

A STUDY ON TUBULIN POLYMERIZATION IN VITRO AFFECTED BY *TRIPTERYGIUM HYPOGLAUCUM* (LEVEL) HUTCH

SONG Zhong Kui LIANG Zi Qing WANG Xu

(Department of Life Sciences, Yunnan Normal University, Kunming 650092)

ABSTRACT

The experiment employed tubulin from porcine brain to study the aneuploidy induction mechanism of the root extract of *Tripterygium hypoglaucum* (Level) Hutch (THH) by analyzing the polymerization of tubulin. Colchicine was positive control of the experiment. The experiment found that THH can inhibit the polymerization significantly and showed a dose-effect relationship. The results was identical as our research before: THH is a aneugen in mammal. We concluded that one of a pathway of aneuploidy induction by THH was tubulin polymerization inhibiting.

Key words: *Tripterygium hypoglaucum* (Level) Hutch Tubulin polymerization Aneuploidy

实验技术

一种从琼脂糖凝胶上回收 DNA 的高效、快捷、经济的方法

姜勇 刘杰 陈伟明

(第一军医大学病理生理教研室和全军休克微循环重点实验室 广州 510515)

如何从琼脂糖凝胶上分离和提取 DNA 是分子生物学常见的一个问题。多年来已提出过多种从凝胶中回收 DNA 的方法,但没有一种方法尽如人意^[1]。近年来,二氧化硅基质(silica matrix),又称为玻璃奶(glass milk)的方法被广泛使用^[2],国外多家生物技术公司都推出相应的试剂盒,使琼脂糖凝胶 DNA 的提取,更加方便快捷,但这种试剂盒很昂贵,目前尚不适合在国内实验室推广。

这里我们报告一种制作简单、造价便宜并且十分有效的从琼脂糖凝胶上分离和提取 DNA 的方法。依据 Marziliazo 等人提出的方案^[3],我们设计了一种套式 DNA 回收装置用于琼脂糖凝胶的 DNA 回收,这种装置由四部分组成:一个 1.0ml 的蓝色吸头、一个 0.5ml PCR 管、一个 1.5ml EP 管和聚脂纤维填充物(polyester fiberfill, Poly-fil Supreme, Fairfield

Processing Corp., Danbury, CT, USA)。用其他多种普通纤维织物代替上述聚脂纤维也都具有类似的效果^[4]。其具体结构形式如图 1 所示。

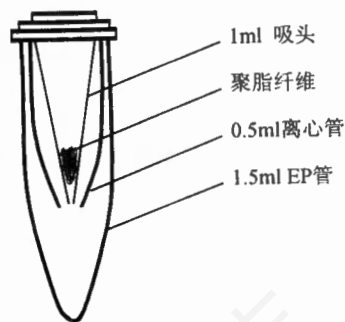


图 1 套式琼脂糖凝胶 DNA 回收装置的结构示意图

这种套式琼脂糖凝胶 DNA 回收装置的装配过程比较简单,如图 2 所示:首先将 0.5ml

本文 1999 年 1 月 26 日收到,6 月 28 日接受。

PCR管的盖和底部剪掉,然后将1ml蓝色吸头插进0.5ml PCR管,切掉吸头伸出管口的部分,将2-3mg的聚脂纤维填充物疏松地放进蓝色吸头尖端,然后将上述包含有蓝色吸头的0.5ml PCR管一起放进一个无盖的1.5ml EP离心管中。样品电泳完毕后,在紫外灯下观察琼脂糖凝胶上的DNA条带,用手术刀片将相应的DNA条带切下。将含有DNA的凝胶块放入上述套式DNA回收装置内。室温离心

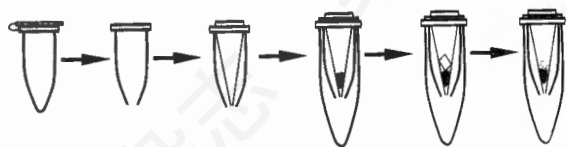


图2 套式DNA回收装置的装配和使用过程

后,从EP管内收集含有DNA的液体。

这种套式DNA回收装置对Glen氏的PEPSIs(polyester plug spin inserts)方法进行了重要的改进^[5]。使用PEPSIs方法,如果离心时间和/或速度增加到能获得更多的DNA时,装在1.0ml的蓝色吸头管里的聚脂纤维填充物就会被压缩到吸头的终端,并浸入到含有DNA的洗脱液里面,造成DNA洗脱液的毛细管样吸附作用,使DNA的回收量进一步减少。使用这种套式DNA回收装置就避免了上述问题,使DNA回收率有明显提高^[3]。

为了评估这种套式DNA回收装置复提DNA的效率,我们用p38 MAPK^[6]的编码区PCR片段(1.1kb)在琼脂糖凝胶上电泳。电泳完成后,在紫外观察灯下将包含整个PCR片段

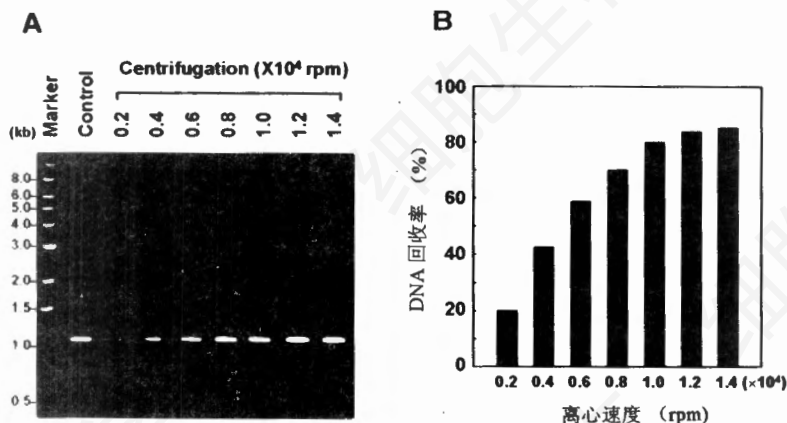


图3 离心速度对套式DNA回收装置回收DNA效率的影响

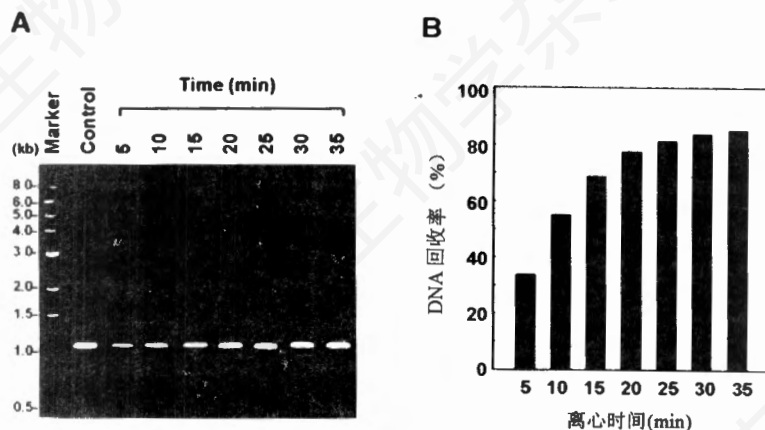


图4 离心时间对套式DNA回收装置回收DNA效率的影响

的琼脂糖凝胶块被从整个胶上切割下来,并放入套式 DNA 回收装置内。按不同的离心速度(2 000 - 12 000 rpm, 30 min)和离心时间(5 - 25 min, 12 000 rpm)离心。将获得的 DNA 再次在琼脂糖凝胶上电泳,应用 Bio-profile 图象分析软件(法国 Vilber Lourmat)对每个带的亮度用凝胶图象分析系统进行分析。由图 3 可见,对于 p38 的 1.1kb 的 PCR 片段,在离心时间一定的情况下,DNA 的回收率随着离心速度(力)的增加而增加,但在离心速度超过 10 000 rpm 后,其 DNA 回收率趋于水平,不再有明显增加。对离心时间和 DNA 回收率的关系(图 4)分析表明,在离心早期随着离心时间的延长,DNA 回收率明显增加,但 25 min 后,DNA 电泳回收率在 82% 左右;继续延长离心时间并不能明显提高 DNA 的回收率。上述结果显示,用套式 DNA 回收装置回收 DNA 的最佳参数是 10 000 rpm 离心 25 min。我们用这一参数对多个 DNA 片段从琼脂糖凝胶上进行回收,结果表明该方法具有较好的重复性。

用这种套式 DNA 回收装置回收分子量较大的 DNA 效果也较好。实验表明,对于 6kb 的 DNA 片段,用上述方法,DNA 回收率仍可达

75% 左右。另外,在离心之前加入一定量的 TAE 缓冲液浸泡 5 - 10min 后再离心,可在某种程度上增加 DNA 的回收率。加入的 TAE 缓冲液的量,应依据琼脂糖凝胶的大小来定,但一般加入的 TAE 缓冲液不要超过 50 μ l。

用上述方法在 DNA 洗脱完毕后,用 1/10 体积的 3mol/L 醋酸钠和 2.5 体积的无水酒精,在 -20 $^{\circ}$ C 的条件下过夜,使 DNA 沉淀。我们用 Flag 标记的 p38 MAPK^[6] 的编码区的 PCR 片段(1.1kb)在琼脂糖凝胶上电泳后,用这种方法回收。将上述 PCR 产物和载体 pcDNA3 空载体用 Hind III 和 Xho I 酶切后,于室温进行连接反应 6 小时。然后,转化大肠杆菌 DH5 α ,铺板生长 18 小时,挑取单个菌落在 LB 培养基生长至 OD_{0.6},进行 DNA 制备。用同样的酶切位点进行酶切鉴定(图 5)^[6]。实验证明,用这个方法制备的 DNA 可用于制备随机引物 DNA 探针、切口平移、进行原位杂交、Southern 印迹分析、核酸内切酶的消化和连接或直接用来进行 DNA 测序^[3]。

摘 要

目前在国内分子生物学实验室所采用的多种从琼脂糖凝胶上回收 DNA 的方法普遍存在着各种问题。本文介绍一种新的从琼脂糖凝胶上分离和提取 DNA 简易装置。实验表明用这种装置回收 DNA 具有高效、快捷和经济的优点,非常适合在国内实验室普及推广。

关键词: 琼脂糖凝胶 DNA 回收

参 考 文 献

- [1] Sambrook J, et al., 1989, *Molecular cloning. A laboratory manual.* (2nd ED). Cold Spring Harbor Press.
- [2] Vogelstein B, et al., 1979, *Proc Natl Acad Sci USA*, 76(2):615.
- [3] Marziliano N, et al., 1997, *Elsevier Trends Journals Technical Tips Online*, T01248.
- [4] Levine, RA., 1994, *Bio Techniques*, 17:67.
- [5] Glenn TC, et al., 1994, *Trends Genet*, 10(10):344.
- [6] Jiang Y, et al., 1996, *J Biol Chem*, 271 (30): 17920.

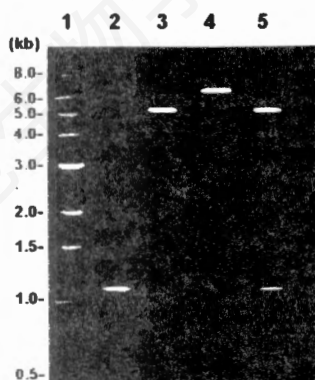


图 5 用套式 DNA 回收装置回收的 DNA 可用于酶切和连接反应

1. 标准; 2. Hind III 和 Xho I 酶切的 Flag-p38 PCR 片段; 3. Hind III 和 Xho I 酶切的 pcDNA3; 4. 构建在 pcDNA3 的 Flag-p38 表达质粒; 5. Flag-p38 表达质粒的酶切图(Hind III 和 Xho I)。

ANovel HIGH-OUTPUT, QUICK AND ECONOMICAL METHOD FOR DNA RECOVERY FROM AGROSE GEL

JIANG Yong LIU Jie CHEN Wei Ming

(Key Lab for Shock and Microcirculation of PLA, The First Military Medical University, Guangzhou 510515)

ABSTRACT

Up to now, there are a lot of problems in the methods of DNA recovery from agrose gel in the laboratories of molecular biology. Here we introduce a novel easy-making apparatus for DNA isolation and extraction from agrose gel. It was shown by experiments that this apparatus has high-output, timesaving and economical advantages, and is very suitable for the spreading in the laboratories of our country.

Key words: Agrose gel DNA recovery

名词讨论

与 Homologue 有关的几个名词译名探讨

薛良义

(宁波大学海洋与水产业系 宁波 315211)

随着分子系统学这一学科的迅速发展,与 homologue 一词有关的一些术语,如 orthologous, paralogous 等,在科学期刊上出现的频率越来越高。如何翻译这些术语?在此笔者提出自己的一点看法。

Homologue(形容词 homologous,可作名词用)一词来源于希腊语,该词的美式拼法为 Homolog,但文献上大多采用英式拼法。该词有两部分组成,homo-意指“same”,-logue 意指“word”或“sense”。根据其意,化学中通译同系化合物,生物学中通译为同源物。但在不同的应用层次,所指的对象并不相同,因而可以有多个译法,例如,进化生物学家早就使用该词表示同源器官,而细胞遗传学家则使用该词来表示同源染色体。随着分子生物学的发展和系统进化研究在分子水平上的深入,分子系统学家赋予该词更广泛的涵义,用它来表示同源基因。

从分子系统学的观点来看,有几种不同类型的同源基因,即 orthologous, paralogous 和 xenologous。这些词汇显然是由 -logous 加上不同的前缀构成,orth-意指正、直、正常的、邻、原等,para-表示近、侧、旁、外、副、拟、对、异常等,xeno-指异、外。有人把 orthologous 译成纵向同源物,paralogous 译成横向同源物,从字面上讲是可以的,但这几个术语都是与分子系统进化有关,因此可以把译名表达的意义更明确些。按定义,orthologous 是指通过物种的进化产生的同源物,具体地讲是指不同物种间相对应的基因或多基因家族中的相对应成员,如人和老鼠的 α -血红蛋白基因就是 ortholo-

gous。通过对不同物种 orthologous 的比较研究,可以了解物种的系统进化历史。考虑到在系统进化研究上的意义,把 orthologous 译为种系同源物,似乎更为恰当,译名所表达的含义也更为明确。

Paralogous 是指由基因复制而产生的同源物,它可以指同一物种内同一基因家族中的不同成员,如人的 α 和 β 血红蛋白基因,也可以指不同物种间相对应基因家族中的不同成员,如人的 α 血红蛋白基因和鼠的 β 血红蛋白基因。Paralogous 只能用来研究基因的进化历史,而不能用来研究物种的系统进化,因此可把 Paralogous 译为复制同源物。

Xenologous 是指由于基因转移,如通过逆转录病毒,使进化上不直接相关的物种间出现的同源基因,根据其意可译为异源同源物。

参 考 文 献

- [1] Ouzounis, C., 1999, Trends in Genetics, 15 (11): 445.
- [2] Fitch, W. M., 1970, Systematic Zoology, 19: 99 - 113.
- [3] Nelson, G., Homology and Systematics. In "Homology: Hierarchical Basis of Comparative Biology", Ed. Hall, B. K., Academic Press, 1994, pp101 - 149.
- [4] Hillis, D. M., et al., Molecular Systematics. 2nd Edition. Sinauer Associates, Inc, 1996.
- [5] Futuyma, D. J., Evolutionary Biology. 3rd Edition. Sinauer Associates, Inc. 1997.