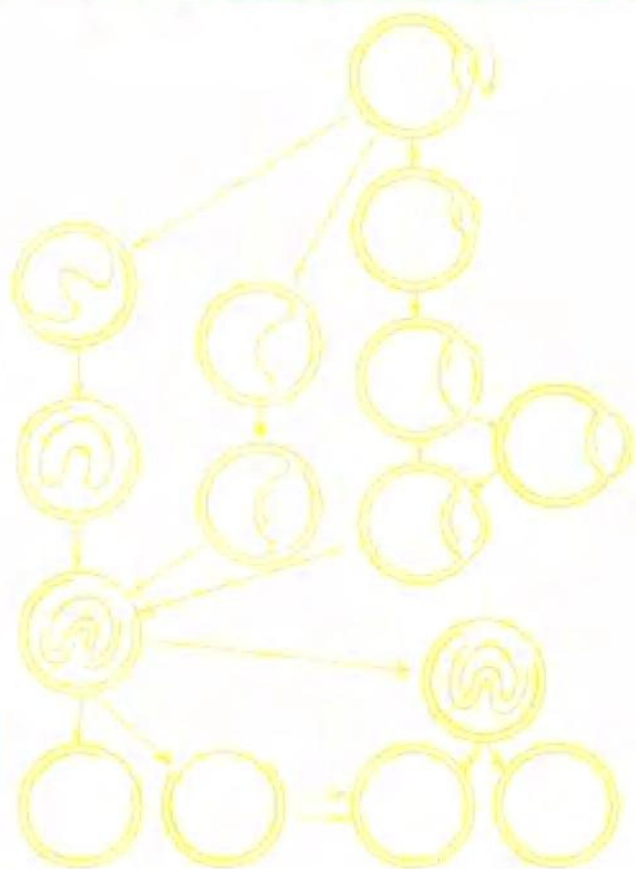


线粒体DNA

〔苏〕Г. Г. 高泽著



科学出版社

内 容 简 介

本书对动物、植物及单细胞真核生物线粒体 DNA 的结构、复制、表达及其调控进行了系统的论述。此外,对酵母 ρ^- 突变种线粒体 DNA 以及线粒体 DNA 与质粒 DNA 的重组体在大肠杆菌中的表达等问题也作了适当的讨论。全书共分四部分,有插图 114 幅,引用文献资料 606 篇。

本书可供从事普通生物学、分子生物学、细胞生物学、分子遗传学、农学、医学等的工作者及生物、农林医等大专院校的教师、研究生和高年级学生参考。

Г. Г. Гаузе

МИТОХОНДРИАЛЬНАЯ ДНК

Издательство «Наука», Москва, 1977

线粒体 DNA

〔苏〕Г. Г. 高泽 著

赵邦佛译

责任编辑 吴铁双

科学出版社出版

北京朝阳门内大街137号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1982年11月第一版 开本:787×1092 1/32

1982年11月第一次印刷 印张:11 1/4

印数:0001—5,500 字数:254,000

统一书号:13031·2050

本社书号:2803·13—10

定价: 1.75 元

译 者 的 话

自从1963—1964年发现线粒体DNA (mtDNA) 以来, 对 mtDNA 的结构、功能等方面进行了大量的研究。最近英国 Sanger, F. 实验室已成功地将人 mtDNA 的核苷酸排列顺序基本上测定完毕, 并发现线粒体基因组密码子的编码性质与核基因组有所不同, 从而引起了人们极大的注意。

mtDNA 之所以引起人们广泛的兴趣决不是偶然的: 1) 线粒体具有独立复制的能力, 它有其自己独特的 DNA、rRNA、tRNA、核糖体, 但是实现线粒体基因组复制与表达所需的许多酶(如 DNA 聚合酶、RNA 聚合酶, DNA 连接酶等) 又是由核基因组编码的。线粒体基因组与核基因组在遗传信息表达上的相互关系是很重要的问题。2) 对 mtDNA 的深入研究, 肯定会对线粒体起源问题提供有价值的线索, 而线粒体起源问题与细胞起源及生物进化有密切关系。3) 线粒体具有重要生物功能, 它是细胞的动力站, 生物氧化链上某些重要的酶的一部分亚基是由线粒体基因组编码的。此外, 植物的雄性不育, 真核细胞的抗药性也都可能与 mtDNA 有关。线粒体的某些功能也可能至今未被了解。4) 由于 mtDNA 是真核细胞中分子量较小而又较易纯化的复制单位, 所以它是研究 DNA 结构与 DNA 复制、转录等功能的良好模型。

总之, 由于线粒体是每一个真核细胞都有的重要细胞器, 所以对 mtDNA 的研究必然涉及整个分子生物学、分子遗传学、细胞学、医学、农学等生命科学的基本领域及与此有关的应用科学领域。

尽管世界上已有不少有关 mtDNA 的综述,但是专门论述 mtDNA 分子生物学方面的专著至今还仅此一本。本书作者长期从事 mtDNA 复制及其调控方面的研究。本书系统总结了各种类型的生物 mtDNA 的结构特点,讨论了病理状态(如肿瘤细胞等)下 mtDNA 的结构特点;用较多篇幅讨论了 mtDNA 的复制和表达(转录、转译及其调控),对酵母 ρ^- 突变种 mtDNA 及 mtDNA 与细菌质粒构成的嵌合体中的 mtDNA 的结构及表达也进行了适当的讨论。收集了大量文献。所以本书可作为分子生物学、分子遗传学、细胞生物学、医学、农学等领域内从事科研工作及教学工作的人员参考。

本书译稿承上海复旦大学袁厚积同志在百忙中抽空仔细校阅,在此表示谢意。

由于译者水平所限,译文中可能有错误或不妥之处,请读者予以指正。

1980.11.15.

前 言

在世界文献中已有几本讨论细胞质中细胞器的遗传与生物发生的书,从1963—1966年发现线粒体DNA后就对这些问题产生了兴趣。

但是直到今天,不论是在国内或国外,都还没有一本完全是论述线粒体DNA的生物化学与分子生物学的专著。而对这一问题的大量研究工作使得出版这样一本书是恰当的,也是适时的。

线粒体遗传问题的解决是与对线粒体DNA的分子结构及线粒体DNA表达的分子机理的研究直接有关的。线粒体的基因组不大,它的大小和信息容量与小的病毒和噬菌体的基因组相似。但是线粒体基因组具有很高的专一性,具有细胞中其它遗传结构所不具有的独特的一些基因。

从这个观点来说,制作线粒体基因组图谱及建立线粒体基因组的分子无性系是有重大意义的。这是线粒体遗传研究中的一个新的重要研究方向。

目前,摆在研究工作者面前的进一步研究线粒体基因组行为的分子基础的任务是:线粒体DNA的传递、重组、分离、复制及转录的机理。

下面这个问题也是很有意义的:在线粒体生物发生中起控制作用的数目众多的基因带为什么并以何种方式在细胞质中被保留(对内共生学说而言)或建立(按线粒体的附加体前体学说)进化的。

这些问题的解决以及新的概念和方法的建立只有根据已

• • •

有的资料才能实现,向读者推荐的这本书就给我们提供了这些资料。同时作者以自己的研究工作使线粒体 DNA 的某些科学领域得到了充实。

苏联医学科学院通讯院士

C. Ф. 涅伊法赫

目 录

译者的话.....	iii
前言.....	v
绪论.....	1
第一部分 线粒体 DNA 的结构.....	4
1. 后生动物的线粒体 DNA	4
1.1 形状和大小	4
1.2 核苷酸组成	10
1.3 互补链中核苷酸组成的不对称现象	14
1.4 线粒体 DNA 中的核糖核苷酸	17
1.5 线粒体 DNA 的一级结构 图谱	21
1.6 线粒体 DNA 的大分子性质 同质异晶型	30
1.7 线粒体 DNA 的寡聚体	46
1.8 当细胞受到某些影响时线粒体 DNA 的结构	55
1.9 肿瘤细胞线粒体 DNA 的结构	60
1.10 线粒体与细胞中线粒体 DNA 的含量 在原位上的线粒体 DNA	64
2. 高等植物的线粒体 DNA	66
3. 低等真核生物的线粒体 DNA	70
3.1 真菌的线粒体 DNA	70
3.2 原生动物的线粒体 DNA	87
3.3 单细胞藻类的线粒体 DNA	95
4. 线粒体 DNA 核苷酸序列的进化	100
5. 细胞中线粒体 DNA 只存在于线粒体	109
第二部分 线粒体 DNA 的合成	114

6. 线粒体 DNA 的复制: 从细胞角度的讨论	114
7. 线粒体 DNA 复制的机理: 复制中间物	132
8. 在离体线粒体中及在通透细胞中线粒体 DNA 的 复制.....	153
9. 用抗菌素研究离体线粒体中线粒体 DNA 生物 合成的机理.....	174
10. 胚胎发生过程中线粒体 DNA 的合成	198
11. 线粒体 DNA 的修复与重组.....	215
12. 线粒体 DNA 合成的酶学.....	232
第三部分 线粒体 DNA 的表达	245
13. 线粒体基因组编码的 RNA: 结构成分.....	245
13.1 线粒体的核糖体 RNA	245
13.2 线粒体的转移 RNA	253
13.3 线粒体的信使 RNA	262
14. 线粒体基因组编码的 RNA: 生物合成	268
14.1 整体细胞中 RNA 的生物合成.....	268
14.2 离体线粒体中 RNA 的生物合成.....	277
14.3 RNA 合成酶及离体 mtDNA 的转录	282
15. 线粒体基因组的多肽产物	291
第四部分 异常线粒体 DNA.....	302
16. 酵母 ρ^- -突变种线粒体 DNA 的结构与表达.....	302
17. 嵌合体分子中线粒体 DNA 的结构与表达.....	323
总结.....	329
书中所用缩写符号.....	334
参考文献.....	335

绪 论

线粒体本身的遗传物质——线粒体 DNA (mtDNA) 的发现在细胞信息结构的研究方面揭开了新的一页。

对 mtDNA 的研究始于结构分析, 现在 mtDNA 结构的基本原则已经不是什么不解之谜了。这些研究作为提出并解决许多新问题奠定了基础。这些问题包括 mtDNA 信息的结构、mtDNA 在细胞整个信息结构中的地位与作用、mtDNA 中含有的信息与核基因组信息的整合等问题。

mtDNA 的信息容量并不大, 它的编码可能性要比 DNA 小几万倍到几十万倍。那么, mtDNA 究竟有何遗传功能呢?

对细胞来说在进化的哪些阶段获得并进一步保留细胞器的独立的遗传系统是有好处的呢? 一般说细胞器 DNA, 特别是 mtDNA 的哪些信息特性与此有关呢? 为了保证 mtDNA 及线粒体遗传系统的功能, 需要几十种由细胞核基因组编码的酶参加。这些酶在线粒体外细胞质的多核糖体上合成以后被输送到线粒体中行使其功能的位置上。这些酶是线粒体核酸聚合酶, 包括 DNA 聚合酶和 RNA 聚合酶、氨酰 tRNA 合成酶、蛋白质合成因子, 还包括线粒体核糖体的蛋白质。根据目前的估计, 合成这些蛋白质所必需的核基因组的数量大大超过了存在于 mtDNA 本身中的基因数量。建立在这种反常情况基础上的是什么样的逻辑呢? 在 mtDNA 上的这些不多的基因独特性是什么, 是否正是由于这个独特性才使这些不多的基因局限于单个基因带 (генофора) 上呢?

mtDNA 的功能——复制与转录是通过何种方式与线粒体外的大分子合成过程相联系与协调的呢？为了保证线粒体的生物发生必须要有 mtDNA 与编码线粒体蛋白质成分的核基因的协同工作。

对这些问题以及对其它有关线粒体遗传系统信息结构的许多问题都还没有满意的回答。或许，进一步深入地分析线粒体遗传系统的信息结构和功能机理是解决这些问题的途径之一。这种具体的结构分析方法也是大多数目前正在进行的线粒体分子生物学方面的研究工作的基础。

同时还应当指出，线粒体遗传系统是有意义的，并且从多方面来说都是十分合适的研究对象，特别是 mtDNA，按照 Borst 的合理的见解，是研究真核细胞核酸与蛋白质合成的一般问题的非常合适的模型系统 (Borst, 1970)。这个模型系统的诱人之处在于它比较简单，有可能应用已有的分子生物学的许多手段与方法进行分析。

在这本书中试图分析有关 mtDNA 结构与功能方面的资料，以及我们自己最近几年在苏联科学院发育生物学研究所获得的有关 mtDNA 复制的研究结果。

写这本书时，在选择题目与讨论问题时反映了作者本人的科学兴趣。我对线粒体的兴趣主要在真核细胞中在结构上自主的独立于核复制子的 DNA 的合成与调节方面。所以，对 mtDNA 的生物合成问题给予较为详细的阐述，其它的并非意义较小，而是离我的科学兴趣较远的问题，如线粒体基因组编码的蛋白质产物的问题只作了较为扼要的讨论。但是应当指出，对 mtDNA DNA 的结构及线粒体的遗传系统等问题不论是苏联或外国的作者都作了大量的综述 (Комер, Хансон, 1974; Одинцова, 1976; Borst, Kroon, 1969; Rabinowitz, Swift, 1970; Borst, 1972; Nass, 1974, 1976; Schatz,

Mason, 1974; Neubert 等, 1975)。

这些问题也曾在 1970 年及 1975 年列宁格勒举行的由该领域内以自己的研究工作而闻名的 С. А. Нейфах 教授发起的有关细胞质中细胞器的遗传功能的专题讨论会上作过讨论。

对于 И. Б. Збарский 给予本书的经常关心, 苏联科学院生物化学研究所的 Е. А. Пинус 及 Я. М. Рабинович 为本书提出的许多宝贵意见和有益的讨论, 以及 С. М. Долгиевич 协助编写工作, 作者谨致谢忱。

第一部分 线粒体 DNA 的结构

1. 后生动物的线粒体 DNA

1.1 形状和大小

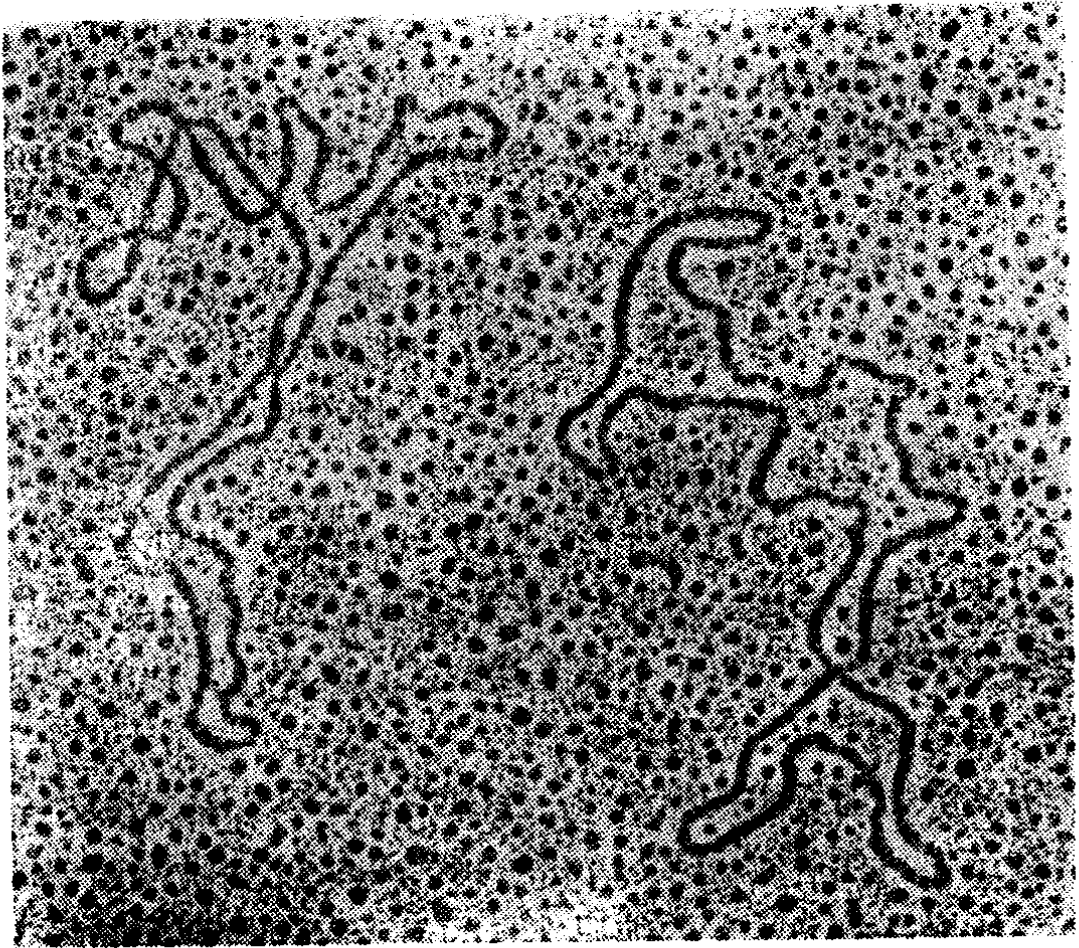
通常,在研究一类新的对象时,其第一步是搜集样品,对它进行编目和描述,而且首先是描述其形态。

mtDNA 的形态学已用电子显微镜及沉降分析法加以研究。始于 1965—1966 年的电镜研究证明:高等动物细胞的 mtDNA 分子都具有环形结构 (Borst, Ruttenberg, 1966; Kroon 等, 1966; Nass, 1966; Van Bruggen 等, 1966; Borst 等, 1967a; Dawid, Wolstenholme, 1967; Borst, Kroon, 1969; Rabinowitz, Swift, 1970; Borst, 1972; Nass, 1974; Neubert 等, 1975)。现以泥鳅 (*Misgurnus fossilis*) mtDNA 为例说明动物 mtDNA 的环形结构 (图 1)。

在 mtDNA 制品中,除了环形分子外,还有线形分子 (Borst 等, 1976b)。这些线形分子的发生是由于在制备 mtDNA 的过程中环的偶尔断裂而形成的呢,还是由于线形 mtDNA 本来就存在于线粒体中的呢?目前流行的观点认为制品中的线形 mtDNA 分子是在制备过程中分子的偶尔断裂所引起的。用渗透压休克法分离的线粒体制品中,线形的线粒体 DNA 的含量经用电镜证明并不多 (Nass, 1969a)。线形分子不是 mtDNA 分子复制过程的中间产物 (Roberson 等, 1972)。从这些资料可以得出关于多细胞动物

mtDNA 结构的第一个原则：后生动物的 mtDNA 具有环形结构。

后生动物 mtDNA 有多大呢？回答这一问题的意义首先在于：mtDNA 的大小决定了它的信息容量的上限，也就是 mtDNA 在细胞遗传中能作出的最大贡献。



图·1 泥鳅卵细胞 mtDNA 环形分子的电镜照片
(Гаузе, Михайлов, 1974)。这些分子的外形长度
为 5.4 微米,相当于 16,000 碱基对。

在已研究过的 mtDNA 制品中常常存在着几类环形分子：单体环和寡聚体型或连环，后者是从单体环衍生而来的。多细胞动物 mtDNA 的单体环形分子所具有的外形长度(周长)约 5 微米。这一点可看成是后生动物 mtDNA 结

构的第二个原则:大小恒定的原则¹⁾,也就是信息容量一定的原则。mtDNA 以微米表示的外形长度很容易换算成以道尔顿数或以千碱基对 (kbp) 数表示的分子大小。为了换算成以道尔顿表示的 DNA 的分子量,应将外形长度乘上直线密度,直线密度以每微米外形长度的道尔顿数表示(道尔顿/外形长度微米)。根据不同的测定,B 型 DNA 的直线密度从 1.92×10^6 道尔顿/1微米 (Sinshemier, 1959) 到 2.15×10^6 道尔顿/1微米 (Lang, 1970) 不等。

各种不同的多细胞动物 mtDNA 的分子量约为 10×10^6 道尔顿。为了把 DNA 的大小换算成 kbp,可以采用噬菌体 $\Phi X 174$ 双链复制型 DNA 的换算比例:这个 DNA 分子的分子量为 3.4×10^6 道尔顿,由 5,500 碱基对组成* (Brown, Vinograd, 1974)。所以分子量为 10×10^6 道尔顿的 mtDNA 应含有 16,000bp。

根据三联体密码的性质,认为 mtDNA 中只有一条链具有遗传上的意义。所以,线粒体基因组所能编码的多肽的总长度不会超过 5,300 个氨基酸残基。实际上,线粒体基因组的编码能力还要小得多,因为线粒体基因组相当大的一部分转录产物是不能被翻译的。rRNA、tRNA 就属于这一类转录产物,它们占据了约 1/3 的 mtDNA 的编码容量。

所以,mtDNA 的编码容量的最大极限为 $\sim 4,000$ 个氨基酸残基,相当于 40 个多肽分子(每个多肽按 100 个氨基酸残基计算)。动物细胞线粒体基因组最大的编码可能性是接近于中等大小的细菌病毒的编码能力,但比细菌细胞基因组

1) 小鼠成纤维细胞 LD 系的 mtDNA 不附合这个原则,它的 mtDNA 中 99% 以上的分子其外形长度约为 10 微米 (Kasamatsu 等, 1971)。在培养正常的小鼠成纤维细胞时这些自发产生的细胞具有二聚体 mtDNA。

* 通过测定 DNA 的核苷酸序列, $\Phi X 174$ DNA 由 5386bp 组成。——译者注

的编码能力要小几十倍，细菌可以编码数千个蛋白质。mtDNA 编码能力的局限性，说明了 mtDNA 在线粒体生物发生中的贡献是很小的 (Borst 等, 1976b)。不同类群的多细胞动物的 mtDNA 在大小上有多大的差别呢？表 1 中列举了一些被分离出的 mtDNA 外形长度 (周长)*的资料，这些资料并不是采用专门的标准化或比较的方法而得到的。各种不同的 mtDNA 之间在外形长度上的差别是相当大的，可达到 1.4 微米。这些差别在多大程度上是可信的呢？

表 1 一些多细胞动物 mtDNA 的外形长度(根据电镜资料)

mt DNA 来源	分子外形长度 (微米)	文 献
人	4.81	Borst, Kroon, 1969
绵羊	5.4	同上
小鼠	4.96—5.6	同上
雏鸡	5.1 —5.35	同上
爪蛙	5.4	同上
海胆	4.45	Piko 等, 1968
蛔虫	4.64	Tobler, Gut, 1974
刺螵属 (<i>Urechis campo</i>)	5.85	Dawid, Brown, 1970
大鼠	4.82—4.95	Wolstenholme 等, 1974
果蝇	5.3	Polan 等, 1973

为了回答这个问题需要精确地测量 mtDNA 分子的外形长度。因为当改变 DNA 电镜标本的制备条件时，特别是当改变形成蛋白质单分子层的溶液的离子强度时，所测得的 mtDNA 长度可以改变 15—20% 之多 (Wellauer 等, 1973)。

为了测定用于比较的 DNA 在外形长度上的差别的可靠性，采用了两种方法。第一种方法是应用内部标准的方法。常

* 外形长度，周长两个词可通用，原文为 контурная длина，本书多译作外形长度。——译者注

用均质的外形长度与待测的 mtDNA 的外形长度不同并在电镜下很易作出鉴定的 DNA 作为内部标准。在这样的实验中,待测 DNA 的总长度是通过与标准 DNA 的总长度相比较而确定的,这样就可以校正样品制备及电镜观察条件的任何变化 (Davis 等, 1971)。

应用 Φ X174 复制型 II DNA (Φ X174 RFII DNA) 作为内部标准, 所测得的一系列 mtDNA 的外形长度列于表 2。这些数据以 Φ X 单位表示,也就是说用被研究的 mtDNA 的外形长度与在同一个电镜标本中的 Φ X 174 RFII DNA 的外形长度之比值表示。被比较的一些 mtDNA 之间在大小上并没有发现有多大差异。

表 2 一些多细胞动物 mtDNA 的外形长度

mtDNA 来源	总长度 (Φ X单位) ¹⁾	文 献
人(HeLa 细胞)	3.08±0.06	Brown, Vinograd, 1974
绿色长尾猴 (BSC-1 细胞)	3.06±0.09	同 上
小鼠(成纤维细胞)	3.03±0.07	同 上
泥鳅(卵母细胞)	3.11±0.12	Гаузе, Михайлов, 1974
大鼠(肝)	2.98±0.13	White 等, 1975
大鼠 (Новинков 肝癌)	2.94±0.11	同 上
果蝇(卵)	3.05±0.03	Peacock等, 1973
小鼠(卵细胞)	3.04±0.14	Piko, Matsumoto, 1976

注: Φ X 单位是噬菌体 Φ X174 双链复制型 DNA 的外形长度。

1) 所列平均值±1标准误差。

但是应用混合法已证明某些 mtDNA 在大小上确有差别。这个方法是将被研究的每一种 mtDNA 的每一个分子按其长度的分布进行分析,然后将它们混合,并研究混合物中的 mtDNA 分子的外形长度分布。假如在混合样品中发现了双峰式分布 (бимодальное распределение), 就说明被比较的 mtDNA 在外形长度上确有差别。用这种试验已经证

明：母鸡的 mtDNA 比小鼠和大鼠的 mtDNA 要长一些 (Nass, 1969a) (图 2)。mtDNA 的混合试验证明了有尾两栖类和无尾两栖类 mtDNA 在外形长度上确有差别 (Wolstenholme, Dawid, 1968)。虽然混合法能确定被比较的 mtDNA 之间有无长度上的差别，但它不能给出外形长度的绝对值与分子量。因此这个方法比起内部标准法来在定量测定时似乎不太合适。应用混合法确定的多细胞动物 mtDNA 在大小上确有差别：有尾两栖类及无尾两栖类 mtDNA 之间差为 0.6—0.8 微米，哺乳类 mtDNA 之间差为 0.3—0.5 微米 (Wolstenholme, Dawid, 1968; Nass, 1969 a)。对果蝇属 (*Drosophila*) 的多种果蝇的 mtDNA 分子

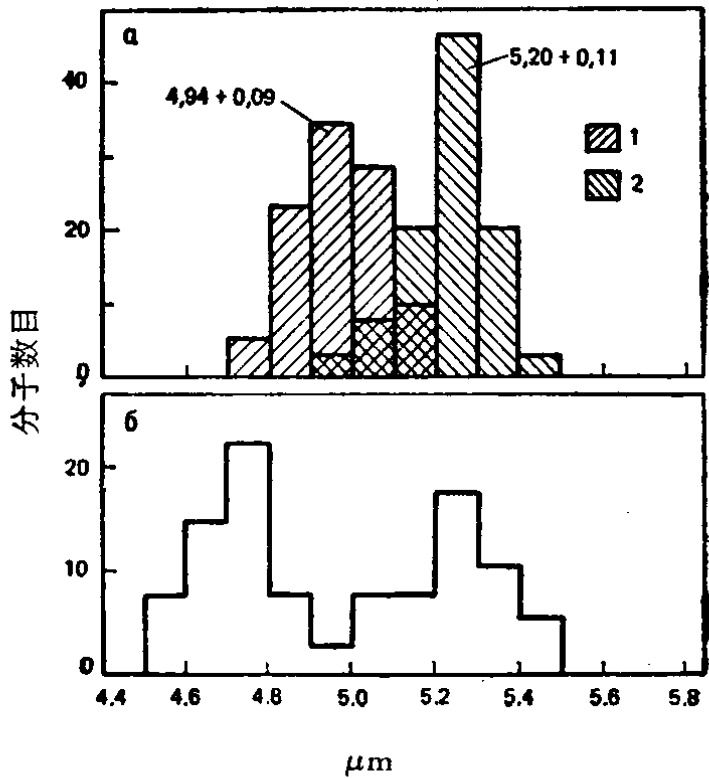


图 2 大鼠肝脏、母鸡及小鼠成纤维细胞 mtDNA 外形长度 (微米) 的分布图。

a——大鼠肝脏 mtDNA(1)和鸡 mtDNA(2)，分别测定长度，但列于同一柱式图中。

b——小鼠成纤维细胞及母鸡肝脏 mtDNA 的混合物。外形长度的双峰分布证明大小上确有差异。