

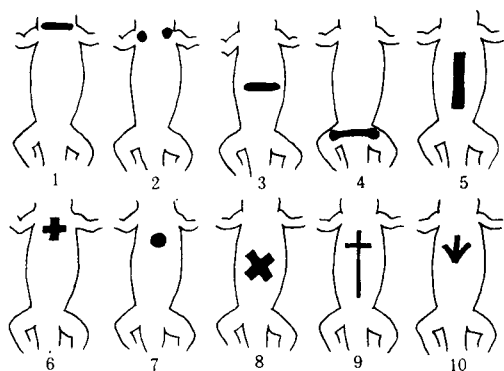


图7 蜥蜴类背部涂色数目编制

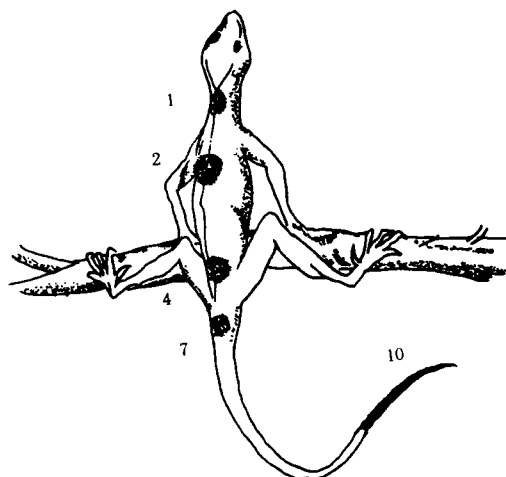


图8 蜥蜴类背部尾端涂色数目编制

**致谢** 日本大阪市自然博物馆柴田保彦先生赠送资料,衷心致谢。

### 参 考 文 献

- 1 宋鸣涛. 大鲵野外生长观察. 动物学研究, 1989, 10(1): 64—65.

- 2 宋鸣涛. 蛇类标记方法的商讨. 蛇志, 1993, 5(2): 15—17.
- 3 林昌何. 蛤蚧标记法. 动物学杂志, 1979, (1): 61—62.
- 4 John W Ferner. A Review of Marking Techniques for Amphibians and Reptiles. S. S. A. R. ( USA ) Herpetological Circular, 1979, (9): 1—27.

## 高重复序列 DNA 的分离与分析方法

王 瑛

(中国科学院动物研究所 北京 100080)

**摘要** 本文介绍了一种简便快速分离动物高重复序列 DNA 的技术, 以及与之相关的  $C_0t$  值的测定方法。

**关键词** 高重复序列 DNA  $C_0t$  值 羟基磷灰石

真核生物基因组中普遍存在重复序列, 特别是在哺乳动物中, 高重复序列 DNA 占全部基因组的 10%, 中等重复序列 DNA 占全部基因组的 20%。这些 DNA 的功能并不十分清楚。一些重复序列可能编码某些蛋白质及 RNA, 有些重复序列或许还与基因调控有密切的关系或具有转座功能。在应用分子生物学手段, 进行人类家族或个体鉴别, 以及研究动植物系统进化或分子生态学研究时, 人们都需要从所研究的生物体中获得重复序列 DNA 作为特

异探针。这些研究都要求将高、中重复序列 DNA 从基因组中分离出来。目前常用的方法是羟基磷灰石柱层析法, 其手续繁杂, 特别是在分离高重复序列 DNA (即所谓低  $C_0t$  值 DNA) 时, 要在 60℃ 恒温下进行, 层析柱需要特别设计的保温装置。我们经过多次试验, 建立了一种简便而有效的方法, 可以不用高温柱层析, 所分离的重复序列通过  $C_0t$  值计算即可

收稿日期: 1995-07-29, 修回日期: 1995-11-20

判断重复序列的类型。目前这一技术已成为本实验室的常规方法。

## 1 方法

**1.1 样品、试剂和仪器** 动物组织 DNA 按 Sambrook 等人<sup>[1]</sup>记述的方法进行提取。主要试剂为 0.12mol/L 与 0.4mol/L 磷酸钠缓冲液 (pH7.0, 简称 PB, 分析纯) 以及羟基磷灰石 (简称 HA, DNA 级, 美国 BioRad 公司)。所用仪器为 60℃ 水浴锅, 台式小离心机, 紫外分光光度计, 超声波发生器。

### 1.2 操作步骤

**1.2.1 羟基磷灰石预处理** 将一定量的 HA (按每克 HA 可吸附 60μg 双链 DNA 计算 HA 的用量) 装到小玻璃试管中, 加入 0.12mol/L PB 5ml, 用旋涡混合器将 HA 轻轻旋起, 然后放在装有沸水的烧杯中, 100℃ 煮沸 30min, 再用旋涡混合器将 HA 轻轻旋起, 然后放 60℃ 水浴锅静置 3min, 弃上层液体, 再加入 60℃ 0.12mol/L PB 5ml, 同上述旋起后放回 60℃ 水浴锅静置 3min, 弃上层液体, 加入 2ml 0.12mol/L PB, 备用。

**1.2.2 剪切 DNA 样品** 用超声波发生器处理 DNA。不同物种的 DNA 在用超声波处理时, 所用功率、振幅与时间均有所不同, 需进行数次实验摸索, 使剪切的 DNA 片段大小符合实验要求。一般为 500bp 左右为宜。为防止超声时产热, 应将 DNA 放在冰水浴中。

**1.2.3 DNA 片段大小的检测** 用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳观察, 以分子量标准做对照。如片段仍较大, 则重复剪切与检测步骤, 直至满意为止。

**1.2.4 DNA 变性** 取一定量 DNA (根据实验需要) 置 100℃ 水浴变性 7min 后立即放入冰中 5min, 然后通过短时间离心, 将管壁上的 DNA 集中于离心管底部。

**1.2.5 复性** 加 2mol/L NaCl 溶液至上述变性的 DNA 中, 使 NaCl 的终浓度为 0.18mol/L, 置 60℃ 水浴至预定时间使之复性。

### 1.2.6 高重复序列 DNA 的分离

(1) 在预定的复性时间后, 将 DNA 溶液加到 15ml 塑料离心管中, 其中装有经处理的 60℃ 预热的 HA, 在 60℃ 水浴锅中振荡 4min, 静置 3min, 再将上清液 (即单链 DNA) 吸出弃掉或留用; (2) 加入 5ml 60℃ 预热的 0.12mol/L PB, 用旋涡混合器将 HA 旋起, 置 60℃ 水浴中静置 3min, 弃去上层液体; (3) 重复步骤 (2) 二次; (4) 加入 1ml 60℃ 预热的 0.4mol/L PB, 60℃ 振荡 4min, 静置 3min, 将上层液体吸出, 收集到 1.5ml 的离心管中; (5) 重复步骤 (4) 一次; (6) 离心, 弃去 DNA 溶液中残留的 HA, 将含 DNA 的上清液转到两个新的 1.5ml 的离心管中; (7) 在紫外分光光度计 260nm 波长测光密度 ( $OD_{260}$ ), 求出复性的双链 DNA 浓度。对照用 0.4mol/L PB; (8) 计算  $C_0t$  值: 理论上已设定: 在 1s 内如有一个克分子浓度的核苷酸复性, 即为  $1C_0t$  值<sup>[2]</sup>, 核苷酸残基的分子量平均为 325 道尔顿, 则  $1C_0t = 325g/L \times 1s = 325mg/ml \times 1s = 90 \mu g/ml \times 1h$ 。因此任何复性 DNA 的  $C_0t$  值均可以从下式求得:

$C_0t = \{ \text{从 HA 树脂洗脱的双链 DNA 的浓度} (\mu g/ml) \times \text{复性时间 (h)} \} / \{ 90 \mu g/ml \times 1h \}$

(9) 用透析法或离心超滤法脱盐, 即可得到高重复序列 (低  $C_0t$  值) 的 DNA。

## 2 结果和讨论

利用上述方法, 曾分离过哺乳动物、鱼类、昆虫、真菌和细菌等真核和原核 DNA 的重复序列, 均获得满意的结果。例如将大鼠 DNA 剪切成大小为 500—1000bp 的片断。取 400μg DNA 溶于 0.18mol/L NaCl 溶液中 (浓度为 100μg/ml)。在 60℃ 复性 5min, 即可获得  $C_0t$  值为 0.01 的高重复序列 DNA。可将该重复序列克隆在质粒 pUC18 载体上, 构建成大鼠高重复序列的基因文库。从该基因文库中所选出的若干克隆, 其插入片段的 DNA 在大鼠基因组中的拷贝数都在  $10^5$  以上。从而证明此法是可行的。

有些实验需要获得中重复序列 DNA (如用作基因探针) 或低重复序列 DNA (如分子分类学上所用的 DNA 杂交法), 这可从 HA 非吸附组分得到起始材料, 然后依上述方法调整复性时间直至获得所需的  $C_0t$  值。DNA 起始浓度愈高, 愈易获得高重复序列。如不可能得到较高的 DNA 起始浓度 (即 DNA 来源困难), 则可适当延长复性时间, 同样可获得所需的重复序列。

本实验不可缺少的一步就是测定所获得的 DNA 重复序列的  $C_0t$  值。 $C_0t$  值分析也是最简单、快速估算 DNA 重复序列等级的方法。它本是计算 DNA 复性程度的一个参数, 因为复性速度与某类 DNA 在反应体系中的浓度 (也就是某类 DNA 序列重复的程度) 直接成正比关系, 而与复性时间成反比。于是在复性动力学反应中, 某段时间 (t) 中复性的 DNA 浓度 ( $C_0$ ), 其乘积  $C_0t$  值, 可作为 DNA 重复程度的指标。对于哺乳动物,  $C_0t$  值小于 0.1 的复性 DNA 都是高重复序列, 其拷贝数在  $10^5$  以上;  $C_0t$  值在 0.1—100 之间为中重复序列, 其拷贝

数在  $10^2$ — $10^5$ ;  $C_0t$  值大于 100 者, 为低重复序列, 其中当然包括单拷贝基因。本文所用的  $C_0t$  计算是根据 Britten 和 Kohne 在文献[2]中所记述的方法。也可直接用紫外吸收值计算, 即  $C_0t = 0.5 \times A_{260} \times h$ 。两种公式所得结果接近。后一种公式可由下列方程推导:

$$C_0 = A_{260} \times 1.47 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$$

$$C_0t = A_{260} \times 1.47 \times 10^{-4} \times 1s$$

如时间以小时计算, 则可简化为:

$$C_0t = A_{260} \times 1.47 \times 10^{-4} \times 1s = 0.5 \times A_{260} \times h$$

详细推导方程的过程可参阅文献[3]。

### 参 考 文 献

- 1 Sambrook, J. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Press, New York, 1992. 465—467.
- 2 Britten R. J. and D. E. Kohne. Repeated sequence in DNA. *Science* 1968, **161**: 529—540.
- 3 戴良婉主编. 核酸研究技术 (上册). 科学出版社, 1993. 24—25.

## 《动物学杂志》编辑委员会

主 编: 马 勇

副 主 编: 钱燕文 刘素霞

常务编委: 张 洁 潘星光 蒋志刚 冯 强

编 委 (以姓氏笔画为序):

|     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 马 勇 | 马建章 | 马崇玉 | 王永良 | 王苏舰 | 王祖望 | 冯 强 |
| 孙方臻 | 刘兰英 | 刘素霞 | 宋大祥 | 宋延龄 | 张 洁 | 张春光 |
| 陈致和 | 陈佩惠 | 杨 潼 | 沈猷慧 | 赵承萍 | 郑光美 | 郑智民 |
| 钟文勤 | 柳建昌 | 费 樑 | 桂建芳 | 徐延恭 | 钱燕文 | 盛和林 |
| 盛连喜 | 曹 焯 | 蒋志刚 | 潘星光 |     |     |     |

责任编辑: 刘素霞 刘兰英