大致相同,彼此大小相差不大,通过反复洗涤,杂质几乎全除去。在显微镜下观察,所得的卵母细胞全部呈圆形(图版 I)。在视野中见不到细胞碎片和结缔组织等块状物。在随意测定的 20 个卵细胞中,平均直径在 65 μm,最小的不足 50 μm,最大的为 90 μm。当将其加入精子时,观察不到受精现象,说明这些卵子并未成熟,尚不具备受精能力。

2.2 卵母细胞线粒体核酸含量的变化 从 1 月中旬到 3 月中旬,先后取得了发育早期、中期和后期 3 批不同发育时期的卵母细胞。对这些卵母细胞中分离出的线粒体核酸含量的测定结果(表 1)表明,不同时期取得的卵母细胞,其核酸的含量是不同的。早期的卵母细胞,每克可抽提出线粒体核酸 677 μg;而发育后期的卵母细胞,每克只能得到 230 μg;中期的卵母细胞则介于两者之间。但无论何时取得的卵母细胞,其单位线粒体中的核酸含量大致相同,即每克线粒体核酸的含量平均 1 600 μg 左右。

表 1 马粪海胆在不同发育时期卵母细胞线粒体核酸的含量变化

Tab. 1 The change of the content of the nucleic acids from oocyte mitochondria at different development stages of *Hemicentrotus pulcherrimus*

时 期	卵母细胞 (g)	线粒体 (g)	核酸含量 (μg)	每克卵母细胞核酸含量 (μg)	每克线粒体核酸含量 (μg)
早	5	1.06	3 385	677	1 717
中	3.75	0.85	1 975	529	1 693
晚	6.85	0.75	1 176	230	1 568

2.3 卵母细胞线粒体核酸的羟基磷灰石柱层析分离结果 20A₂₆₀ 核酸样品,经不同浓度的磷酸钾缓冲液分步洗脱,检测出 4 个较大的洗脱峰(图 1)。每个峰代表不同类型的核酸分子。峰与峰之间界限清楚,说明产物的纯度相当高。由 0.25mol/L 磷酸钾缓冲液洗下的是线粒体 DNA,其含量为 126 μg,峰形尖细,左右基本对称,经生化分析,既不含 RNAs,也测不出蛋白质的存在。用 0.15mol/L 磷酸钾缓冲液洗下的是一个含线粒体 rRNA 的大吸收峰,其含量为 3276 μg。用 0.1mol/L 磷酸钾缓冲液洗下的是含 tRNA 的较小吸收峰,tRNA 的含量为线粒体 rRNA 的 1/10。用 0.001mol/L 磷酸钾缓冲液最先洗下一个较大吸收峰,其产物为多核苷酸。用 0.5mol/L 磷酸钾缓冲液洗脱下来的产物,很少;洗脱液却很多,图上未能扫描出来,约有 2.5A₂₆₀ 单位;A₂₃₀/A₂₆₀ ≈ 1.28—1.50 不等,经生化分析其蛋白含量 < 3%,最大吸收峰在 260nm 处。从生化分析和吸收特性看,该产物既非蛋白质,也非核酸,而同核蛋白吸收相似。另外,用 0.01,0.05 和 0.07mol/L 磷酸钾缓冲液分别洗出几个小的洗脱峰,由于其内含物太少,未进一步研究。

从不同发育时期马粪海胆卵母细胞线粒体中各种类型的核酸的含量(表 2) 看出, 不同时期取得的样品, 其线粒体中 DNA 的含量有所不同。在早期获取的线粒体, 从 $19A_{260}$ 总核酸中分离出 $126\mu\text{g}$ DNA, 平均每 A_{260} 单位含有 $6.6\mu\text{g}$ DNA; 晚期提取的 $21A_{260}$ 核酸中, 只分离出 $104\mu\text{g}$ DNA, 每个 A_{260} 只得到 $4.9\mu\text{g}$ DNA; 中期线粒体核酸中 DNA 含量则居中。至于卵母细胞线粒体中 rRNA 和 tRNA 各组分含量的变化趋势同 DNA 基本相似。对所得的核酸各组分进行紫外吸收的测定结果表明, A_{230}/A_{260} 的比值分别为: DNA = $0.48-0.5$, rRNA = $0.49-0.51$, tRNA = $0.50-0.52$, 杂质为 $0.41-0.44$; A_{260}/A_{280} 的比值为 DNA = $1.96-1.98$, rRNA = $2.08-2.17$, tRNA = $2.00-2.17$, 杂质是 $1.28-1.50$ 。这些结果表明, 各主要核酸组分的纯度是相当高的。

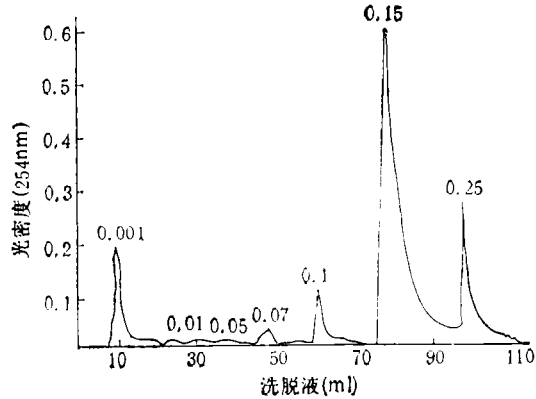


图 1 马粪海胆卵母细胞线粒体核酸
羟基磷灰石柱层分离

Fig. 1 Separation of the nucleic acids from
oocyte mitochondria of *Hemicentrotus
pulcherrimus* by HAP

表 2 马粪海胆卵母细胞线粒体核酸 HAP 分离纯化结果

Tab. 2 The result of isolation and purification of the nucleic acid from
oocyte mitochondria of *Hemicentrotus pulcherrimus* by HAP

时 期	上样量 (A_{260})	DNA(μg)	rRNA(μg)	tRNA(μg)	杂质 (μg)
早	19	126(6.6)	1 400	106	67
中	17	93(5.4)	1 060	76	80
晚	21	104(4.9)	1 170	107	131

3 讨论与结论

3.1 K^+ 诱导出的卵母细胞质量优于酶消化法 (Guidice et al., 1972) 破壳取出的马粪海胆卵巢, 蛋白水解酶将卵巢膜和细胞膜消化, 从而使卵母细胞彼此分离。由于马粪海胆卵母细胞的发育是不同步的, 其卵子成熟的时间不一致, 所以这样分离的卵母细胞包括各个发育时期的, 大小不均一, 彼此相差颇大, 破碎的细胞、卵巢块和结缔组织碎片很难完全除去; 而 K^+ 等碱金属离子诱导排出的是一些接近成熟的卵母细胞, 所以不但大小均匀, 而且也很少杂质。

3.2 处于不同发育时期的卵母细胞其线粒体含量也不同 在卵母细胞形成过程中, 在不同的生长发育时期所取得的卵母细胞, 其线粒体含量也是不相同的。在早期的卵母细胞中, 每克卵母细胞能萃取 677mg 线粒体, 在接近成熟的卵母细胞中, 每克只能得到 230mg 线粒体。这说明随着卵母细胞细胞质的增多, 整个细胞的体积和重量也随着增加, 但线粒体的相对含量却呈逐渐下降趋势。

3.3 不同发育期的线粒体总核酸含量大致相同,但其各组分的含量却有所变化。不管从早期卵母细胞中分离的线粒体,还是从中、后期分离的线粒体,由其获取的总核酸量大致相等,但总核酸中各组分的含量却有所不同。就线粒体 DNA 而言,从早期卵母细胞线粒体中萃取的总核酸中,每 50 μg 样品经羟基磷灰石柱层析分离可得到 6.6 μg DNA,后期为 4.9 μg ,中期则为 5.4 μg 。线粒体 rRNA 和 tRNA 大体也如此 (Gross et al., 1956b)。因此卵子发生早期是一个生物合成旺盛时期。

3.4 羟基磷灰石柱层析可将线粒体核酸各组分完全分离。从羟基磷灰石柱层析分离图谱可以看出,马粪海胆线粒体总核酸,上羟基磷灰石柱后,经不同浓度的磷酸缓冲溶液梯度洗脱,可将线粒体 DNA, rRNA, tRNA 和多核苷酸完全分开,而且这些产物经物理化学测定证明几乎不含任何杂质。因此,羟基磷灰石柱层析是分离纯化线粒体核酸的有效方法。

参 考 文 献

- Anderson, E., 1968, Oocyte differentiation in the sea urchin, *Arbacia punctulata*, with particular reference to the origin of cortical granules and their participation in the cortical reaction, *J. Cell Biol.*, **37**: 514—539.
- Borst, P. et al., 1972, Mitochondrial nucleic acids, *Ann. Rev. Biochem.*, **41**: 333.
- Burton, K., 1956, A study of the condition for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid, *Biochem. J.*, **63**: 315.
- Gross, P. et al., 1956b, Synthesis of RNA during oogenesis in the sea urchin, *J. Mol. Biol.*, **13**: 463.
- Guidice, G. et al., 1972, Studies on sea urchin oocytes I. Purification and cell fractionation, *Exp. Cell Res.*, **72**: 90—94.
- Lowry, O. H. et al., 1951, Protein measurement with the Follins phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**: 265.
- Schjeide, O. A., 1969, Micro-estimation of RNA by the cuprician catalyzed orcinol reaction, *Anal. Biochem.*, **27**: 473.
- Yu Fucai, 1985, Isolation of DNA from sea urchin sperm nuclei by hydroxyapatite chromatography, *Acta Oceanol. Sini.*, **4**(2): 304—312.

THE ISOLATION OF MITOCHONDRIAL DNA AND RNAs FROM SEA URCHIN *HEMICENTROTUS* *PULCHERRIMUS* OOCYTES*

Yu Fucai, Ma Li

(*Institute of Oceanology, Academia Sinica, Qingdao 266071*)

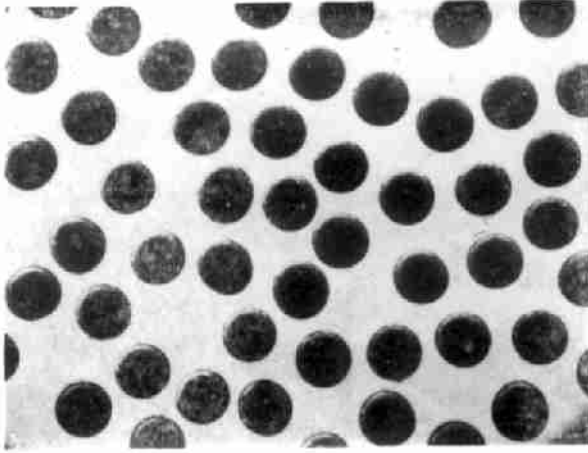
ABSTRACT

The common sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus* from the Qingdao coastal sea was used in the experiment carried out during 1982—1984. Oocytes were obtained by using 0.5 mol/L KCl or LiCl stimulation. Oocyte mitochondria was isolated from oocytes with differential centrifugal technique and the nucleic acid was extracted with sodium dodecyl sulfate from mitochondria, and then DNA and RNAs were separated when phosphate buffer of different concentrations were used to elute nucleic acid of mitochondria on the chromatographic column of hydroxyapatite.

Many oocytes were ovulated from sea urchins when they were stimulated with K^+ or Li^+ while placed aboral surface down on a beaker of 0.5 mol/L KCl or 0.5 mol/L LiCl solution. The oocytes isolated in this way did not contain the cytoplasmic lags and adherent clumps of cytoplasm. The total nucleic acid was 3 385 μg per gram of oocyte mitochondria in early development oocyte. The fraction eluted with 0.25 mol/L phosphate buffer corresponds to mitochondrial DNA, rRNA with 0.15 mol/L phosphate buffer and eluted peak of tRNA appeared in 0.1 mol/L as a single peak before rRNA. Ultraviolet spectral analysis revealed that DNA UV absorption in ratio of A_{260}/A_{280} was between 1.96—1.98, 2.08—2.17 for rRNA, 2.00—2.17 for tRNA and 0.48—0.50 for DNA, 0.49—0.51 for rRNA, 0.50—0.52 for tRNA in A_{230}/A_{260} . The biochemical analysis showed that these products were free of proteins. The above findings indicated that the procedures are useful for the separation of DNA and various RAN.

Key words *Hemicentrotus pulcherrimus* Oocyte Mitochondria
Differential centrifugation Hydroxyapatite chromatography column Nucleic acids

* Contribution No. 1873 from the Institute of Oceanology, Academia Sinica.



K⁺ 或 Li⁺ 诱导排出的卵母细胞

**Shedding oocytes of stimulation by K⁺ or Li⁺ immersion from
*Hemicentrotus pulcherrimus***