

編號：CCMP93-RD-049

# 蘆薈染色體的流速細胞分析分離、基因體 DNA 的限制酶位點及其序列分析

何世屏

國立中山大學

## 摘 要

在世界上數百種蘆薈的百合科植物中，有四種特別的藥用蘆薈在臺灣有零星的種植，研究取材方便。蘆薈的藥用成份十分複雜，大量的研究證明蘆薈在醫療實踐中有廣泛的應用，從抗菌、消炎、抗癌、止血、療傷、止痛鎮靜到免疫調節及影響基因表達等都存在著蘆薈的化學成份。因此，蘆薈的開發利用存在著巨大的潛力和前景。本研究已完成了蘆薈的核蛋白體之提取、對其中三個連鎖群進行分離、浮力測定等方法的研究，並獲得了 DNA 片斷的克隆等研究工作，初步達到了如期的研究進展。

蘆薈核蛋白體提取物經由含有指示劑的（糖）濃度梯度分離已獲得了第五、六及七等三個連鎖群。這些連鎖群由於分離過程中無法避免地使用指示劑而呈現出其浮力密度值有較大的變異性，說明存在著分子結構上的不穩定狀態，但本方法具有重複性高，高分子 DNA 不斷裂等特點，符合基因體研究的根本要求。瓊脂糖凝膠對核蛋白的分離也證明瞭所分離的 DNA 分子具有連續而不斷裂的特點。沉降法對三個連鎖群分離的初步計算結果表明這三個連鎖群的 DNA 分子量分別是  $14.8 \pm 6.1 \times 10^6$  bp（第五群）， $14.3 \pm 5.6 \times 10^6$  bp（第六群）及  $12.0 \pm 5.1 \times 10^6$  bp（第七群）。

此外，染色體分離的研究過程中意外地發現了一種簡便、純度高且重複性好的純化葉綠體 DNA 的分離方法，比傳統方法具有速度快，純度高，不斷裂等特點，符合染色體基因體的研究要求。

關鍵詞：蘆薈核基因體、（糖）濃度梯度、瓊脂糖凝膠、葉綠體 DNA、基因體 DNA 序列分析

Number: CCMP93-RD-049

# **Studies of Chromosome Purification, Genomic DNA Restriction Sites and DNA Sequencing in Medical Aloes**

Shi-Ping He

National Sun Yat-sen University

## **ABSTRACT**

There are about 10 special pharmacologically important species of aloe in the world, four of which are well cultivated in Taiwan. Thus it is rather convenient to set up the proposed studies with these medical plant species. It has been revealed that chemical components of the medication aloes are rather complicated, and many of which have been used in medical practice for years, including those as antibiotics, anti-inflammation, anti-cancer, healing, pain-killers and immune and gene expression regulators. Although studies have pointed to some important components, the functional drugs and their synthetic control genetically are far from detail. Biotechnological studies and synthesis of these medication components in elsewhere *in vivo* are based on the advances of genetic study, especially the arrangement of their genes in the genome.

We begin the aloe genomic study in March 2004 with a support of a grant (CCMP93-RD-049) from the Committee on Chinese Medicine and Pharmacy, Department of Health, Executive Yuan, R.O.C., and have so far achieved some important results. These include (1) isolation of the 5<sup>th</sup>, 6<sup>th</sup> and 7<sup>th</sup> chromosomes of the plant via gradient ultra-centrifugation, (2) naked genomic DNA measurements via sedimentation, and (3) cloning of DNA fragments in  $\lambda$ - and M13 phages. A few thousands of clones with different lengths of fragments have been achieved.

Calculation from sedimentation showed that, though there are some variations present due to chemical reagents used, the three chromosomes may contain  $14.8 \pm 6.1 \times 10^6$  bp,  $14.3 \pm 5.6 \times 10^6$  bp and  $12.0 \pm 5.1 \times 10^6$  bp respectively for the 5<sup>th</sup>, 6<sup>th</sup> and 7<sup>th</sup> chromosomes.

Moreover, we have achieved the isolation of an extra-chromosomal genome, as identified to be chloroplast genome, via agarose gel electrophoresis. We may be able to complete this genomic DNA sequencing in the coming year, provided that we have further grant-support for this project.

Keywords : Aloe genomics, sugar gradient ultracentrifugation, agarose gel electrophoresis, chloroplast genome, genomic DNA sequencing.

## 壹、前言

蘆薈在醫療實踐中有廣泛的應用，從抗菌、消炎、抗癌、止血、療傷、止痛鎮靜到免疫調節及影響基因表達等均有重要的臨床意義。因此，蘆薈的開發利用存在著巨大的潛力和前景。由於蘆薈存在著如此廣泛的藥用價值，近年來人們對蘆薈的遺傳及其個別基因已展開了某些研究並取得了初步的成果。

蘆薈是一種二倍體植物 ( $2n=2x=14$ )，可以進行有性繁殖及無性繁殖，並適合於大田種植 (圖一及圖二)。該物種染色體組的原位雜交 (Genomic in situ hybridization, GISH) 證明瞭蘆薈及其相近物種 (Gasteria) 的染色體的長度差別達 20%。種間遺傳學的研究還證明瞭蘆薈的某些遺傳特點上，如染色體的末端合成酶及其末端的結構等，介於兩棲類動物及植物之間。

個別基因的研究從一九九七年後也已悄悄地在蘆薈中展開。輔酶 II-蘋果酸酶催化蘋果酸的脫羧反應，但在蘆薈植物中，該酶歧化為二種形式：光合型的及非光合型的。一種輔酶 II-蘋果酸酶完整的 cDNA 已從日本木劍蘆薈中分離出來<sup>(1)</sup>，其序列與已知的其他植物的輔酶 II-蘋果酸酶有高度的同源性，可編碼 592 個氨基酸的多肽鏈，說明該 cDNA 並非蘆薈中重要的光合型蘋果酸酶<sup>(1)</sup>。

之後，同一日本研究小組又從同一種蘆薈中檢測到三種不同形式的輔酶 II-蘋果酸酶，一種的分子量為 72Kda，等電點為 6.0；第二種約為 65Kda，等電點為 5.6；第三種分子量為 65Kda，等電點為 5.5；其中第三種是葉片所特有的酶類，而第二種只在根部發現，第一種卻在葉片及根部中均存在。然而，令人驚奇的是第一種基本上缺乏生物學活性。

葉片所富含的蘋果酸酶基因已分離出來<sup>(2)</sup>。雖然整體而言，這個基因與上述的具有高度的同源性，但也發現 5 個保守氨基酸的代換，其中某些氨基酸對酶的催化活性起著極為重要的作用。這個研究小組還將該基因轉移到轉基因水稻 (transgenic rice) 中，並獲得有效的表達。

除了對個別基因的研究，也有人曾對蘆薈染色體末端重複序列展開研究並獲得了某些很有意義的結果。研究表明，蘆薈的染色體末端並不含有 5'-TTTAGGG-3' 的重複序列<sup>(3)</sup>。另一研究小組也證明瞭雖然蘆薈中缺乏 (T3AG3) 的末端序列，但卻富含 T2AG3 的特殊序列，並高達 33-60 次的重複<sup>(4)</sup>。這說明蘆薈中不含有普通植物的末端重複序列，卻含有兩

棲類動物的常見染色體末端重複序列。然而，該研究小組未能用單一的 (TAG3) 5 引物完成聚合酶鏈反應擴增蘆薈 DNA 的工作，這說明其中的結構比預期的複雜。

蘆薈的遺傳學及基因學研究剛剛起步，其研究成果與其藥用方面的重要性遠不能匹配。然而，基因學的研究是解開蘆薈產生如此多種多樣重要藥用成份秘密的最為重要的途徑之一。為了探究蘆薈的基因組結構、基因組成，基因的表達控制等重要的生物學問題及其藥用成份的生物合成及分解代謝等一系列重要的生物醫藥學問題，我們在行政院衛生署中醫藥委員會的計畫編號為 CCMP93-RD-049 的支持下展開了蘆薈基因體的研究。

## 貳、材料與方法

### 一、蘆薈染色體及其 DNA 的萃取

取大約五到八克重的新鮮蘆薈葉片，以 10% 的漂白水清洗一下，隨後以去離子水沖洗。用剪刀將蘆薈剪成碎塊，放在研鉢裡，加入液態氮後迅速將蘆薈葉片磨成粉末狀。加入 30mL 事先已經以 65°C 預熱過的 CTAB buffer，裝入離心管中在 65°C 水浴槽中作用一小時。隨後取出離心管，等待其冷卻之後加入 10mL 的 Chloroform: Isoamylalchol (24:1)，輕輕搖晃約 10 分鐘將其均勻混合，之後放入離心機，以 5,000rpm 離心 6 分鐘。離心完畢後小心將上清液取出，再加入 10mL 的 Chloroform: Isoamylalchol (24:1)，均勻混合後離心，此步驟須重複三至四次，以確保 DNA 的純度。隨後加入 0.08 倍體積之 ammonium acetate (7.5M) 與 0.54 倍體積之 isopropanol，輕輕搖晃 10 分鐘後置於 -20°C 冰箱中冰 30 分鐘，接著將其放入離心機內以 13,000rpm 離心 5 分鐘，去掉上清液，以 70% 酒精沖洗一下，再以 95% 酒精輕輕沖洗，隨後放置於無菌操作檯上等待其風乾，之後再以 1mL 的 TE buffer 溶解之。

### 二、蘆薈染色體及其染色體 DNA 的分離及沉降分析

蘆薈具有七對同源染色體，共十四條染色體（圖三）。採用 8% 至 20% 的蔗糖梯度對染色體分離提純。染色體在梯度上基本呈線性分佈。抽取出來的染色體將製成顯微片與有絲分裂的細胞染色體比較確定其從蔗糖梯度上分離出來的染色體序號。此外，染色體 DNA 的分離則採用 CsCl 的超速離心等方法（圖四）。將 10mL 的蘆薈染色體樣本倒入離心管中，隨後加入 TE buffer 使體積達到 35mL，再加入 35 公克 CsCl，輕輕搖晃使其溶解，再加入 0.8mL，濃度為 10mg/mL 的 EtBr，輕輕搖晃使其均勻混合，先在室溫下以 8,000rpm 離心五分鐘，以針筒吸取紅色清澈的上清液，注入封口式離心管，將封口式離心管平衡後封口，以 56,000rpm，4°C 離心 16 小時，之後取出離心管，於紫外光燈下固定，以針筒插入離心管中抽取分層的蘆薈染色體。在梯度系統中增加單位時間的移動便可計得其係數。

### 三、瓊脂糖凝膠電泳

製備 300mL，0.7% 的 agarose，以微波爐加熱溶解，待其稍微冷卻之後，倒入鑄膠器中，插入齒梳，等待其凝結。凝固後將膠體放入

電泳槽中，注入 TAE buffer 直到蓋過膠體，將蘆薈染色體樣本注入膠體凹槽中，在 50 伏特，4°C 的條件下進行約 20 小時，隨後將膠體放入 8% 的 EtBr 溶液中染色 15 分鐘後置於電泳膠片影像擷取分析系統中照相（圖五）。

#### 四、限制片斷的分析

蘆薈基因組 DNA 限制片斷可進行基因 DNA 的直接分析，定點擴增 DNA 片斷的分析及隨機擴增 DNA 片斷的分析等。研究中採用了 ECOR、BamH1、HindIII、XbaI、SmaI、PstI 及 Asp708 等十餘種常用內切酶對蘆薈基因組 DNA 進行分別或綜合性分析，其限制片斷用瓊脂擴凝膠進行分離鑑定，重要的片斷將用質粒（plasmid）進行克隆保存，以便進一步的序列分析鑑定（圖六）。

#### 五、蘆薈葉綠體的分離

首先先製備出蔗糖的梯度，在玻璃離心管中，先加入 3mL，70% 的蔗糖溶液，之後再慢慢加入 7mL，25% 的蔗糖溶液，使其形成一介面。

取一漏斗，鋪上四層藥用紗布使用 1X GR buffer 潤濕之後，放置於 500mL 錐形瓶上，將蘆薈葉片的葉肉去除，取約 40 克的蘆薈葉片表面，先以自來水洗淨，在用去離子水沖洗一下，放入均質機中，以每次 5 至 15 秒，間隔 15 秒重複 4 次，倒到漏斗裡過濾至錐形瓶裡，將汁液放入離心管中，以 1,000rpm 離心五分鐘，去除上清液，加入 200mL 1X GR buffer 使其懸浮，再以 4,000rpm 離心 10 分鐘，去除上清液，以少量 1X GR buffer 沉澱物懸浮，倒入以製備好的蔗糖梯度離心管內，以 25,000rpm 離心 60 分鐘。將上清液慢慢吸去，再將葉綠體慢慢吸取出來，加入 10mL 1X GR buffer 混合均勻，以 4,000rpm 離心 10 分鐘，去除上清液，以 2mL TE buffer 懸浮蘆薈葉綠體。

## 參、結果與討論

蘆薈基因體連鎖群（圖三）的成功分離為蘆薈基因體的序列分析（genome sequencing）奠定了科學基礎，其中意外地得到的葉綠體基因組的快速而精確的分離方法及其 DNA 限制片段的克隆（cloning of chloroplast DNA restriction fragments）為研究這個介於兩棲類動物及植物之間的特殊物種的基因體變遷創造了條件（圖五）。

蘆薈染色體（圖三）的分離結果（圖五）表明超高速條件下所形成的濃度梯度離心方法與流速細胞分離方法相比具有速度快，純度高，耗費低等實用特點，可作為藥用植物基因組研究的實用參考方法之一。

梯度分離可將蘆薈染色體 DNA 分為確定的三條帶及四條擴散型的核 DNA 帶區（圖四）根據分子探針（molecular probes）及浮力密度可明確地分出第五、六及七等三個連鎖群，其餘四群仍在分析鑑定之中。

與梯度分離的結果比較，蘆薈的核 DNA 在經過 60 小時的凝膠電泳可將七個連鎖群明顯地分為二個帶區（圖七），這一方法雖然較濃度梯度有明顯的限制性，但如進一步的改良可能成為未來根據分子量大小而直接分離核染色體 DNA 的主要方法之一。

利用 BamH1 對第五、六及七染色體 DNA 分別進行消化可得數千種不同大小的片段，在凝膠電泳中可見一系列的 smear 型分佈（圖六）。我們利用 $\lambda$ -及 M13 phages 已將這些片段建立了基因庫（gene library），為進一步完成某個別染色體基因序列分析奠定了基礎。

其次，蘆薈存在著大量的 satellite DNA（圖五所示），這些 DNA 的序列有待進一步的研究。



## 肆、結論與建議

從染色體的長度分，蘆薈的染色體可明顯地分為二個不同的長度群：染色體的第一、第二、第三及第四等四個連鎖群的大小相近，可分為第一長度群；染色體的第二、第六及第七連鎖群可為第二長度群。在染色體的同一直度群內的各條染色體的長度差異較小，因此，在基因體的研究中應採用更為明辨的分離方法。

實踐證明我們在中華蘆薈及美國蘆薈基因體的研究中所採用的基本策略及方法是可行的。

在某些物種中，流速細胞分離方法<sup>(7-10)</sup>對染色體 DNA 連鎖群的分離可能不是唯一的方法，超高速的濃度梯度可將像蘆薈那樣具有長度群內差別不大的不同染色體 DNA 進行有效的分離。

常規葉綠體基因組的分離方法較繁複，我們在分離核染色體連鎖群時發現了一種快速而精確的分離方法。其 DNA 限制片段也從而得到成功的克隆。

根據我們的初步估計，蘆薈葉綠體基因組的序列分析需要大約 1,000-1,200 次的序列分析反應，而最小的核染色體（即第七個連鎖群）的全序列分析需要 7,500-8,300 次的序列分析反應，這些估計數字包括了重疊片段的序列分析反應在內。

在細菌基因組（1993-1996）研究及人類基因組（1992-2002）研究開創之前已有分別為 60%（感冒桿菌）及高於 50%（人類）的基因序列被確定，儘管如此，這些研究還是採用了世界合作的方式，花了十一年的時間才完成了人類全部序列的定序。雖然現在的技術及研究方案上已很成熟，但仍需要一個團隊的合作。因此，中醫藥委員會是否可考慮成立由一位經驗豐富的研究主持人負責跨院校的合作研究團隊，由各研究小組主持人共同協調各條染色體 DNA 的最終分析，將大大地加速蘆薈基因體全序列的完成。

## 誌謝

本研究計畫承蒙行政院衛生署中醫藥委員會，計畫編號 CCMP93-RD-049 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

## 伍、參考文獻

1. Honda H. Akagi H. Shimada H. (2000) An isozyme of the NADP-malic enzyme of a CAM plant, *Aloe arborescens*, with variation on conservative amino acid residues. *Gene*. 243(1-2): 85-92.
2. Adams SP. Leitch IJ. Bennett MD. Leitch AR. (2000) *Aloe L.*--a second plant family without (TTTAGGG)<sub>n</sub> telomeres. *Chromosoma*. 109(3): 201-205.
3. Weiss H. Scherthan H. (2002) *Aloe spp.*--plants with vertebrate-like telomeric sequences. *Chromosome Research*. 10(2): 155-164.
4. Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., and Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18, 6531-6535.
5. Dapeng, Z., Ghislain, M., Huaman, Z., Golmirzaie, A., and Hijmans, R. (1998). RAPD variation in sweetpotato (*Ipomoea batatas*(L) Lam) cultivars from South America and Papua New Guinea. *Gen. Res. Corp Evol.* 45, 271-277.
6. Doyle, J. J., and Doyle, J. L. (1990). Isolation plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12, 13-15.
7. Ormerod, M. G. (ed.) (1994) *Flow cytometry, a practical approach* (2<sup>nd</sup> edn). Oxford University Press.
8. Gray, J.W. (ed.) *Flow cytogenetics*. Academic Press, London.
9. Melamed, M.R., Lindmo, T. and Mendelsoln, M.L. (1990) *Flow cytometry and sorting* (2<sup>nd</sup> edn). Wiley-Liss Inc., NY.
10. van den Engh, G.J., Trask, B. J., Gray, J. W., Langlois, R.G. and Yu, L-C. (1985) *Cytometry*, 6, 92.

## 陸、圖



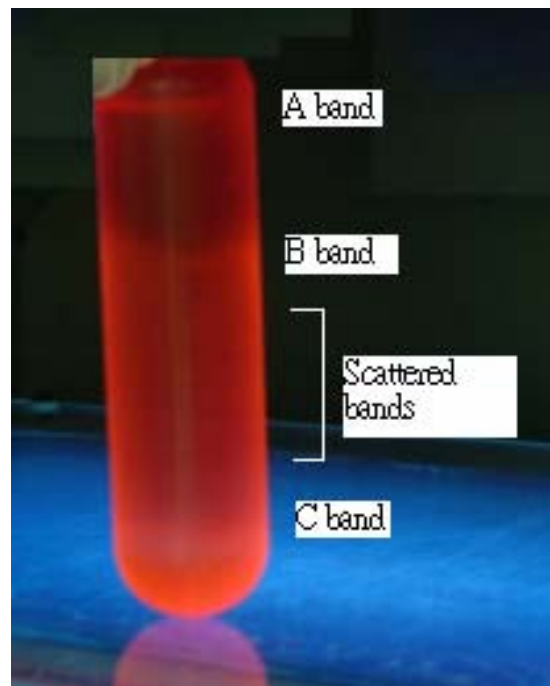
圖一 大田種植的藥用中華蘆薈品種



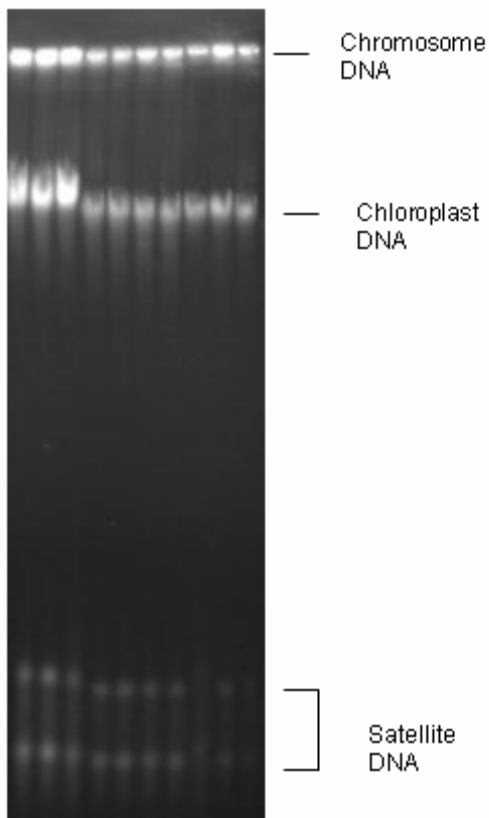
圖二 大田種植的藥用美國蘆薈品種



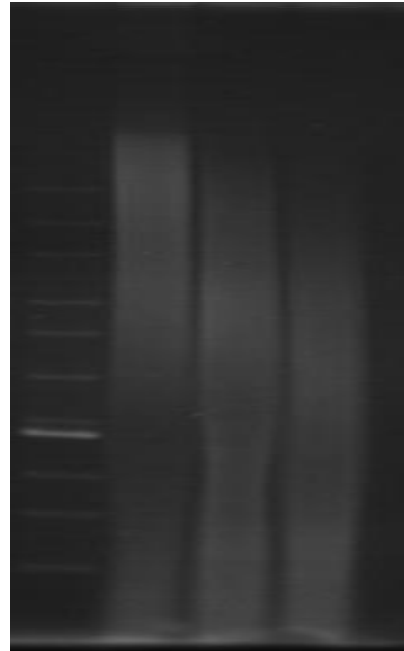
圖三 中華蘆薈染色體的顯微圖像



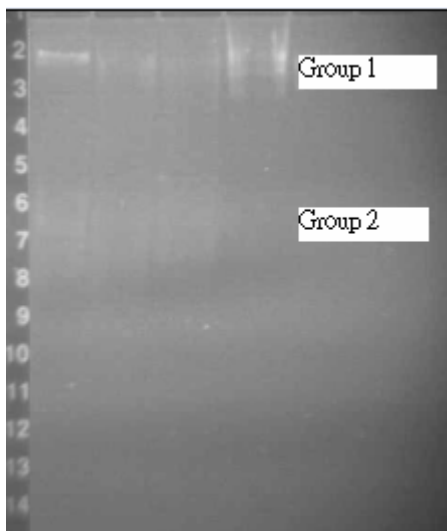
圖四 蘆薈染色體 DNA 的分離純化



圖五 中華蘆薈染色體 DNA 的分離圖譜.



圖六 中華蘆薈第五，六，七三個連鎖群的 BamH1 限制酶譜



圖七 蘆薈基因組 DNA 的直接分離