

私立中山醫學院醫學研究所

Graduate Institute of Medicine

Chung Shan Medical and Dental College

碩士論文

Master Thesis

台灣山羌核型及衛星 DNA 之研究

Karyotype and Satellite DNA Analysis of

Formosan Muntjac (*Muntiacus reevesi*

*micrurus*)

指導教授：林齊強 博士(Chyi-Chyang Lin, Ph. D)

李宣佑 博士(Shuan-Yow Li, Ph. D)

研究生：江佩宜(Pei-yi Chiang)

中華民國九十年七月

July 2001

# 目錄

英文摘要.....	2
中文摘要.....	4
序 言.....	6
材料與方法.....	11
結 果.....	31
討 論.....	36
圖 表.....	40
參考文獻.....	61

## 英文摘要

Asian muntjac or barking deer consists six known species; *Muntiacus muntjak*, *M. reevesi*, *M. rooseveltorum*, *M. crinifrons*, *M. feae*, and *M. atherodes*. The native endangered Formosan muntjac (*M. reevesi micrurus*) in Taiwan is classified as one of the two subspecies of *M. reevesi*. In the past, there has been some documentations regarding the morphology, ecology, behavior, habitat and captivity of this subspecies, and yet no molecular cytogenetic study has been reported. The present thesis research therefore is aimed to gather molecular cytogenetic data of the Formosan muntjac. Based on the G-banding analysis, the chromosome number of this subspecies is identified as  $2n = 46$  and in general its G-banded karyotype is resemble to the DAPI-banded karyotype of the other subspecies, the Chinese muntjac (*M. reevesi reevesi*). Two satellite DNA clones designated as FM sat I and FM 1kb were generated from PCR amplification of Formosan muntjac genomic DNA using primer sequences obtained from Chinese muntjac satellite I (C5) (Lin et al. 1991) and white tailed deer satellite II clone (OvDII) DNA, respectively. Sequence comparison revealed that FM sat I and C5 shared 82% homology. No significant sequence homology was found between FM 1kb and any reported cervid satellite DNA. However, very high sequence similarity was observed between FM 1kb and CM 1kb (98%) (Li et al. unpublished). Southern hybridization using FM sat I as a probe on Formosan muntjac genomic DNA digested with several restriction endonucleases revealed prominent bands in a 0.75- 0.8 register confirming the nature of satellite DNA. On the other hand, irregular

banding patterns were observed using the FM 1kb as a probe. FISH study using either FM sat I and/or FM 1kb as probes on Formosan muntjac chromosome preparations revealed strong FM sat I hybridization signals on the centromeric regions of all chromosomes with the exception of a pair of chromosome 3 and the Y chromosome. Interstitial signals by FM sat I were also observed in six pairs of autosomes. Among those, two interstitial signals were found in each chromosome of three pairs of the largest chromosomes in the complement. One interstitial signal was found in each chromosome in the remaining three pairs of chromosomes with smaller size. FISH with FM 1kb probe showed hybridization signals on centromeric regions of all chromosomes except on chromosomes 3 pairs and the Y chromosome. Interstitial signals were similar to those seen with FM sat I. Co-hybridization with both satellite DNA probes revealed that although both satellite DNA sequences located at the centromeric/pericentromeric regions, the satellite DNA FM 1kb appeared located near the distal end of the chromosome, whereas, the FM sat I was located more proximally. Based on the results of karyotypic analysis, satellite DNA sequencing and FISH signals distribution, it is reasonable to suggest that Formosan muntjac and Chinese muntjac are closely related.

## 中文摘要

羌屬或稱 barking deer, 在分類上可分為 6 種, 分別是 *Muntiacus muntjak*, *M. reevesi*, *M. rooseveltorum*, *M. crinifrons*, *M. feae*, *M. atherodes*。台灣山羌(*M. reevesi micrurus*)為本土保育類動物, 屬於 *M. Reevesi* 中兩個亞種之一, 過去僅少數研究報告, 探討其生態、行為的表現、棲息地、人工豢養和野生習性之不同, 其分子細胞遺傳學的研究則尚無報告, 本論文應用 G-banding 帶狀技術的分析, 確定台灣山羌染色體的數目為  $2n = 46$ , 其核型帶狀與另一個亞種中國山羌(*M. reevesi reevesi*)相當接近。另外, 從台灣山羌的基因組中選殖了二段鹿科衛星 DNA, 一段約為 1.5 kb, 稱為 FM sat I, 另一段為 1 kb, 稱為 FM 1 kb。其中 FM sat I 的序列與中國山羌 sat I DNA (C5)之相似性高達 82%; FM 1kb 的 DNA 序列則和已發表之鹿科衛星 DNA 都不相同, 僅與最近選殖自中國山羌的衛星 DNA (CM 1 kb)有很高的相似性(98%)。以台灣山羌衛星 DNA (FM sat I) 為探針進行南方氏雜交反應, 可見到 DNA 片段是以 0.75-0.8kb 為單元體的規則性梯狀排列, 至於 FM 1 kb DNA 的南方點漬圖則呈現出不規則的形式。利用 FM sat I 及 FM 1 kb 為探針分別與台灣山羌染色體進行螢光原位雜交反應, 除了第三對染色體及 Y 染色體的

著絲點偵測不到訊號外，其餘染色體的著絲點都可偵測到 FM sat I 的訊號。另外，一些染色體臂上也有 FM sat I 螢光雜交的訊號，如第 1-3 對染色體各有兩處 interstitial (FM sat I) 的訊號，而尚有三對較小的體染色體各有一處 interstitial 訊號反應。觀察(FM 1 kb)在台灣山羌染色體上的分佈，也是除了第三對染色體及 Y 染色體著絲點沒有訊號反應之外，其餘的染色體皆有 FM 1 kb 的訊號反應，而染色體臂上 interstitial 雜交訊號則與 FM sat I 的反應相同。當同時以 FM sat I 和 FM 1 kb 為探針做原位雜交反應時發現，雖然兩種探針的訊號都同時出現在著絲點的位置上，但 FM 1 kb 的訊號比起 FM sat I 則較接近染色體的末端。由上述結果發現，台灣山羌和中國山羌無論是在核型、著絲點衛星 DNA 序列以及衛星 DNA 在染色體上的分佈情形，都有相當高的相似性，證明此二種山羌的血緣關係非常相近，被分為 *M. reevesi* 之二種亞種是相當合理。期望藉由以上資料的建立，能夠提供一些資訊對於探討台灣山羌演化的相關研究有所幫助。

## 序言

羌屬(*Muntiacus spp.*)或稱 barking deer 是鹿科(*Cervidae*)動物中體型較小，具獨居性，活動於森林中的一群動物，僅分佈於印度、中國大陸東南部及東南亞等地(Walker, 1968)，所以又稱為亞洲羌屬。本屬共有 *Muntiacus. muntjak*, *M. reevesi*, *M. rooseveltorum*, *M. crinifrons*, *M. feae*, *M. atherodes* 六個種(Nowak, 1991)，這些種早期曾被分為二十個亞種(Whitehead, 1972) (表 1) (註)，其中 *M. reevesi* 分為兩個亞種，一個亞種為中國山羌(*M. reevesi reevesi*)，分佈於中國大陸東南部。另一個亞種分佈於台灣，屬台灣特有亞種，即台灣山羌(*M. reevesi micrurus*) (Whitehead, 1972)。

目前對於台灣山羌的生態及行為研究(王穎、王敏男, 1989)，例如山羌特有的吠聲行為、棲息地(王穎、陳怡君, 1991)野生或者人工豢養等已有較多的探討，然而在核型(karyotype)及分子細胞遺傳之研究，則尚未見諸文獻。一般探討羌屬核型時，最令人感到有趣的現象是這些不同種的染色體具有明顯的變化，核型的重組非常快速，因此在鹿科中被劃分為高速核型演化群(Bengtsson, 1980)。其中印度山羌(*M. muntjak vaginalis*)是至今擁有最少染色體數目的哺乳類動物，其雌性染色體數目為  $2n = 6$ ，雄性染色體數目則為  $2n = 7$  (Wurster and

Benirschke, 1970)。在其血緣相近的羗屬中，如 Black muntjac (*M. crinifrons*)和 Gongshan muntjac (*M. gongshanensis*)，雌性染色體的數目為  $2n = 8$ ，雄性染色體的數目  $2n = 9$  (Shi, 1983 ; Shi and Ma, 1988)；雌性 Fea's muntjac (*M. feae*)染色體的數目為  $2n = 14$  (Soma et al., 1983)，而雄性 Fea's muntjac 染色體的數目則為  $2n = 15$  (Soma, 1987)。至於中國山羗(*M. reevesi reevesi*)的染色體數目則為  $2n = 46$  (Wurster and Benirschke, 1967)；而台灣山羗核型的研究，則無相關的資料報導，因此建立台灣山羗細胞及分子遺傳的基本資料，對於探討演化相關題材，可以提供更加完善的資訊，此為本論文研究的主要目的。早年有關於羗屬核型演化的研究(Shi et al., 1980)，從細胞遺傳的觀點出發，不外乎是 G-banding 核型帶狀分析，C-banding 異染色質 (heterochromatin)成分的多寡與分佈，以及 NOR (nucleolar organizer regions)在染色體上座落的位置等為主要觀察項目。Brinkley et al. (1984)曾利用中國及印度山羗的 kinetochore 去探討中國及印度山羗的演化關係，隨著分子生物技術的發展，於是有人利用 highly repetitive DNA 在鹿類染色體上之分佈及組織做演化上的研究(Bogenberger et al., 1987)。這些重複性 DNA 的基本重複單位是以前後順序排列，就稱為所謂的衛星(satellite) DNA，例如人類的 $\alpha$ ,  $\beta$ 和 $\gamma$ -satellite DNA，鼠類的 major, minor-satellite DNA 到鹿科動物的 satellite I,II,III DNA 等

等，都是屬於高度重複序列衛星 DNA，且其位置都座落在染色體著絲點及其附近區域。應用這些高度重複序列衛星 DNA，針對一些血源關係相近的物種做比較分析時，發現這些衛星 DNA 尚保留相當高的同源性，相關報告如 primate 的  $\alpha$ -sequences (Maio et al., 1981) 以及鹿類的 cervid satellite DNA (Lee et al., 1997) 等。雖然相關研究都證實這些高度重複序列在同一物種或血緣關係相近的物種之間有非常高的同源性，有助於血緣關係的建立 (Fry and Salser, 1977; Lima-de-Faria et al., 1984; Arnason, 1987; Dod et al., 1989)。但是，也由於這些重複 DNA 序列的 copy number 或重複的 DNA 序列不同，於是在不同物種間會造成種的特異性 (Fanning et al., 1988; Modi et al., 1988; Hamilton et al., 1990; Wichman et al., 1991; Wijers et al., 1993; Modi, 1993)。以鹿科動物為例，截至目前為止，已發現的鹿類 centromeric satellite DNA 家族共有三種，分別為 satellite I (表二)、II (表三) 和 III (表四)，其中對 satellite I 的發源、演變及其基因組的結構有較詳盡的探討。Lee et al. (1997) 依據 10 種不同鹿類之 17 個 centromeric satellite DNA 基本單元之序列的分析結果，對鹿類 satellite I 的起源及變化作如下之推論：所有鹿類的 satellite I DNA 是由一個原始的 31 bp 單元擴增而來的，經由這一個 31 bp 之原始單元擴增而組成之高層結構 (hierarchical structure) 共有兩大類，一類是組成 0.8 kb 的單元體，在所有的

plesiometa carpalia 這一類的鹿科動物可發現有此特徵。另一類是組成 1 kb 的單元體，則發現於 telemeta carpalia 之鹿科動物。由於現有的鹿科動物的單元體，原來都是 high order structure，因此同一品種之鹿類，其單元體之間的序列有很高的相同性。Qureshi and Blake (1995) 從白尾鹿(white tailed deer)發現了另一個鹿科 satellite DNA 家族，其單元體之大小為 0.7 kb 且和牛科的 satellite II DNA 之序列有相當高的相同度，因而稱為鹿科的 satellite II DNA (OvDII)。最近 Li et al. (2000 a)也從麋鹿(caribou)中找到和 OvDII 序列相近的 satellite II DNA 片段，經比較 satellite II 及 satellite I DNA 在麋鹿的染色體上分配的情形，並利用染色質絲螢光原位雜交法，發現這二種 satellite DNA 各形成長約 200  $\mu\text{m}$  之長串(約包含  $2 \times 10^3$  kb 之 DNA)相繼並列在某一條染色體之著絲點上。同時 Li et al. (2000 b)還利用此二種 satellite DNA 為探針與印度山羌之染色體進行螢光原位雜交，從印度山羌染色體之中間位置所發現的雜交訊號(interstitial hybridization signals)之數目，推測印度山羌的核型可能從具有  $2n = 70$  的羌類祖先直接演變而來。至於 cervid satellite III DNA 原先是從小鹿(roe deer)的 DNA 中分離出來 (Buntjer et al., 1998)，這種 cervid satellite III DNA 被認為僅存在於 roe deer (*Capreolus capreolus*)之基因組中，然而最近才利用 PCR cloning 的方法發現，中國水鹿(Chinese water deer)的 DNA 中，也具有 satellite

III DNA (Li et al., unpublished)。至於衛星 DNA 在本土台灣山羌的種類及其在染色體上的分佈情形，目前並無資料可考，所以本論文的研究除了分析台灣山羌的核型之外，還針對其衛星 DNA 做選殖、鑑定，並探討其在染色體上分佈的情形，以期建立屬於台灣本土特有鹿類的一些分子細胞遺傳學資料。

## 材料與方法

### 一、檢體來源 纖維母細胞的初級培養(Primary culture of fibroblasts)

初級培養的纖維母細胞是來自台北市立動物園豢養之台灣山羌雌、雄各一之耳部皮下組織，依標準組織培養程序建立。其程序如下：經局部消毒後切除山羌耳下組織塊(長 x 寬 x 厚各約 0.2 公分大小)，隨即置放於含抗生素及抗黴菌素之培養基[DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Gibco/BRL) + 10 % antibiotic-antimycotic (penicillin-streptomycin- amphotericin) (Gibco/BRL)]中約 3 小時，之後將組織塊取出轉置於含抗生素及抗黴菌素之培養基(DMEM + 1 % antibiotic-antimycotic)中，靜置於 4 °C 冰箱冷藏 24 小時。隔夜取出組織塊，再次以含 1 % antibiotic-antimycotic 之 DMEM 清洗 1-2 次後，以滅菌過之解剖刀來回對切使其成小碎片狀。取 0.1-0.2 ml 之培養基(DMEM + 15 % fetal bovine serum + 1 % penicillin-streptomycin-neomycin + 1 % glutamine) (Gibco/BRL)與組織混合後，均勻塗於 T-25 培養瓶內之附著面，並保持濕潤狀，置放於 5 % CO<sub>2</sub> 培養箱 37 °C 培養，隔夜再小心追加 2 ml 培養基(注意不可沖刷組織塊黏貼處，避免組織塊脫落漂浮)，繼續培養三天後再追加 3 ml 之培養基至 5 ml，培養至第六天再取出觀察。待細胞生長至八九分滿時，可將細胞貯存於

含 10 % glycerol 培養基中，放入液態氮中長期保存。

## 二、細胞培養及染色體製備

### A：細胞原位培養法 (In- situ culture method)

將生長於 T-25 培養瓶內八、九分滿之生長細胞以 0.5 ml 之胰蛋 (0.05 % trypsin-EDTA) (Gibco/BRL)處理取下，轉換至乾淨 15 ml 離心試管，室溫下以 1000 rpm 離心 10 分鐘，然後取 0.3-0.5 ml 之細胞培養於 35mm 培養皿中的 22x22 mm 之蓋玻片上，數小時後待細胞已貼緊蓋玻片，加入 1-1.5 ml 完全培養液，隔夜觀察。視細胞生長情形而定(約七八分滿)於收穫前 20 分鐘加入 colcemid (0.1  $\mu$ g/ml) (Gibco/BRL)。細胞隨後收穫、固定並以 G-banding 方法染色，以便核型圖(Karyotype)之分析。其詳細步驟如下：

### Harvest

於培養皿內加入 1.5 ml 之低張液(0.0375 M 約 0.28 % KCl) (partial hypotonic solution)，室溫下靜置 5 分鐘，以滴管吸去培養皿內之上清液，並沿培養皿周圍緩慢加入 1.5 ml 之低張液(full hypotonic solution)，室溫下靜置 12 分鐘，後沿培養皿周圍緩慢加入 1.5 ml 之固定液(methanol : acetic acid = 3 : 1) (partial fixative solution)，室溫下靜置 10 分鐘，以滴管吸棄培養皿內之上清液，沿培養皿周圍緩慢加入

1.5 ml 之固定液(full fixative solution) , 室溫下靜置 10 分鐘。重複上一步驟三次後即可製片。

### **slide making**

於 hot plate 上準備一蒸汽盤 , 溫度維持在 50-55 °C , 取一載玻片 , 於上滴一滴封片膠 , 以鑷子輕輕挑起蓋玻片 , 於 tissue paper 上瀝至半乾 , 平放於載玻片上(細胞面朝上) , 將玻片置於蒸汽盤上至乾為止。

烘片於 slide warmer 上 56-60 °C , 24-48 hrs , 或依空氣中相對濕度(RH) 置於 95 °C 烘箱 30-45 min (30 min for 50 % RH, 40 min for 60 % RH, 45 min for 75 % RH)。

### **G-banding**

先行準備 0.3 % Wright's stock : 0.3 g Wright's (Sigma)溶於 100 ml methanol (Merck)中 , 置入暗色瓶在攪拌器上攪拌過夜 , 靜置數日後 , 以濾紙(125 mm)過濾於深色瓶中備用 另外準備 Gurr buffer (pH = 7.0, BDH)錠劑一顆溶於 1L ddH<sub>2</sub>O , trypsin-EDTA (0.05 % ) , Wright's dye working solution (1 ml Wright's stock + 4 ml Gurr buffer) , 新鮮配置 Wright's dye working solution 最好不要放置超過 5 min , 應依所染片數配染劑 , 每片約需 2-2.5 ml。首先將 aged (95 °C 烘箱 30-45 min)過之玻片以 trypsin-EDTA (0.05 % )作用(*in situ* culture method 製作的玻片

作用約 60 sec，而 suspension 所製作的玻片，其 trypsin 處理時間約 10 - 15 秒)。時間到後，以水沖洗殘餘之 trypsin，將水甩乾，玻片平放在染色盤上，覆蓋 Wright's dye working solution，染色約 60-80 sec (需試片)，用水沖掉染劑，待乾即可觀察。

### **C-banding**

準備一個內裝有 2X SSC [0.3 M (17.53g/L) NaCl + 0.03 M (8.82g/L) sodium citrate]之染缸放入 60 °C 水浴槽內，一個裝有 5 % Ba(OH)<sub>2</sub> (2.5 g Barium hydroxide 加入 50 ml ddH<sub>2</sub>O，攪拌均勻後以濾紙過濾)的染缸放入 50 °C 水浴槽內。首先將一有染色體、已先行在室溫下 aged 一個禮拜的玻片放入 0.2N HCl 之染缸內，室溫下作用一小時，之後取出玻片以 ddH<sub>2</sub>O 水洗一次，再放入內裝有 5 % Ba(OH)<sub>2</sub> 之染缸，50 °C 水浴槽內作用 10 分鐘，時間到後取出玻片以 ddH<sub>2</sub>O 儘量水洗乾淨 [勿殘留過多的 Ba(OH)<sub>2</sub> 在玻片上]，接著再放入 2X SSC 之染缸，於 60 °C 水浴槽內作用一小時。最後取出玻片以 ddH<sub>2</sub>O 清洗二次後風乾，覆蓋 Wright's dye working solution 染色 10-15 分鐘。(詳細流程請參閱 Dracopoli et al., 2001)

### **NOR-stain**

準備一有染色體的玻片(室溫下 aged 時間不要超過一星期)，2 % (w/v) gelatin (1 ml formic acid + 2 g gelatin + 99 ml ddH<sub>2</sub>O，加熱攪拌溶解，

室溫下存放於暗色瓶內 (一年), 50 % silver nitrate solution (5 g crystalline silver nitrate 溶於 10 ml ddH<sub>2</sub>O, 存放於暗色瓶內, 4 °C 下不要超過一年)及 3 % (v/v) acetic acid (3 ml 的 acetic acid 溶於 97 ml ddH<sub>2</sub>O)。在玻片上滴上 3 滴的 2 % gelatin 以及 4 滴 50 % silver nitrate solution, 蓋上蓋玻片在 65 °C 的 slide warmer 上加熱 2-4 分鐘(當玻片呈色為棕色狀態即可), 去除蓋玻片, 隨即將玻片放入 3 % acetic acid 中沖洗以終止銀染反應, 之後再以 ddH<sub>2</sub>O 沖洗乾淨, 風乾後以 Wright's dye (working solution) 染色 30 秒(可增減時間, 此步驟乃用以加強染色體形態, 方便觀察)。 (Dracopoli et al., 2001)

#### **B : 傳統 T-25 flask 培養法**

經培養於 flask 內之細胞數達 7、8 分滿時即可收穫, 於收穫前 2、3 小時加入 Colcemid (0.1 µg/ml) 首先將 flask 內之培養液吸至 15 ml 離心管, 接著加入 1 ml 的 0.05 % trypsin-EDTA 使細胞成懸浮狀後再吸取至 15 ml 離心管, 以 1000 rpm 離心 10 分鐘。吸去上清液, 只留 0.1~0.2 ml 與留在底部的細胞輕輕混合均勻, 加入 6 ml 之低張液(0.075 M 約 0.56 % KCl), 靜置 10 分鐘後先加數滴固定液再離心, 以 1000 rpm 離心 10 分鐘。去上清液, 將試管底部之細胞均勻拍散, 再加入 6 ml 固定液, 靜置 10 分鐘後離心。重複上一步驟三次。調整細胞濃度後製成玻片, 以應螢光原位雜交使用, 剩餘之細胞懸浮液, 存放於 -20 °C

冰箱。

### **C：細胞的貯存**

取一培養於 T-25 flask 約九分滿的細胞，吸出培養液，置於 15 ml 離心試管內，再以 HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution) (Gibco/BRL) 加入 flask 內中和殘餘的培養液，重複兩次。加入 0.5-1 ml 之 0.25 % trypsin (Gibco/BRL) 於 flask 內，置於 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培養箱中，靜置 5-10 分鐘不等，視細胞 trypsinization 的情況而定。再將 15 ml 離心試管內之培養液倒入 flask 中以終止 trypsin 的反應。均勻混合後將細胞混合液吸出置於離心管，1000 rpm 離心十分鐘。吸出上清液，輕輕拍打離心管壁外緣，確定 pellet 均勻拍散，再慢慢地沿著管壁內緣加入終濃度為 10 % 之 glycerol 20 % fetal bovine serum 培養液(1 ml glycerol + 2 ml fetal bovine serum + 7 ml DMEM)，輕輕混合均勻後，再放入 Cryogenic vials (Nalgene cryoware)。先存放於 -80 °C，隔夜後再放到液態氮的貯存桶內。

### **D：凍存細胞的再培養**

自液態氮桶內取出之細胞小管迅速丟入 37 °C 的水中使其快速解凍，取出已解凍之細胞放入 15 ml 離心試管內，加入 3 ml 含 10 % 血清之完全培養液，以 1000 rpm 離心 10 分鐘，去除上清液後加入 3-5 ml

之完全培養液(10 % fetal bovine serum + 1 % glutamine + 1 % penicillin-streptomycin-neomycin)與細胞均勻混合，置放於 T-25 flask 內，培養於 37 °C、5 % CO<sub>2</sub> 之培養箱中。

### 三、基因組 DNA 的抽取

將建立好之台灣山羌的纖維母細胞培養於完全培養基中，以一個 T-25 培養瓶為例：細胞十分滿時先以 1 ml 1X DPBS (Dulbecc's phosphate Buffered Saline) (Hyclone)洗滌兩次，接著加入 1 ml Lysis buffer (20 mM Tris HCL pH 8.0, 100 mM NaCl, 100 mM EDTA pH 8.0, 1 % SDS)再加 10 µl proteinase K (20 mg/ml)及 5µl trypsin (2µg/ml)。

在 37 °C 培養箱作用三小時後，將 flask 內溶解的細胞刮下放至 15 ml 離心試管，以 1 ml ddH<sub>2</sub>O 及 20 µl 5M NaCl 混合稀釋。再以等體積的 phenol/chloroform (1:1)萃取基因組 DNA 三次，之後加入 1/20 體積(含 DNA 溶液的體積)的 8 M NH<sub>4</sub>OAc 及 2-2.5 倍體積的 95 % 酒精並充分混合，以沉澱析出大分子的 DNA。此時可見纖維狀的大分子 DNA，用 yellow tip 將其撈出、放至 1.5 ml 離心管中，以 70 % 的酒精洗滌後，陰乾，溶於 TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH8.0)。若不見纖維狀的大分子 DNA，則將 DNA、鹽、酒精的混合物放至 -20 °C or -80 °C 的冰箱中，靜置 3 小時以上，再以 4500 rpm 在 4 °C 離心 30 min，離心後的 DNA pellet 再用 70 % 的酒精洗

滌，陰乾，溶於 TE buffer。

#### 四、PCR 反應及 DNA 的純化

每一 25  $\mu$ l 反應總體積含 genomic DNA template 100 ng , 200 nM 的 DNA 引子(primer) [擴大衛星(sat)I DNA 單元體所用的引子是根據中國山羌的 sat I DNA( C<sub>5</sub> )所設計(forward: 5'-ACC AGA AAC AGC TTC GTG-3' ; reverse: 5'-GGT TAT ATT CTC GAG TTA ACG-3') , 而擴大 sat II DNA 單元體的引子是根據白尾鹿 ( ODII ) 所設計(forward: 5'-GAG CTG CCT GAC AGA CTC G-3' ; reverse: 5'-CAG AGC CGA CCT AGG ATC AC-3')] , 200  $\mu$ M dNTPs , 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> , 1X *Taq* buffer (10 mM Tris-HCl pH 9.0 , 50 mM KCl , 0.1 % Triton X-100) , 2.5 units *Taq* DNA polymerase (Promega) , 混合後上面覆蓋 parafin oil , 在 Perkin Elmer 2400 的機器中以下列條件進行衛星 DNA 單元體的擴大：衛星 I (94 °C 5 min. ; 94 °C 30 sec. , 44 °C 30 sec. , 72 °C 1 min. 30 cycles ; 72 °C 10 min.) , sat II (94 °C 5 min. ; 94 °C 30 sec. , 50 °C 30 sec. , 72 °C 1 min. 30 cycles ; 72 °C 10 min.)。以 1-1.5 % 洋菜膠(agarose gel)在 1X TAE buffer 下電泳分離 PCR 得到的 DNA , 接著以 ethidium bromide 將 DNA 染色 , 在紫外燈光譜儀(波長 256 nm)照射下 , 切割下適當大小的 satellite I 或 II 的 PCR 片段 , 再利用(Gel Extraction Kit /150, GIAEX

II, Qiagen)將 DNA 從洋菜膠中回收。

## 五、電壓穿孔導法

將回收的 DNA 片段(insert)與載體 pGEM-T easy vector (Promega)以約 5:1 的分子數比，利用 T4 DNA ligase (Promega)在 4 °C 下作聯結反應 (ligation)隔夜。取 1 µl 的接合反應溶液至 XL1-Blue competent cells 中，輕輕混合均勻後，放入 0.2 cm 的 pulser<sup>Tm</sup> cuvette，設定 BIO-RAD Gene pulser 的條件如下：電阻 200 OHMS，電壓 2.5 V，電容 25 µFD，接著將 cuvette 放入 Gene pulser chamber 內，壓上 pulse 按鈕(約 4.7 秒反應時間)，迅速將 cuvette 取出置於冰筒上，加入 800 µl 內含 10 mM MgCl<sub>2</sub> 及 20 mM glucose 的 LB 培養液中，混合均勻後，放入培養試管中，於 37 °C 培養箱中以 200 rpm 旋轉培養二小時，之後取出 50 µl 100 µl、150 µl、200 µl 的轉殖細菌培養液分別塗在事先已塗好 70 µl X-Gal (20 mg/ml)及 20 µl isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) (20 %)之 90 mm LB agar plate (含 ampicillin 100 µg/ml)上，置於 37 °C 培養箱中培養約 16 小時。第二天，挑選白色(無色)的菌落在 2 ml 的 LB 培養液(含 ampicillin 100 µg/ml)中在 37 °C、200 rpm 旋轉培養箱中培養 3-4 小時(或培養液呈現雲絲狀)，倒入 1.5 ml 小離心管內(殘餘的菌液留置 4 °C 冰箱)，抽質體 DNA，以限制切割確定

含質體之插入 DNA 片段是否正確，然後選取含有正確插入片段大小之菌株，培養單一菌落，再以隨機選取方式挑出單一菌落置入 7 ml 的 LB 培養液中(Ampicilin 100  $\mu$ g/ml)大量培養，經由套組(QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen)純化質體 DNA。同樣以限制 DNA 是否正確，正確則儲存此一菌株在 15 % glycerol/85 % LB/Ap 中，並保存在-80 °C 作長期保存。

#### **Competent cells 的製備：**

取 7  $\mu$ l XL1-Blue 菌液(15 % glycerol stock)加到 7 ml 不含抗生素 LB 培養液中，以 37 °C、200 rpm 培養至隔天，取 200  $\mu$ l 的培養菌液加到 10 ml 的 LB 培養液內，37 °C 培養約 3-4 小時，取 1 ml 菌液測 OD<sub>600</sub> 吸收值為 0.5-0.6 左右時方可。立即將菌液置放在冰筒上 15 分鐘，以離心機於 4 °C、4500 rpm 離心 10 分鐘。倒掉上層液，並將細菌輕輕拍散，接著以等量、1/2、1/5 之冰的無菌 ddH<sub>2</sub>O 清洗，4500 rpm、4 °C 離心 10 分鐘，最後去除上層液、並且以冰的 ddH<sub>2</sub>O 調整菌液濃度為原體積 1/20 後與同體積之 20 % glycerol 均勻混合(glycerol 最終體積濃度為 10 %)，分裝 60  $\mu$ l 的 competent cell 懸浮液到 1.5 ml 離心管，標示好日期及菌種，存放於 -80 °C 冰箱

## 六、DNA 定序(DNA sequencing)

取 500 ng 含 satellite DNA 的質體(sat-I 0.6 kb, 1.5 kb; sat 1 kb)及 10 pmole 的 M13 (M13 forward, reverse 各一), 使用套組 dideoxy chain termination kit (United States Biochemical)作用, 自動定序儀 Perkin-Elmer ABI DNA sequencer (model 377)判讀序列。

## 七、南方點漬法 Southern blot analysis

取 genomic DNA 21  $\mu\text{g}$  以 ddH<sub>2</sub>O 調整其濃度為 20 ng/ $\mu\text{l}$ , 每個限制 於 0  $\mu\text{l}$  反應溶液中加入 3  $\mu\text{g}$  的 genomic DNA (150  $\mu\text{l}$ ), 並分別加入六種 限制酶 (*Not*I, *Bam*HI, *Eco*RI, *Nco*I, *Pst*I, *Pvu*II) (New England BioLab) 150 U, 10X 緩衝溶液 50 $\mu\text{l}$  (緩衝溶液中鹽濃度視各種不同), 5  $\mu\text{l}$  的 BSA (10 mg/ml), 反應溶液上覆蓋數滴 parafin oil, 分別於各個不同限制用 16 小時。將作用完全之反應溶液吸掉 oil, 分別以等量之 chloroform, phenol/chloroform (1:1)及 chloroform 各萃取一次, 在室溫下以 13000 rpm 離心 10 分鐘, 取上清液加入 1/10 體積之 3M NaOAc 及 0.7-0.8 倍體積之 2-propanol 沉澱 DNA, 以 70 % 酒精洗去多餘的鹽類, 乾燥後, 將 DNA 溶於 15  $\mu\text{l}$  TE buffer (pH 8.0)。接著以 0.8 % 洋菜膠在 30 伏特的電壓下分離 4 小時, 再以 45 伏特

的電壓分離 3 小時，接著在兩邊電泳槽加入 ethidium bromide, 100 伏特 10 分鐘，收下洋菜膠，放在紫外燈光譜儀下，以投影片將 marker 位置記錄下來，並拍照存檔。接著以 0.25 N HCl 處理洋菜膠 2.5 分鐘，使 DNA 產生去嘌呤作用(depuration)。再以 0.5 N NaOH/1.5 M NaCl, 作用 15 分鐘兩次，使 DNA 變性，最後用 0.5 M Tris (pH 8.0)/2.5 M NaCl 15 分鐘兩次來中和膠體。接著以 20X SSC 將洋菜膠中的變性 DNA 轉移至 nylon membrane (Bodyne) 上。以 UV-256 nm ( $0.150 \text{ J/cm}^2$ )照射 membrane，使 DNA 和 membrane 產生 cross-link，再用 6X SSC 潤濕 membrane 後，將 membrane 置於含 sonicated salmon sperm DNA (100  $\mu\text{g/ml}$ )的 pre-hybridization (5M NaCl, 500 mM EDTA, 1 M Tris-HCl pH 8.0, 50X Denhardt's solution, 10 % SDS, yeast RNA, 100  $\mu\text{g/ml}$  sonicated salmon testis DNA)配方溶液中，在 56°C 下作用三小時以上。DNA probe 則是經選殖、純化過之 satellite DNA clone (包括 sat 1.5 kb, sat 1kb, 及 CM 0.7)以 Nick translation system kit (Gibco/BRL)和  $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -dCTP 標定(lable)。標定完成後，以 1 ml 的 Sephadex G-50 colume 分離探針及多餘游離的放射線同位素。Colume 的製作過程如下：以 1 ml 的針筒填上 0.2 cm 厚之矽化玻璃棉(siliconized glass wood)，再填上經 TE buffer (pH 8.0)處理過的 Sephadex G50 樹脂，

1 ml 的刻度，將針筒置於離心機(Himacentrifuge, Hitachi)以 1000 rpm 離心 30 秒，以充填高度約在 0.9-1 ml 左右之 Sephadex G50 column，再將已完成 Nick translation 之 probe 溶液經由 column 以 1000 rpm 離心 1 分鐘，取下過濾液(含標定好的探針)。以 95 °C，5 分鐘將探針變性，然後將變性的探針加入 prehybridization solution 中。雜交反應在 56 °C 下作用 16-20 小時。雜交反應後清洗非專一性鍵結的探針步驟如下：首先 wash solution (0.1X SSC/0.4 % SDS)預熱於 50 °C 之水浴槽內，將雜交液倒至輻射線回收瓶內，取出 membrane 放置於容器盒中，再以預熱之 wash solution 適量倒到容器內，在 50 °C 搖盪之水浴槽內清洗數次，每次 5-10 分鐘，直到背景值小於 2-5 cps (counts per second)或訊號/雜訊 10，將 membrane 放在 3MM 紙上，並置於通風櫥中使其乾燥後再以 X-ray film (BIOMAX-MS, Kodark)壓片、顯影。

## 八、螢光原位雜交(Fluorescence *in-situ* hybridization) (Li et al., 2000)

### Chromosome preparation

染色體的製備是來自已建立的台灣山羌組織細胞，經 colcemid 處理後以懸浮液狀態貯存於-20 °C 冰箱。爾後，於實驗所需時事先將染色體製備成玻片，再經烘烤處理(烘烤的時間會間接影響雜交

的反應)。標準染色體收穫及固定的流程如下：當 T-25 的 flask 中細胞數量達八分滿時，於 harvesting 前 2-3 小時，加入 colcemid (0.1 µg/ml 到培養瓶內，再放入 37 °C 5 % CO<sub>2</sub> 培養箱中，靜待 colcemid 的作用。將細胞 (0.05 % trypsin-EDTA) 0.5 ml 處理取下，再轉換至乾淨的 15 ml 離心試管，於室溫下以 1000 rpm 離心十分鐘 吸掉上清液，將 pellet 均勻拍散，加入 10 ml 的低張液 (0.075 M KCl, 約 0.56 %)，室溫下作用十分鐘。離心前加入 2-3 滴 fix solution (Methanol : Acetic acid = 3:1)，均勻混合後於室溫下以 1000 rpm 離心十分鐘。吸掉上清液，將 pellet 均勻拍散，緩慢加入冰凍過之 fix solution，一面拍打，一面加入，直到加至 10 ml 滿，混合均勻後，置放在冰筒上十分鐘，再次於室溫下以 1000 rpm 離心十分鐘。再重複此步驟兩次。加入適量之 fix solution，使細胞處在懸浮狀態，貯存於 -20 °C，噴片前至少存放 16 小時。(於此狀態存放之細胞懸浮液，保存可長達一年)

### **DNA probe labeling by nick translation**

衛星 DNA 探針的製備是利用已選殖成功之台灣山羌著絲點衛星 DNA [sat I DNA (1.5 kb), sat DNA 1 kb] 及中國山羌著絲點 sat I DNA (C5; Lin et al., 1991), 中國山羌著絲點 sat II DNA (0.7kb)。經過 nick translation 標定上 biotin 或者 digoxigenin，之後再與台灣山

羌細胞懸浮液所製成含有染色體的玻片進行螢光原位雜交反應。

其反應步驟如下：經選殖、純化過之質體 DNA 依其濃度取量約

500 ng，加入以下所列之其他 reagents：

10x NT buffer	2.5 $\mu$ l
dNTP mix (0.5 mM A, C, G)	1.9 $\mu$ l
biotin-16-dUTP*	0.7 $\mu$ l
DNase I (diluted)	1.0 $\mu$ l
DNA polymerase I (5U/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l

\*如果標定其他之 nucleotides (e.g., DIG-11-dUTP)則使用 5:1 dNTP

培養在 SC (T)-2 sample cooler (Boeco) 15 °C，75 分。確認 DNA

片段大小介於 200 bp-600 bp, 加入 1/10 DNA 體積的 0.5 M EDTA

到已完成標定的 DNA 混合液內，混合均勻後培養在 65 °C、10

分鐘，加入 1/10 DNA 混合液體積的 3M NaOAC (pH 5.2)及 2.5

倍混合液體積的 95 %-100 % ethanol 與之混合均勻，在 -20 °C 下

沉澱 DNA (至少 6 小時，經常是隔夜)。以 13000 rpm、4 °C 離心

10 分鐘。吸掉上清液，加入 70 % ethanol 洗去 DNA pellet 多餘

的鹽類。室溫下，以 13000 rpm 離心 10 分鐘。吸掉上清液，將

DNA pellet 置放於 40-50 °C 之 heat block，使其乾燥，將 DNA

pellet 溶於約 15 $\mu$ l 之 Fluorescence in-situ hybridization

(FISH)buffer。

## **Solution**

### 10X NT buffer:

1 M Tris HCl (pH 7.5)	500 $\mu$ l ( $C_f = 0.5$ M)
1 M MgSO <sub>4</sub>	100 $\mu$ l ( $C_f = 0.1$ M)
1 M DTT	1 $\mu$ l ( $C_f = 1$ mM)
BSA	50 $\mu$ l ( $C_f = 0.5$ mg/ml)
Sterile ddH <sub>2</sub> O	349 $\mu$ l
<hr/>	
Total	1 ml

### FISH hybridization buffer:

Deionized formamide	25.0 ml ( $C_f = 56\%$ )
50 % dextran sulphate	10.0 ml ( $C_f = \sim 11\%$ )
20X SSC	5.0 ml ( $C_f = \sim 2\%$ )
0.5 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.3 ml ( $C_f = 0.03$ M)
0.5 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.7 ml ( $C_f = 0.02$ M)
50 X Denhardt's solution	1.0 ml ( $C_f = \sim 1$ x)
<hr/>	
Total	45.0 ml

### dNTP mix (0.5mM A, C, G):

100 mM dATP	2.5 $\mu$ l ( $C_f = 0.5$ mM)
100 mM dCTP	2.5 $\mu$ l ( $C_f = 0.5$ mM)
100 mM dGTP	2.5 $\mu$ l ( $C_f = 0.5$ mM)
1 M Tris-HCl	250.0 $\mu$ l ( $C_f = 0.5$ M)
Sterile ddH <sub>2</sub> O	242.5 $\mu$ l
<hr/>	
Total	500.0 $\mu$ l

### DNase I (Sigma):

DNase (10 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
-----------------------	-----------

Sterile ddH <sub>2</sub> O	999 µl
<hr/>	
Total	1 ml

5:1 dNTP mix:

100 mM dATP (C <sub>f</sub> = 0.5 mM)	2.5 µl (C <sub>f</sub> = 0.5 mM)
100 mM dCTP (C <sub>f</sub> = 0.5 mM)	2.5 µl (C <sub>f</sub> = 0.5 mM)
100 mM dGTP (C <sub>f</sub> = 0.5 mM)	2.5 µl (C <sub>f</sub> = 0.5 mM)
100 mM dTTP (C <sub>f</sub> = 0.5 mM)	2.5 µl (C <sub>f</sub> = 0.5 mM)
1M Tris-HCl (PH 7.5)	250.0 µl (C <sub>f</sub> = 0.5 M)
Sterile ddH <sub>2</sub> O	242.0 µl
<hr/>	
Total	500.0 µl

3 M sodium acetate (pH 5.2):

Sodium acetate•3H <sub>2</sub> O	40.8 g
ddH <sub>2</sub> O	80.0 ml

Adjust pH to 5.2 with glacial acetic acid and then adjust the final volume to 100 ml.

Autoclave and store at room temperature for up to 6 months.

0.5 M EDTA:

disodium ethylene-diaminetetraacetate•2H <sub>2</sub> O	18.61 g
ddH <sub>2</sub> O	80.00 ml

Stir vigorously with a magnetic stirrer and adjust pH to 8.0 with ~2 g of NaOH pellets.

(Note: EDTA will not dissolve completely until pH ~ 8.0)

Add H<sub>2</sub>O to adjust the final volume to 100 ml.

Autoclave and store at room temperature for up to 6 months.

## Probe hybridization

預先將已製作好有染色體的玻片於 60-65 °C 之 slide warmer 上烘烤 3 小時，然後放在室溫下 2 天。雜交反應前，先行脫水步驟，其流程如下：於 -20 °C 冰凍的 70 % ethanol 兩次及 95 % ethanol 一次，室溫下 95 % ethanol 一次，每一次 2 分鐘，最後於室溫下 air dry。接著取 1 µl 已標定之探針加上 15 µl 之 FISH hybridization buffer (均勻混合)，放在 75 °C 之 water bath 10 分鐘使變性，於冰筒上靜置 3-5 分鐘。再將已變性之探針滴在有染色體之玻片上，蓋上蓋玻片，以 rubber cement 封住四周圍，待膠略乾後，再將 probe/slide 放在 75 °C slide warmer 上變性 2 分鐘(可增減)。準備一外包錫箔紙的 140 mm 有蓋培養皿，使呈暗視野狀態，內置濕紙巾，保持濕潤狀態，再將 slide 置放於內，四周圍以 parafilm 封緊，放在 37 °C 培養箱，作用至少 16 小時。

## Solution

### 20X SSC:

NaCl	175.3 g
Sodium citrate	88.2 g
ddH <sub>2</sub> O	800.0 ml

Adjust pH to 7.0 with a few drops of 10N NaOH.

Add enough ddH<sub>2</sub>O to adjust final volume to 1 L.

Autoclave and store at room temperature.

## Signal detection

預熱 FISH wash solution (50 % formamide/2X SSC) 染缸兩個，2X SSC 染缸兩個於 45 °C 水浴槽內，4XT (4X SSC/0.05 % Tween 20) 染缸一個於 37 °C 水浴槽內。將雜交反應完成之玻片上的蓋玻片去除，接著將玻片浸泡於 FISH wash solution, 5 分鐘(於此時間內，僅需攪動玻片 1-2 次)。將玻片轉換至第二個 FISH wash solution, 5 分鐘。然後再將玻片轉換至 2X SSC, 5 分鐘(共兩次)。最後將玻片轉換至含有 4XT solution 之染缸在 37 °C 下作用 20 分鐘。在 4XT 作用期間內，準備好抗體溶液。例如：anti-dig-FITC-稀釋在 4XT (1:200)，而 cy3-avidin 則稀釋在 4XT (1:400)。將玻片從 4XT 中移出，輕輕地拭去多餘液體，取 100 µl 的抗體加到玻片上，蓋上蓋玻片，放在 humid chamber 內，於 37 °C 培養箱中，作用 30 分鐘。於玻片與抗體作用期間，預備三個裝有 4XT 溶液之染缸於 37 °C 水浴槽內預熱。將非專一性結合之多餘抗體於 37 °C、4XT 溶液中洗淨，共 3 次，每次 5 分鐘。依照個別需求，給予多層次抗體反應(100 µl/slide)，然後滴上 10 µl DAPI-containing Vectashield mounting solution，蓋上 24x50 mm 的蓋玻片，於室溫下靜置 2 分鐘，使得 DAPI 的反應更完全，釋出多餘的 mounting solution，四周以透明膠封住，避免片子乾掉。將玻片存放於暗視

野的-20 °C 冰箱中。螢光反應結果之分析，是透過配備有適當的濾片組合及 cooled charge-coupled device (CCD)照相系統

(Photometrics KAF 1400)來處理，其分析軟體則使用 MacProbe v4.0 (Perceptive Scientific Instruments)。

### **Solution**

#### 2X SSC:

20X SSC	100 ml
ddH <sub>2</sub> O	900 ml
<hr/>	
Total	1000 ml

#### 4XT:

20X SSC	200 ml (C <sub>f</sub> = 4X)
ddH <sub>2</sub> O	800 ml (C <sub>f</sub> = 0.005 %)
Tween 20	500 µl
<hr/>	
Total	1 L

Store all solutions (2X SSC, 4XT) at room tempture for up to 1 month.

#### FISH wash solution:

Formamide	50 ml (C <sub>f</sub> = 50 %)
20X SSC	10 ml (C <sub>f</sub> = 2X)
ddH <sub>2</sub> O	40 ml
<hr/>	
Total	100 ml

Store at 4° C and protected from light for up to 3 months.

FISH wash solution can be reused up to 5 times and then discarded.

## 結果

### 台灣山羌核型圖

從雌雄各一的台灣山羌，各分析 20 個 G-band metaphase spreads 的結果確定台灣山羌的染色體數目為  $2n = 46$ ，其染色體編號的排列是參照 Yang et al.(1995)以增強 DAPI 帶狀的染色體組型(Idiogram)而定。所有的染色體形態皆為 telocentric/acrocentric，性染色體(sex chromosome)中 X chromosome 也為 telocentric，而 Y chromosome 則是 acrocentric/submetacentric。台灣山羌有三對大的體染色體，分別為第一、二和三對染色體，第四對體染色體的長度和 X 染色體相似。Y 染色體是所有染色體中最小的，個別的染色體有其特定之 G-banding 型態，因而可以將每個染色體分別辨識出來。由此可建立完整之台灣山羌雌、雄 G-banding 核型(圖一及圖二)，至於每條染色體上之帶狀大小，多少之分佈而建立之 Idiogram 是根據雄性台灣山羌之 G-banding 而定(圖三)。進一步由 constitutive heterochromatin banding (C-banding)對 centromeric heterochromatin 的位置作較精確的鑑定，發現所有的 heterochromatin 部位除了 Y 染色體外，都在染色體之一端，證明這些染色體都是 telocentric (圖四)，而且 heterochromatin 的多寡在染色體之間也有相當大的差異，例如 1-3 號染色體擁有較少量的異質染色質，而 X 染色體就擁有比較大量的 heterochromatin。另外還利

用鍍銀染色法鑑定 NOR (Nucleolar Organizer Region)所在之處(此處乃 ribosomal RNA 基因的位置所在)，發現台灣山羌第一對染色體之 secondary constriction 的位置上有一個 NOR，另外還有一個 NOR 位於第五對染色體長臂之末端(圖五)。

### 台灣山羌著絲點衛星 DNA 的選殖及序列的比對

使用中國山羌衛星 I DNA (C5)的序列來設計引子(primer)，藉由 PCR 擴增放大的方法所選殖得到的台灣山羌重複序列 DNA，總長度 1391 bp 其中 GC content 為 52.7%，在序列比對方面有 82%相同於中國山羌著絲點衛星 I DNA clone (C5) (Lin et al., 1991) (圖六)，因而將其稱為台灣山羌衛星 I DNA (FM sat I)。利用 white tailed deer 的衛星 II DNA (OvDII)序列為 primer 另外從台灣山羌基因組 DNA 中所選殖出來的 1 kb 重複序列 DNA，其總長度為 1103 bp 其中 GC content 為 43.6%，在透過與基因庫的序列比對結果，發現沒有任何已登錄之鹿科物種的序列與其相似，只有與最近(Li et al., unpublished)篩選自中國山羌的著絲點 DNA(CM 1 kb)在比對下發現有非常高的相似性(98%)，故而將此 1 kb 的 DNA 稱為台灣山羌著絲點衛星 DNA (FM 1 kb) (圖七)，且經由下列實驗進一步證明這二個重複序列的 DNA clones (FM sat I 及 FM 1 kb)也為著絲點衛星 DNA。

## 南方點漬法的雜交反應

將選殖出來的台灣山羌著絲點 I DNA (FM sat I)及另一種新的著絲點 DNA (FM 1kb)做為探針與經六種 (*pa* I, *Bam* HI, *Eco* RI, *Nco* I, *Pst* I, *Pvu* II)切割的台灣山羌基因組 DNA 進行雜交反應，其中 FM sat I DNA 在基因組中之排列形態，很明顯的可以看出，六種不同的限制當 (*pa* HI, *Eco* RI, *Pst* I 及 *Pvu* II)表現出非常明顯的約 0.75-0.8 kb 大小的片段，且以規則性的梯狀形態排列如圖八 A，因此更進一步證實台灣山羌之 FM sat I 是屬於衛星 DNA。而 FM 1 kb DNA 與經不同限制切割的台灣山羌結果，顯示在基因組中之排列形態，似乎沒有規則性的排列順序如圖八 B，至於其相關的特性則有待進一步的分析。而為了解衛星 II DNA 在台灣山羌基因組中的表現形態，於是選擇與台灣山羌較接近的物種中國山羌，藉由已選殖的中國山羌衛星 II DNA (CM 0.7) (Li et al., unpublished)，經過  $^{32}\text{P}$  標定後再與台灣山羌基因組 DNA 進行雜交反應，藉以了解衛星 II DNA，在基因組中可能會呈現的排列型態，結果顯示衛星 II DNA (CM 0.7)在台灣山羌基因組中是以一規則性 0.75kb 的單元體重複排列，此種情形顯示在經由 *Apa* I, *Nco* I 及 *Pvu* II 等三種限制切割下的基因組南 DNA (CM 0.7)在其他三種限制切割的基因組

合排列(圖八 C)。也因為觀察了衛星 II DNA (CM 0.7)在台灣山羌基因組中的排列形態，因此想進一步探討這個與台灣山羌相當接近的物種，其各類的衛星 DNA 在基因組中是否與台灣山羌也有類似相同的現象。於是進一步同樣(*Apa* I, *Bam* HI, *Eco* RI, *Nco* I, *Pst* I, *Pvu* II)對中國山羌的基因組 DNA 作切割轉印後，再與中國山羌衛星 I DNA (C5) (圖九 A), CM 1kb (Li et al, unpublished) (圖九 B), 及衛星 II DNA (CM 0.7) (圖九 C)經標定上  $^{32}\text{P}$  後進行雜交反應，結果顯示台灣山羌與中國山羌各自的衛星系列 DNA 都呈現出極為高度的相同性。

## 著絲點衛星 DNA 在台灣山羌染色體上的分佈

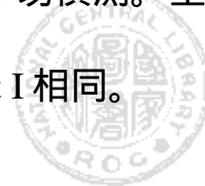
### 1. sat I 與 sat II 在台灣山羌染色體分佈情形的比較

為了解 sat I DNA 及 sat II DNA 在台灣山羌染色體上分佈之位置，因此同時以標定 biotin 的 sat I DNA (FM sat I) (用紅色螢光的 avidin 偵測)及標定 digoxigenin 的 sat II DNA (CM 0.7) (用綠色螢光的 anti-digoxigenin 抗體偵測)與台灣山羌染色體進行螢光原位雜交反應(圖十、十一)，顯示 sat I 在所有染色體的著絲點都有訊號，除了第 3 號染色體以及 Y 染色體沒有訊號之外。而台灣山羌的第 1 號、2 號和 3 號染色體臂上，分別有兩處 interstitial 雜交訊號，還有三對較小的

體染色體，每條染色體臂上也各有一處 interstitial 雜交訊號。至於 sat II DNA 在台灣山羌所有的染色體著絲點都有訊號，只有 Y 染色體沒有訊號。而 sat II DNA 在第一號、第二號及其他較小的兩對體染色體還有 X 染色體的染色體臂上，也都各有一個訊號反應。觀察兩者訊號在染色體著絲點上的排列次序，sat II DNA 比起 sat I DNA 顯然是較接近短臂染色體末端處(sat I-sat II-telomere)。

## 2. FM sat I 與 FM 1 kb 在台灣山羌染色體上的分佈

當同時以標定 biotin 的 sat I DNA (FM sat I)及標定 digoxigenin 的 sat DNA (FM 1kb)與台灣山羌的染色體進行螢光原位雜交反應(圖十二、十三)，觀察這二種 sat DNA 分佈的位置，FM sat I 在所有染色體的著絲點，除了第 3 號及 Y 染色體沒有訊號反應之外，其餘染色體的著絲點區域都有訊號，而 FM 1kb 也是第 3 號及 Y 染色體沒有訊號反應以外，其餘所有染色體的著絲點區域都有此訊號，但是第二號染色體著絲點的 FM 1kb 訊號有時相當微弱，不易偵測。至於 FM 1kb 在染色體臂上 interstitial 的訊號也是與 FM sat I 相同。



## 討論

初步對台灣山羌外觀形態的了解，獲知台灣山羌的毛色較暗，此與毛色較淺的中國山羌略為不同(Nowak et al., 1991 ; Whitehead, 1993 ; Don et al., 1993) , 儘管在傳統上常常利用形態上的一些特質對於物種加以分類，然而其結果依舊是不夠完善的，只能說應用形態學(morphology) , 古生物學(paleontology)及生態學(ecology) , 讓我們對於物種演化的一些共通路徑較容易了解，且有跡可循。因此在本研究中，我們透過細胞遺傳及分子生物學的觀點對台灣山羌所進行的分析，使我們對台灣山羌在演化上所具有的一些特性略有所解。

### 台灣山羌與中國山羌核型的比較

台灣山羌的 G-banding 核型和中國山羌的 DAPI banding 核型大體上相當接近，但是由 G-banding 的分析，發現大多數台灣山羌的染色體上其 band 的數目比中國山羌的 DAPI band 多，換句話說，在染色體某處看到一條明顯的 DAPI positive band，該 band 在 G-banding 的分析上，可能分析為二條 band，因此如果能和中國山羌的 G-banding 核型作比較，則這兩個亞種的核型相似度可能更高，至於 C-banding 和 NOR 分析結果，發現台灣山羌和中國山羌的 C-band pattern 和 NOR 的數目與分佈完全相同(Shi et al., 1980)。

## 衛星 DNA 家族在台灣山羌與中國山羌之染色體上的分佈

台灣山羌的 satellite I DNA (FM sat I)與中國山羌 satellite I DNA (C5)其 DNA 序列的相同度為 82 %，並沒有出乎我們的預料，因為畢竟這兩種山羌分別屬兩個不同的亞種，如果是同種，由於 satellite I DNA 已知其 DNA 序列的結構為一種 high order organization 及 concerted evolution 的結果(Dover, 1986), 其 monomer 相同度可達 95 % 以上(Lee et al., 1997)。換言之，因為皆為亞種的關係，其 DNA 序列的相同度當然有可能為 82 %。

台灣山羌的 sat I DNA 在其染色體上之分佈位置和中國山羌的 sat I DNA 在染色體上之分佈位置(Li et al., 2000b)大致相同，由於其 satellite DNA 序列相同性很高，所以得到 FISH 的結果也是可預測得到的。而較遺憾的是未能成功地自台灣山羌基因組中選殖 satellite II DNA，因此有關 satellite II DNA 在台灣山羌染色體上分佈情形的探討，只有透過與其最相近的物種中國山羌的 sat II DNA (CM 0.7)與台灣山羌染色體的螢光原位雜交反應，從而推敲其可能的結果。顯然從 sat II DNA 在台灣山羌與中國山羌染色體上呈現相同的分佈位置(Li et al., 2000b)，證實這兩物種之間確有相當高的相似性。

## FM 1 kb 是否為新發現的著絲點衛星 DNA ?

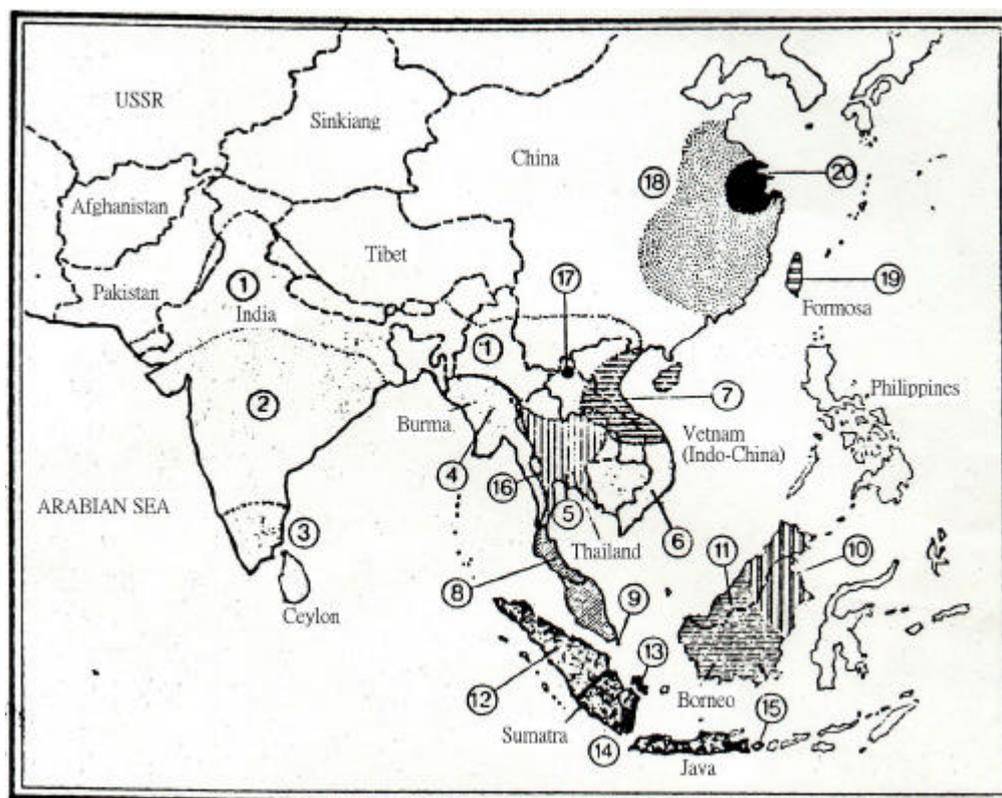
台灣山羌的 FM 1 kb 衛星 DNA clone 是根據白尾鹿(OvDII)設計

的引子序列，由 PCR 擴增程序得到的 DNA 片段再做增殖而來的，且由於 FM 1 kb 分佈的位置是在染色體之著絲點上，雖然南方點漬法的分析中，以目前所採用的六種限制並如用其他的限制來做得梯形翻列的片，因此機會 FM 1 kb 的 DNA 暫定為著絲點衛星 DNA。由於其序列和已知的鹿科的衛星 DNA 都不相同，因此猜測可能是另一種新的鹿科著絲點 DNA，而目前已知鹿科有三種衛星 DNA，如 cervid satellite I, II 和 III DNA，由於這個新的 1 kb satellite DNA 的發現，顯示可能有其他 satellite DNA 尚未被發現。就我們對台灣山羌 FM 1 kb 與 FM sat I DNA 在染色體之分佈情形的觀察，不論是在著絲點或者是染色體臂上 interstitial 的雜交訊號反應都極為相似，只有第二對染色體上 FM 1 kb 出現在著絲點的反應訊號明顯比 FM sat I DNA 微弱，有時甚至是沒有訊號，顯示此處之衛星 DNA 數量(copy number)較少，而觀察兩者在著絲點上的相對位置，FM 1 kb 比起 FM sat I 顯然是較接近染色體的末端，然而二者之間其實是非常的靠近，關於這一點將來也許可用 fiber FISH 的方法 (Li et al., 2000a)來證實兩者之間的組織相關性。而分析 FM 1 kb 與衛星 II DNA (CM 0.7)的原位雜交反應結果，雖然是以同樣的引子(OvDII)選殖而來的，但是這兩種 sat DNA 在染色體上之分佈位置，卻是不大相同(圖十四)，如著絲點上的訊號反

應，第三號染色體沒有 FM 1 kb 的訊號，卻有衛星 II DNA 的訊號。觀察染色體臂上 interstitial 雜交的訊號，FM 1 kb 出現在第 1 號、2 號及 3 號染色體個別有兩處訊號，其餘則有三對較小的體染色體，每條染色體上都有一處訊號。而衛星 II DNA 只有在第 1 和第 2 對染色體及其他兩對較小的體染色體臂上各有一個雜交訊號。因此，對於 FM 1 kb 相關特性的了解，只有再進一步的研究探討。

綜合以上對台灣山羌核型和著絲點衛星 DNA 分析得到的結果，顯示台灣山羌與中國山羌在分類上被列為二個不同的亞種是相當合理的，而經由本次研究所獲得的資料，也希望對將來從事鹿類 DNA 和核型演化有興趣的工作者有所幫助。

表一：羌屬(*Munticus*)在亞洲的分佈。



**MUNTJAC. *Muntiacus muntjak***

- |                              |                                    |
|------------------------------|------------------------------------|
| 1. <i>M. m. vaginalis</i>    | Northern India to south-west China |
| 2. <i>M. m. aureus</i>       | Peninsular India                   |
| 3. <i>M. m. malabaricus</i>  | Southern India and Ceylon          |
| 4. <i>M. m. grandicornis</i> | Burma                              |
| 5. <i>M. m. curvostylis</i>  | Thailand                           |
| 6. <i>M. m. annamensis</i>   | Indo-China                         |
| 7. <i>M. m. nigripes</i>     | Vietnam and Hainan Island          |
| 8. <i>M. m. peninsulae</i>   | Malaya                             |
| 9. <i>M. m. robinsoni</i>    | Rhio-Linga archipelago             |
| 10. <i>M. m. rubidus</i>     | North Borneo                       |
| 11. <i>M. m. pleiharicus</i> | South Borneo                       |
| 12. <i>M. m. montanus</i>    | Sumatra                            |
| 13. <i>M. m. bancanus</i>    | Billiton and Banka island          |
| 14. <i>M. m. muntjak</i>     | Java and South Sumatra             |
| 15. <i>M. m. nainggolani</i> | Bali and Lombok island             |

**FEA' S MUNTJAC. *Muntiacus feae***

- |                           |                         |
|---------------------------|-------------------------|
| 16. <i>Muntiacus feae</i> | Tenasserim and Thailand |
|---------------------------|-------------------------|

**ROOSEVELT' S MUNTJAC. *Muntiacus rooseveltorum***

- |                             |            |
|-----------------------------|------------|
| 17. <i>M. rooseveltorum</i> | Indo-China |
|-----------------------------|------------|

**ROOSEVELT' S MUNTJAK. *Muntiacus reevesi***

- |                           |                  |
|---------------------------|------------------|
| 18. <i>M. r. reevesi</i>  | South-east China |
| 19. <i>M. r. micrurus</i> | Formosa          |

**BLACK MUNTJAK. *Muntiacus crinifrons***

- |                          |            |
|--------------------------|------------|
| 20. <i>M. crinifrons</i> | East China |
|--------------------------|------------|

註：摘錄自 Whitehead G. K. 1972, Deer of the world.

表二：Cervid satellite I variants described previously

Species		Satellite DNA	Reference
Muntjac	<i>Muntiacus muntjak</i>	MMVsatIA	Bogenberger et al. (1982) Bogenberger et al. (1985) Bogenberger et al. (1987)
		MMVsatIB	Bogenberger et al. (1982) Yu et al. (1986) Benedum et al. (1986)
	<i>Muntiacus reevesi reevesi</i>	C5	Lin et al. (1991)
Roe deer	<i>Capreolus capreolus</i>	CCsatI	Scherthan (1991)
Red deer	<i>Cervus elaphus</i>	Ce-Pst1	Lee and Lin (1996)
Reindeer	<i>Rangifer tarandus</i>	Rt-Pst3	Lee et al. (1994)
Moose	<i>Alces alces</i>	Aa-Msp	Blake et al. (1997) Lee et al. (1997)
White tailed deer	<i>Odocoileus virginianus</i>	Ov-Msp	Lee et al. (1997)
Mule deer	<i>Odocoileus hemionus</i>	Oh-Msp	Lee et al. (1997)
Fallow deer	<i>Dama dama</i>	Dd-Pst1	Lee et al. (1997)

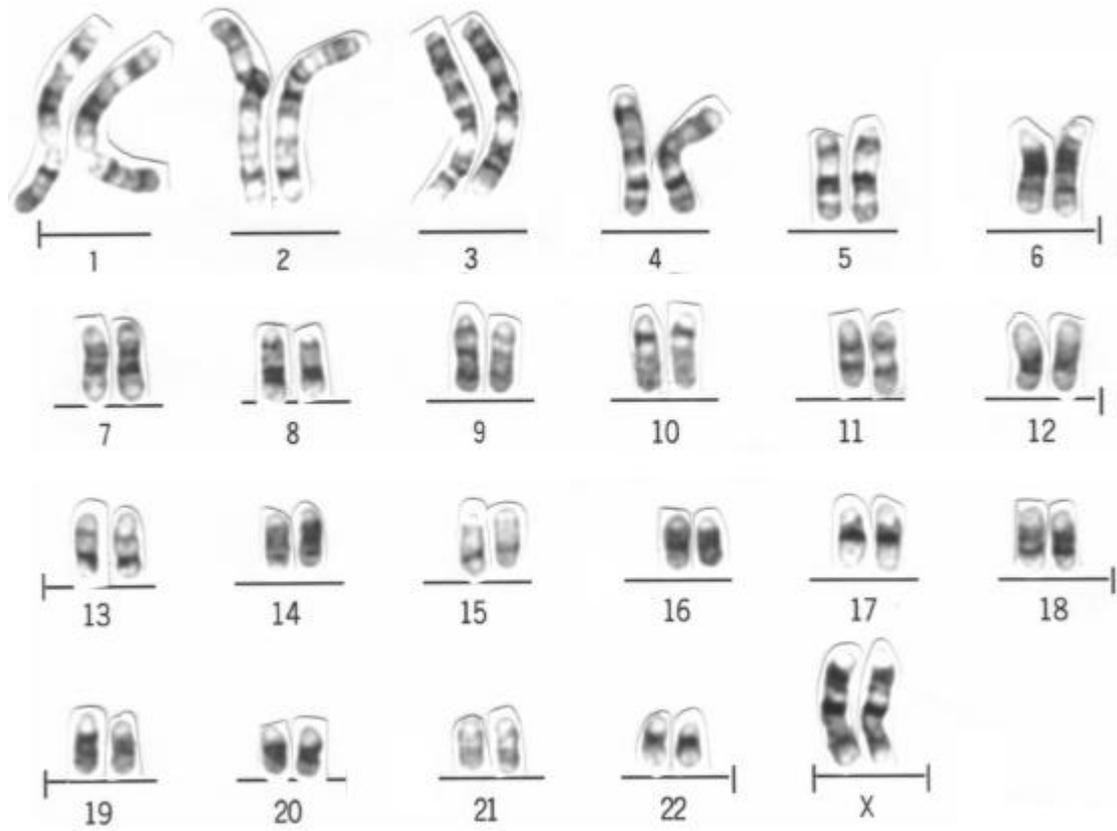
註：本表改編自 Buntjer et al. (1998)。

表三：Cervid satellite II variants described previously

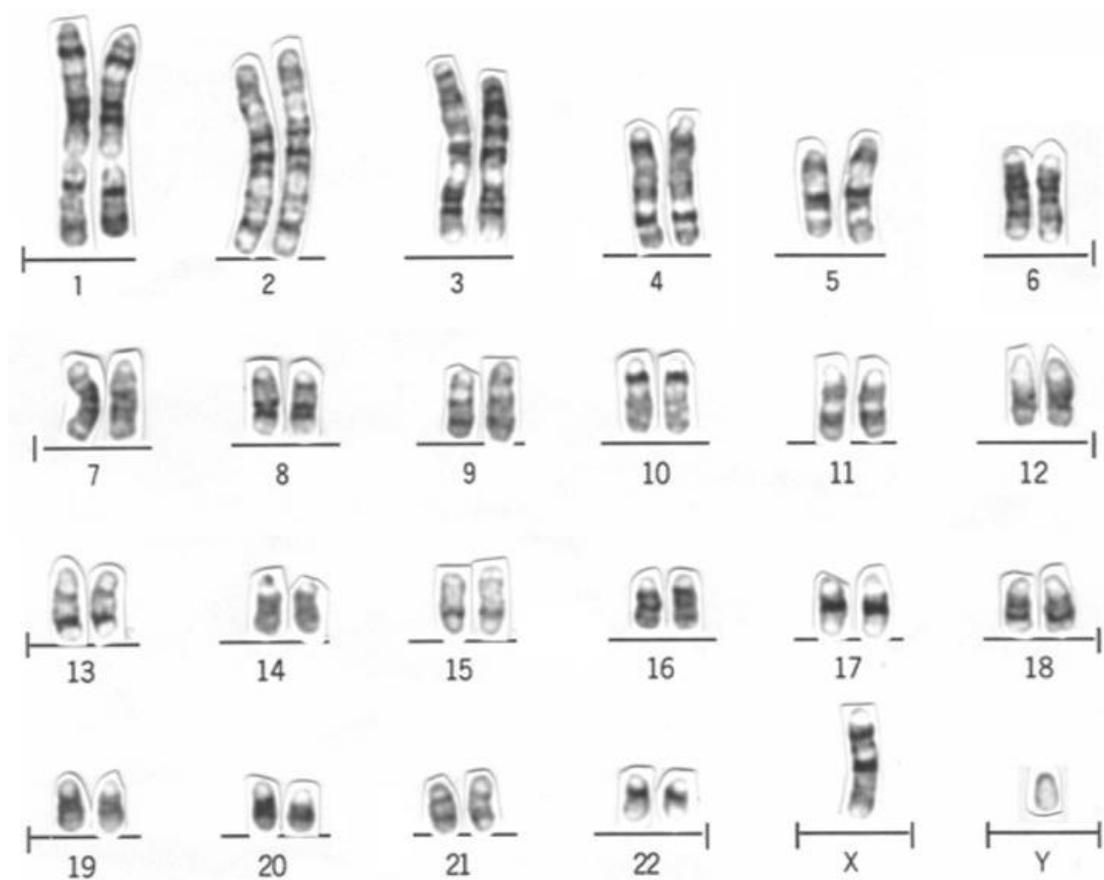
Species		Satellite DNA	Reference
White tailed deer	<i>Odocoileus virginianus</i>	OvDII	Qureshi and Blake (1995)
Indian Muntjac	<i>Muntiacus muntjak vaginalis</i>	Mmv-0.7	Li, et al. (2000)
Caribou	<i>Rangifer tarandus caribou</i>	Rt-0.5	Li, et al. (2000)
		Rt-0.7	Li, et al. (2000)

表四：Cervid satellite III variants described previously

Species		Satellite DNA	Reference
Roe deer	<i>Capreolus capreolus</i>	CCsatIII	Buntjer et al. (1998)
Water deer	<i>Hydropotes inermis</i>	HI-III	Li et al. (unpublished)

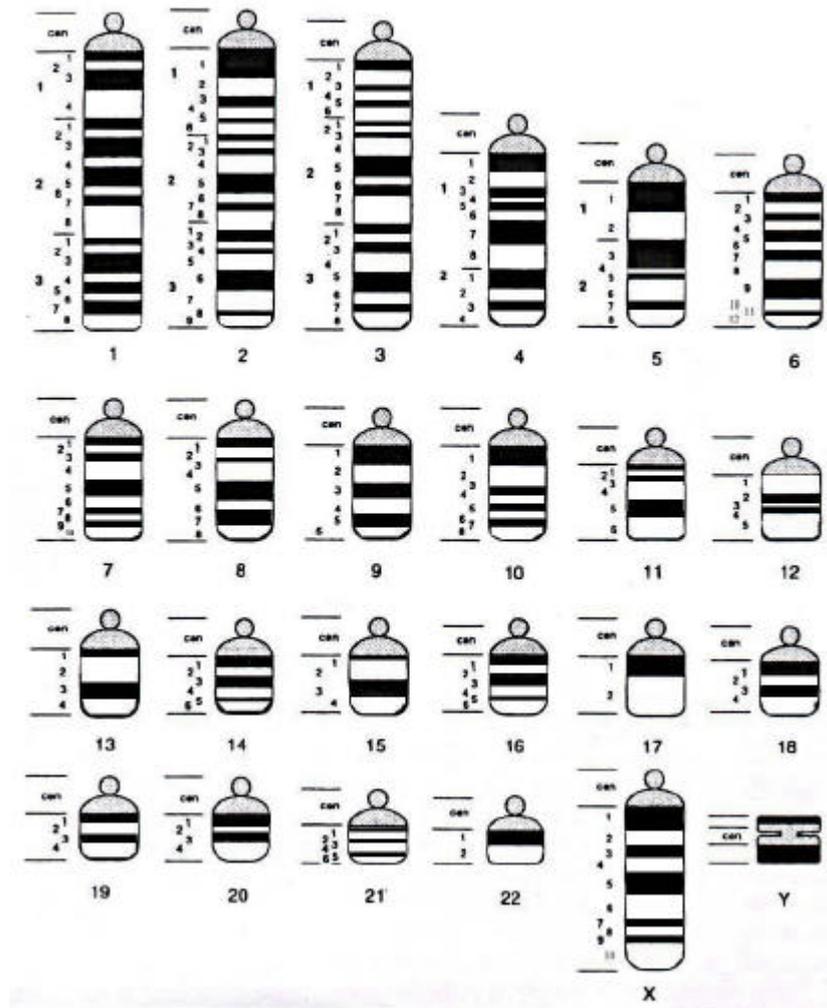


圖一：雌性台灣山羌染色體 G-banding 核型圖

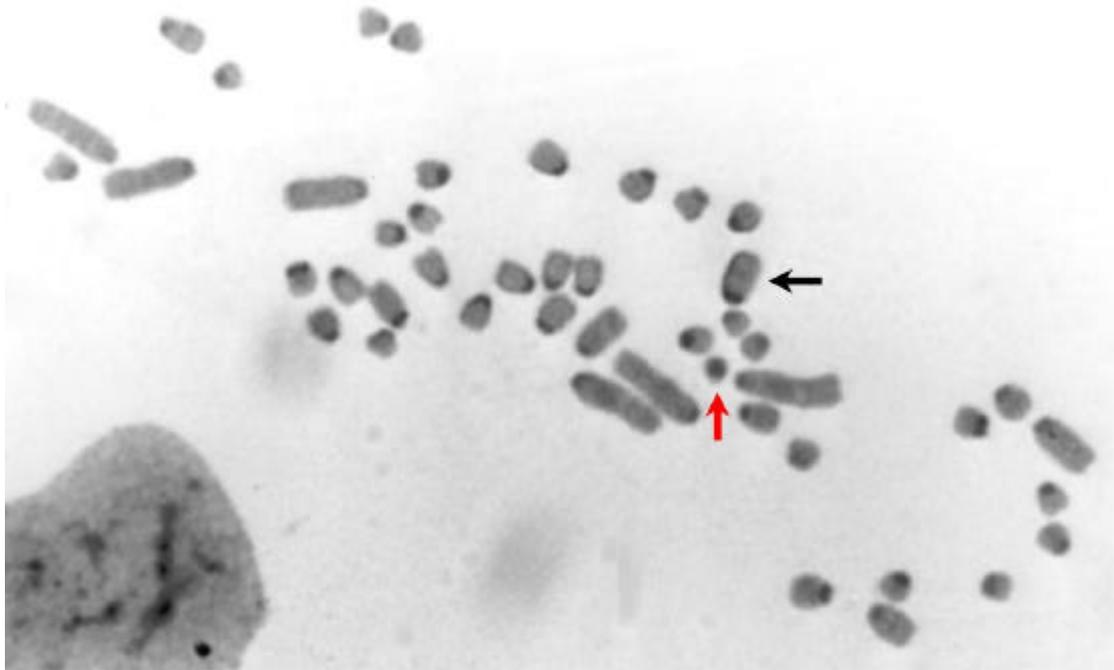


圖二：雄性台灣山羌染色體 G-banding 核型圖

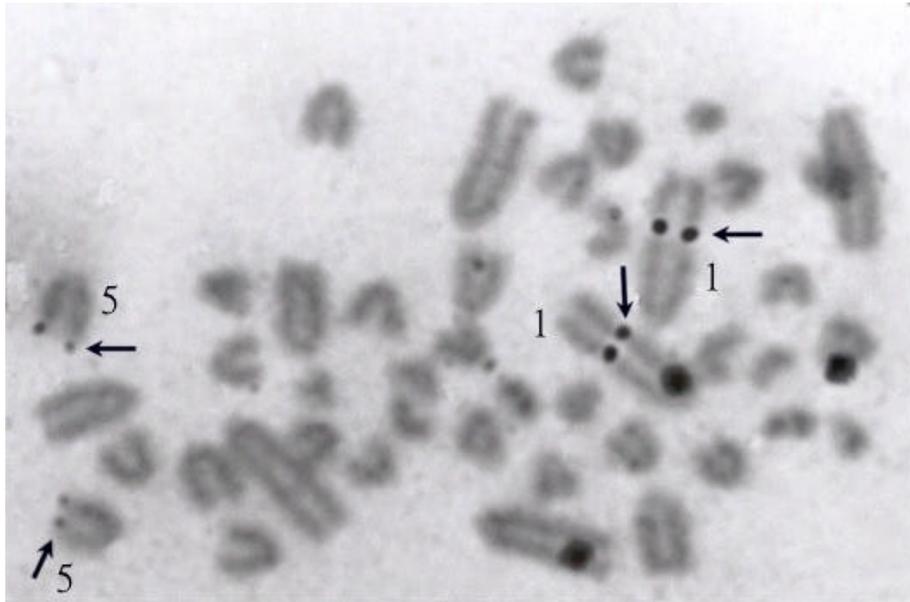
FM (male)



圖三：台灣山羌染色體組型(Idiogram)



圖四：雄性台灣山羌染色體 C-banding 核形圖。黑色箭號所指為 X 染色體，紅色箭號所指的是 Y 染色體。



圖五：箭號所指處為分別位於台灣山羌第一對及第五對染色體上的 NOR。

```

          10      20      30      40      50      60      70
FM-sat-I
AGTCCGGAATTCCTGCAGT GACTTGAGTGC AAGCTGGAT TTCATCTCACAAGATGAAGGGATGTCTGAAG 70
C5      ct--a-tg-...-t-----a.....-a----- 64
          80      90      100     110     120     130     140
FM-sat-I
CCCCTGGGGAGGCACTAGAGAATGCCCTAGCACACTGCCCTTCTCGACAGTCGGCCTCCCATCCATTGG 140
C5      -----a-----a-----t-c---t-a---a-g-g-----a----- 134
          150     160     170     180     190     200
FM-sat-I
ACAGCTCGAGAGG.AACACGGAGTTC AATGATGCCAAAGGAGAAGATGCCT GACTCCTCT GGAAAATGGA 209
C5      -g-----g-----t-----c----- 204
          210     220     230     240     250     260     270
FM-sat-I
CAGGAATCCCAGGATCCAAGTGGCAACAGGAACGGGAACCTGGGTCTTCAGCCTCACCTC.GAGAGGAGT 278
C5      -----c-----c-----ta---taa-----gtc-----tt---a-tt- 274
          280     290     300     310     320     330     340
FM-sat-I
TCCTATGGACCTTCAAGCCGCGAGGAGACT CCCGAGGGGT CCCTCGCAAACCTAGACAGGAGTCCTGACG 348
C5      -----c-----c-----a---c..a-----c 341
          350     360     370     380     390     400     410
FM-sat-I
TCGCTGAACACACCC.GTGTAT GGAAGGGCCAT CCCCGACGTA AACTCGAGAATATACCCAGGTTCCCTC 417
C5      -----c---t-----tcgt-----a-a..-g- 407
          420     430     440     450     460     470     480
FM-sat-I
CTCAACTCGAGAAAAAACCATGAGACTCCC GCCTCGCCGCGA GATTAAGCCT GATTCCCCTGCACTGCGA 487
C5      -g-----..g---t---ac-----a---g---c-----a-at 475
          490     500     510     520     530     540     550
FM-sat-I
GCAAAGAAATACTGTGCTCCCCGTA AAACC..GAAAGGAGCCTTGATTTTCTTGATGGCACTCCAGAGAA 555
C5      ---g-c---tgc---t---aa-c---c-g---a-----c-----ac--- 540
          560     570     580     590     600     610     620
FM-sat-I
AGTCAAGGAACACTCTCTCAAGTATAGAGGGATCTGAGCTCACTGCAGGAACCAGAAAGAGCTCCGTGT 625
C5      .....c-g-cg.-c--c-tgt-----a-ag---t-tc-----c---t---- 601
          630     640     650     660     670     680     690
FM-sat-I
ACCCCAATCATCTCGAGGTGAGAGCGGATTTACTGGCTTCAAATCAAGAGGAATGCCAACTGTCCACAA 695
C5      -ttt-a-a-t-----c---at-----c-----a----- 671
          700     710     720     730     740     750     760
FM-sat-I
GCACCACAAGAGGAGGCCTCTCGCAGCTGTACGTTGGGAGAAGGACGTTGAATTTATGGCTTCCACTGG 765
C5      -----t-----c---tt-g--g-----gc---c---g--- 741
          770     780     790     800
FM-sat-I AATCGACCCCGAGATGCCCTGACTCGAAATCAGGCCGGAATTCT 809
C5      -----a----- 783

```

圖六：台灣山羌衛星 I DNA (FM sat I)與中國山羌衛星 I DNA (C5)的序列比對。

- 表示缺口(gap)
- 表示相同之鹼基

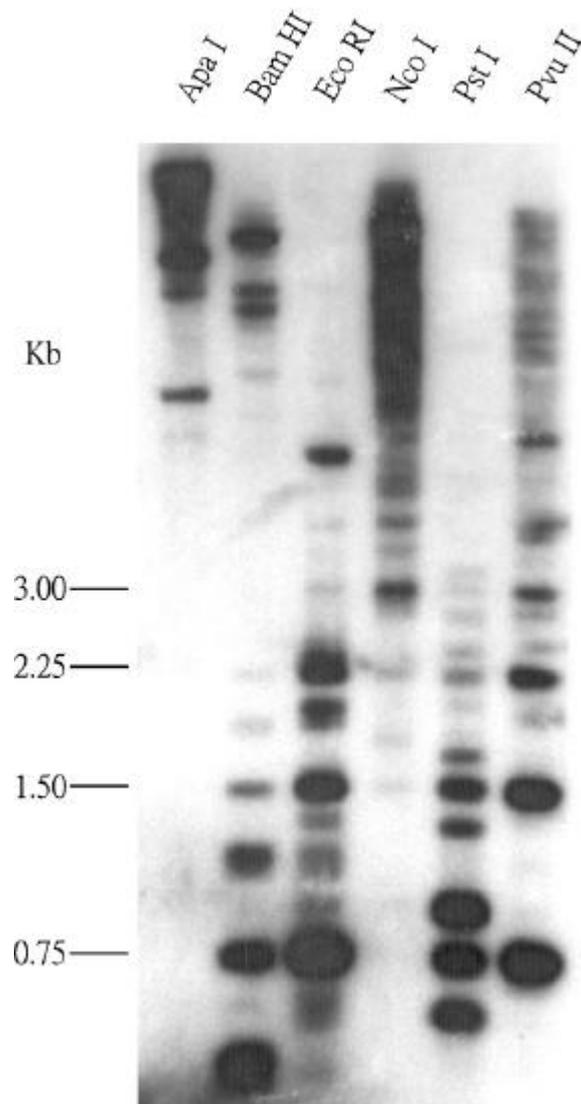
```

          10      20      30      40      50      60
FM-sat-1kb
GAGCTGCCT GACAGACTCGGGAAAGTTGACTGATTCCT GGGTTAAGAGCCAATTTTAC 60
CM-sat-1kb -----a----- 60
          70      80      90      100     110     120
FM-sat-1kb AGTTTCAAGGCAAAGAAAAT TCCTACTGGAAGTTGATAT TAGGTGATTGGTGGGTAC
120
CM-sat-1kb -----a----- 120
          130     140     150     160     170     180
FM-sat-1kb CATAGGGTGT TACTGGAGT GGCATCCT TGCCTGGTAGGGAGTCAGGAAGCTCATTAGC
180
CM-sat-1kb -----a----- 180
          190     200     210     220     230     240
FM-sat-1kb
GATGATCAGGTGCTTTTGGCAACGGTTGCAAAGGGGGCCAGTCCGATTACAGGTGACC 240
CM-sat-1kb -----a-----c--- 239
          250     260     270     280     290     300
FM-sat-1kb TTGGTTC TGGGCCCCACTTCTATGGCCTTGGTGTGAGGACTCCCAGTTGTGGCTTGGG
300
CM-sat-1kb -----a----- 299
          310     320     330     340     350     360
FM-sat-1kb
AAGGAGTCACCTCAACAAGACTGACCCTGCTTCAGAGTAAAAGTTCCAT CAAGTTTTCCC 360
CM-sat-1kb -----a-----t- 358
          370     380     390     400     410     420
FM-sat-1kb
TGCAGGAGAGATCTAGTGAT CCTAGATCT GTTTGAAAAGTCTTGGACACTGCAGGGACA 420
CM-sat-1kb -----a-----t- 419
          430     440     450     460     470     480
FM-sat-1kb CATACTGAGT GTGAAACTGGATATTGAACCTTGTGGCAAACCTCACCTTTTCTCTGT
480
CM-sat-1kb -----a-----t- 479
          490     500     510     520     530     540
FM-sat-1kb TGGCATTAAAAGGGTGTGGGCTGACAGCTACCTGAGAAT CCATNCAATTGACAATTTCT
540
CM-sat-1kb -----a-----c----- 538
          550     560     570     580     590     600
FM-sat-1kb ATTTACAACATTAATGAAT TGGTCAAAT TATTTCTATTTCTATGCAAACAGGCANCTTG
600
CM-sat-1kb -----a-----g-----g-----a--- 596
          610     620     630     640     650     660
FM-sat-1kb CAACAACCT TGTGGCATGAT CATTCCAATAGATTGTCAACTAATCAAGGTACCAACCT
660
CM-sat-1kb -----g-----c-a-- 655
          670     680     690     700     710
FM-sat-1kb ATGACACTTAACACATTTAGATATAATTCCTAAGCCTTT TCTTGAGGGACAGACCCAA
719
CM-sat-1kb -----c-----t-----a----- 715
          720     730     740     750     760     770
FM-sat-1kb
TATGAGCTAGGAATGTGTTCAAAGGCTCAGAAAAGTGCAGGAAAATACACTGGCTATGAC 779
CM-sat-1kb -----g-----a----- 775
          780     790     800     810     820     830
FM-sat-1kb TGGAATTAGGGTCTCTGTGCAAACCAGGAGTTCTGACAT CTTACAATCTAGACAGTTCC
839
CM-sat-1kb -----t----- 835
          840     850     860     870     880     890
FM-sat-1kb TGATAGACAGATGCATGAAAAACTCTACT TTTATGTTTTCTTTCATCAAAGGAACAT
899
CM-sat-1kb ----- 895
          900     910     920     930     940     950
FM-sat-1kb GGATTTCTAGCATTCTGTGT GCTCAGAGTAACTCACTGCTCTAAAATGCTTGTCTTGAC
959
CM-sat-1kb -----g----- 955
          960     970     980     990     1000    1010
FM-sat-1kb TTCATTTTT CAGTAAGAACT TCCCCTGACT GTGTTACAGT CAGGACGGTCCACACTCAC
1019
CM-sat-1kb ----- 1015
          1020    1030    1040    1050    1060    1070
FM-sat-1kb
AGGGAAAAAGCAAACCTAAACATCAAACGTTTGTCCATCAGTTTTCTCT GTAGGAGAGA 1079
CM-sat-1kb --a----- 1075
          1080    1090    1100

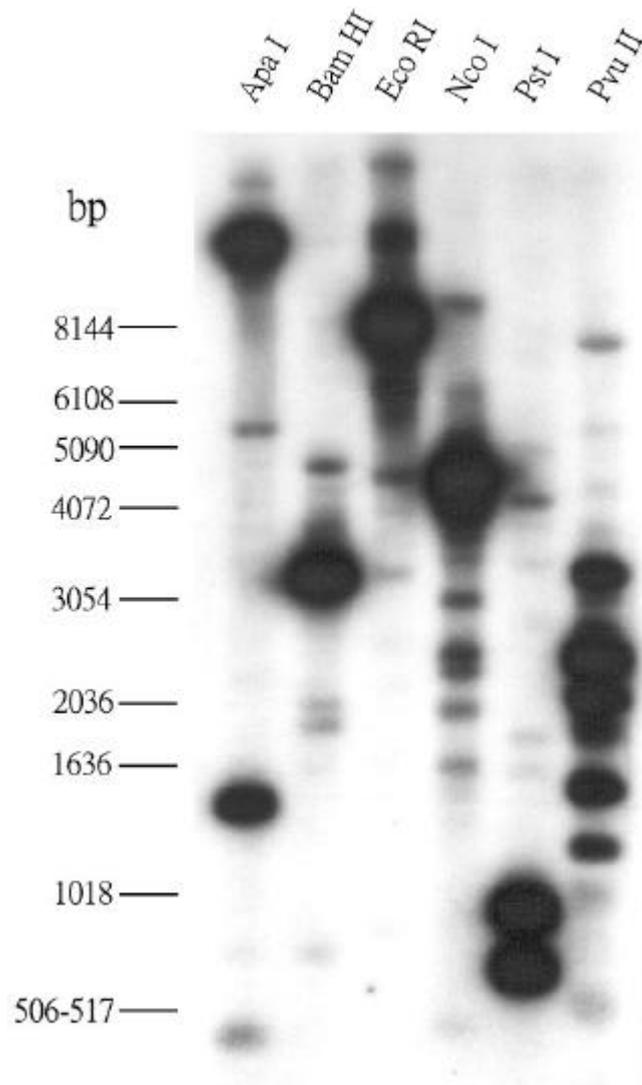
```

FM-sat-1kb TCCAGTGATCCTAGGTCGGCTCTG 1103  
CM-sat-1kb ----- 1099

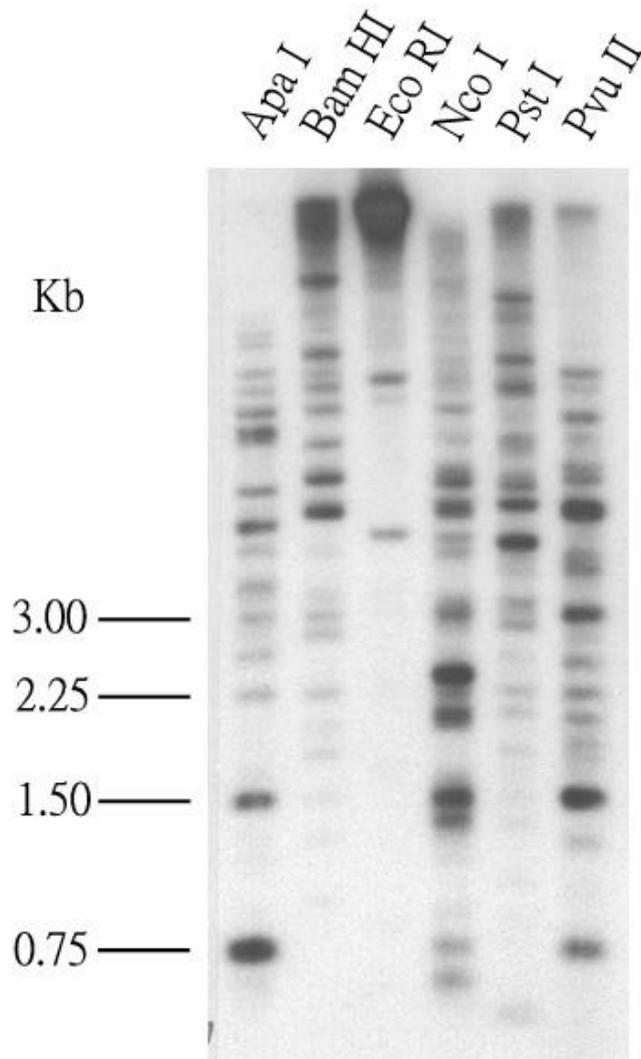
圖七：台灣山羌的衛星 1kb DNA (FM 1 kb)與中國山羌衛星 1kb DNA (CM 1 kb)的序列比對。



圖八 (A): 台灣山羌衛星 I DNA 在台灣山羌基因組中之組合排列情形。取一台灣山羌的基因組 DNA 分別以 *Apa* I, *Bam* HI, *Eco* RI, *Nco* I, *Pst* I, *Pvu* II 六種限制進行切割，利用 Southern filter, 接著以  $^{32}\text{P}$  標定的衛星 I DNA (FM sat I) 與之進行雜交反應，在 *Bam* HI, *Eco* RI, *Pst* I 及 *Pvu* II 的南方點漬圖譜中顯示衛星 I DNA 是以 0.75-0.8 kb 的單元體為單位，重複排列成一規則性的梯狀形態。

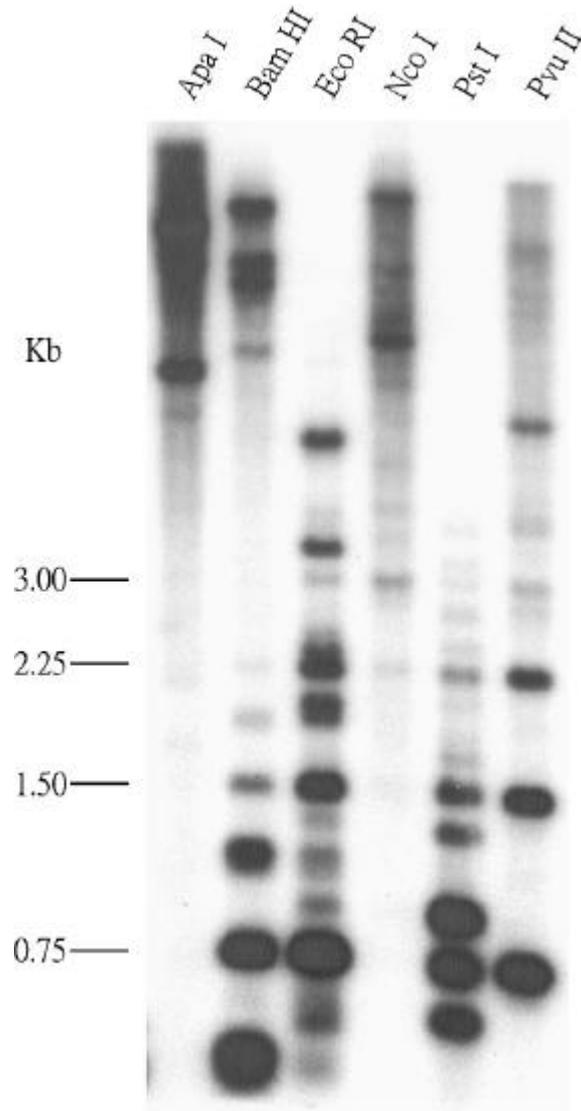


圖八 (B): 台灣山羌衛星 1 kb DNA 在台灣山羌基因組中的排列組合。以 *Apa* I, *Bam* HI, *Eco* RI, *Nco* I, *Pst* I, *Pvu* II 等 六 種 限 制 切 酶 切 DNA 片段，利用南方點漬法轉印至 NC filter，接著以  $^{32}\text{P}$  標定的 FM 1 kb DNA 與之進行雜交反應，結果南方點漬圖譜顯示衛星 1 kb DNA 是以不規則的形態組合排列。

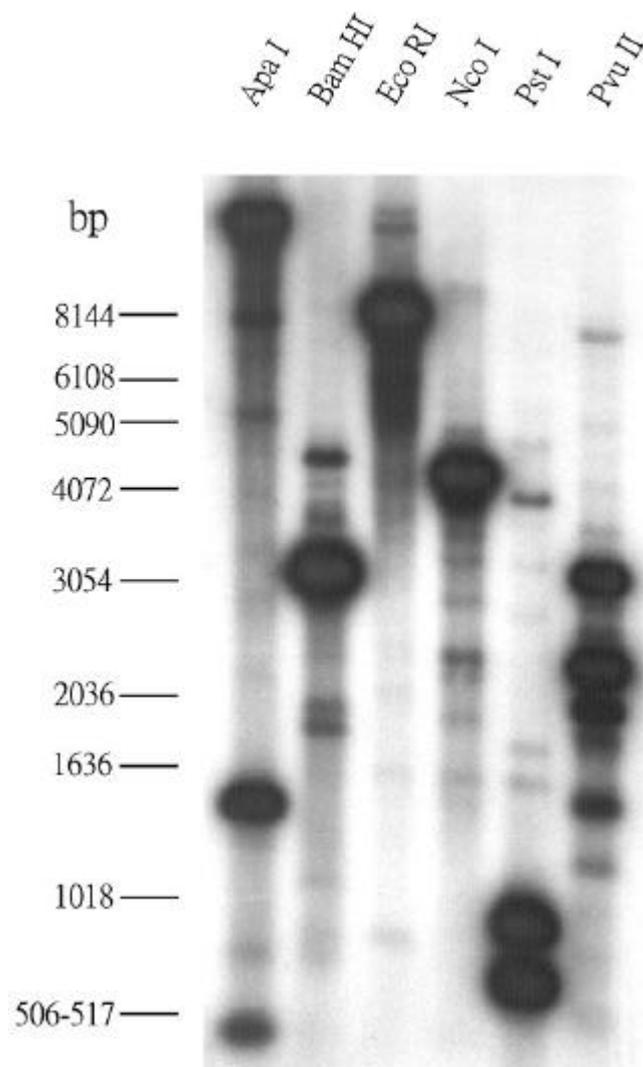


圖八 (C): 中國山羌衛星 II DNA (CM 0.7)在台灣山羌基因組之組合排列情形。

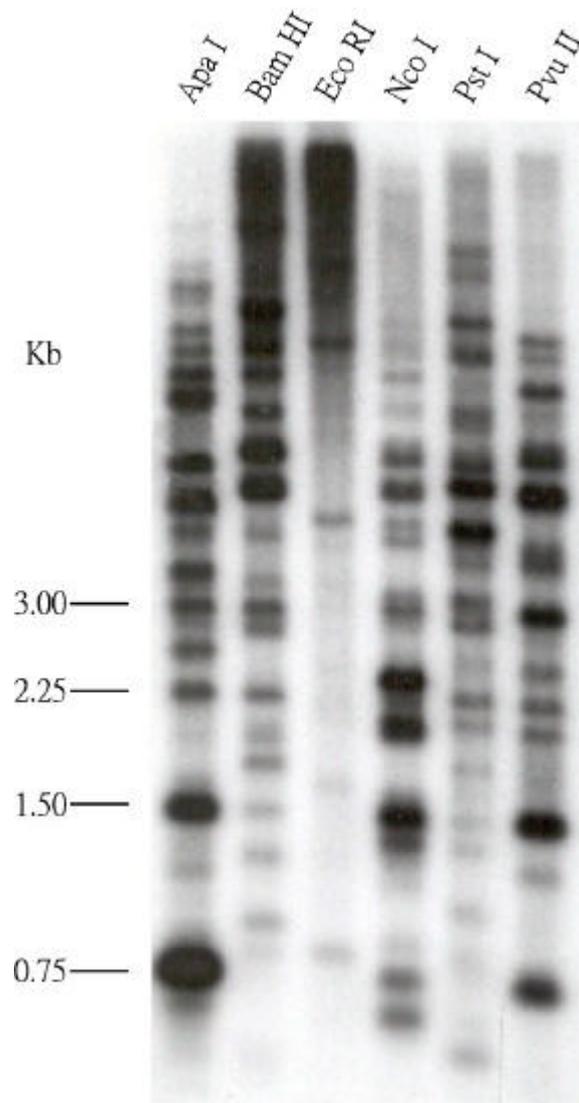
取一台灣山羌的基因組，以 *Apa* I, *Bam* HI, *Eco* RI, *Nco* I, *Pst* I, *Pvu* II) 進行切割，以南方點漬法轉印至 NC filter，再以  $^{32}\text{P}$  標定的 CM-0.7 DNA 與之進行雜交。在 *Apa* I, *Nco* I 及 *Pvu* II 的南方點漬圖譜中顯示衛星 II DNA 是以約 0.75 kb 為單元體的組合排列。其他三種限制酶則是非規則性的組合排列。



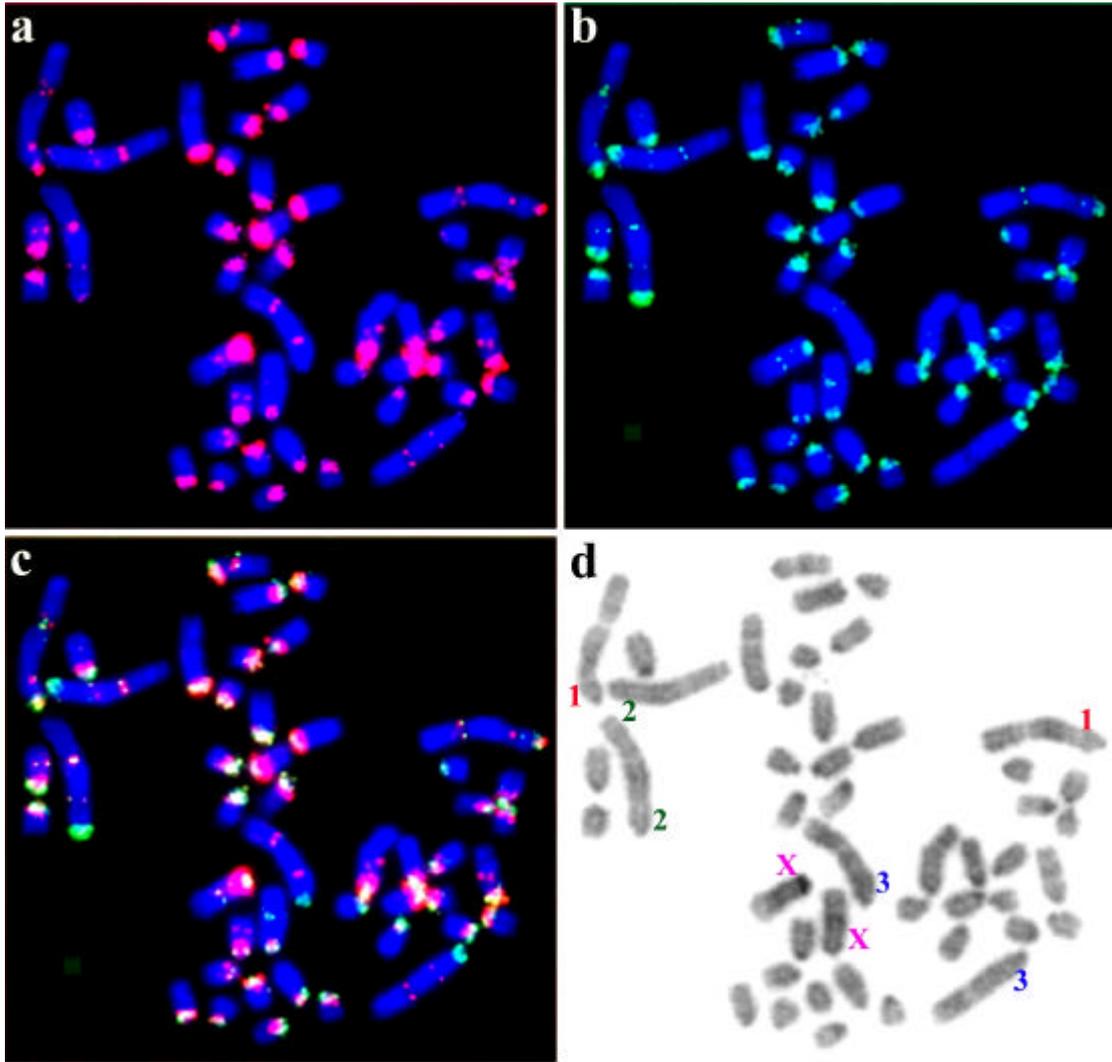
圖九 (A): 中國山羌衛星 I DNA 在中國山羌基因組中之組合排列情形。取一中國山羌的基因組，選擇 *Apa* I, *Bam* HI, *Eco* RI, *Nco* I, *Pst* I, *Pvu* II 等 六 種 限 行 切割，利用南方點漬法轉印至 NC filter，接著以  $^{32}\text{P}$  標定的 C5 與之進行雜交反應，在 *Bam* HI, *Eco* RI, *Pst* I 及 *Pvu* II 的南方點漬圖譜中顯示衛星 I DNA 是以 0.75-08 kb 的單元體為單位，重複排列成一規則性的梯狀形態。



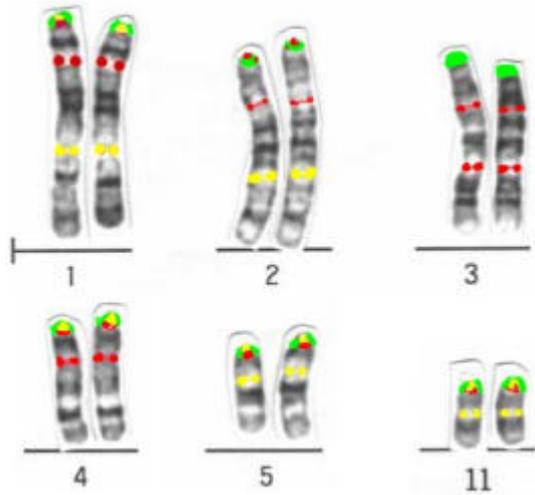
圖九 (B) : 中國山羌衛星 1 kb DNA 在中國山羌基因組中的排列次序。由 *Apa* I, *Bam* HI, *Eco* RI, *Nco* I, *Pst* I, *Pvu* II 等 六 種 限 制 切 DNA 片段 , 利用南方點漬法轉印至 NC filter , 接著以  $^{32}\text{P}$  標定的 CM 1 kb DNA 與之進行雜交反應 , 結果南方點漬圖譜顯示衛星 1 kb DNA 在基因組中並非以前後排列之方式組合而成。



圖九 (C): 中國山羌衛星 II DNA 在中國山羌基因組之組合排列情形。取一中國山羌的基因組，選 *Apa* I, *Bam* HI, *Eco* RI, *Nco* I, *Pst* I, *Pvu* II) 進行切割，透過南方點漬法轉印至 NC filter，再以  $^{32}\text{P}$  標定的 CM-0.7 DNA 與之進行雜交。在 *Apa* I, *Nco* I 及 *Pvu* II 的南方點漬圖譜中顯示衛星 II DNA 是以約 0.75 kb 的單元體重複排列而成的。其他三種限制則



圖十：圖 a-d 為同一 metaphase，以衛星 I DNA (FM sat I) 標定 biotin 及衛星 II DNA (CM 0.7) 標定 digoxigenin 與台灣山羌染色體進行螢光原位雜交反應。(a) 紅色螢光表示衛星 I DNA (FM sat I) 在染色體上座落的情形；(b) 綠色螢光表示衛星 II DNA (CM 0.7) 在染色體上座落的情形；(c) 為衛星 I DNA (FM sat I) 標定 biotin (紅色) 和衛星 II DNA (CM 0.7) 標定 digoxigenin (綠色) 兩種探針同時進行的雜交反應；(d) 以 DAPI 染色轉換成 G-banding。

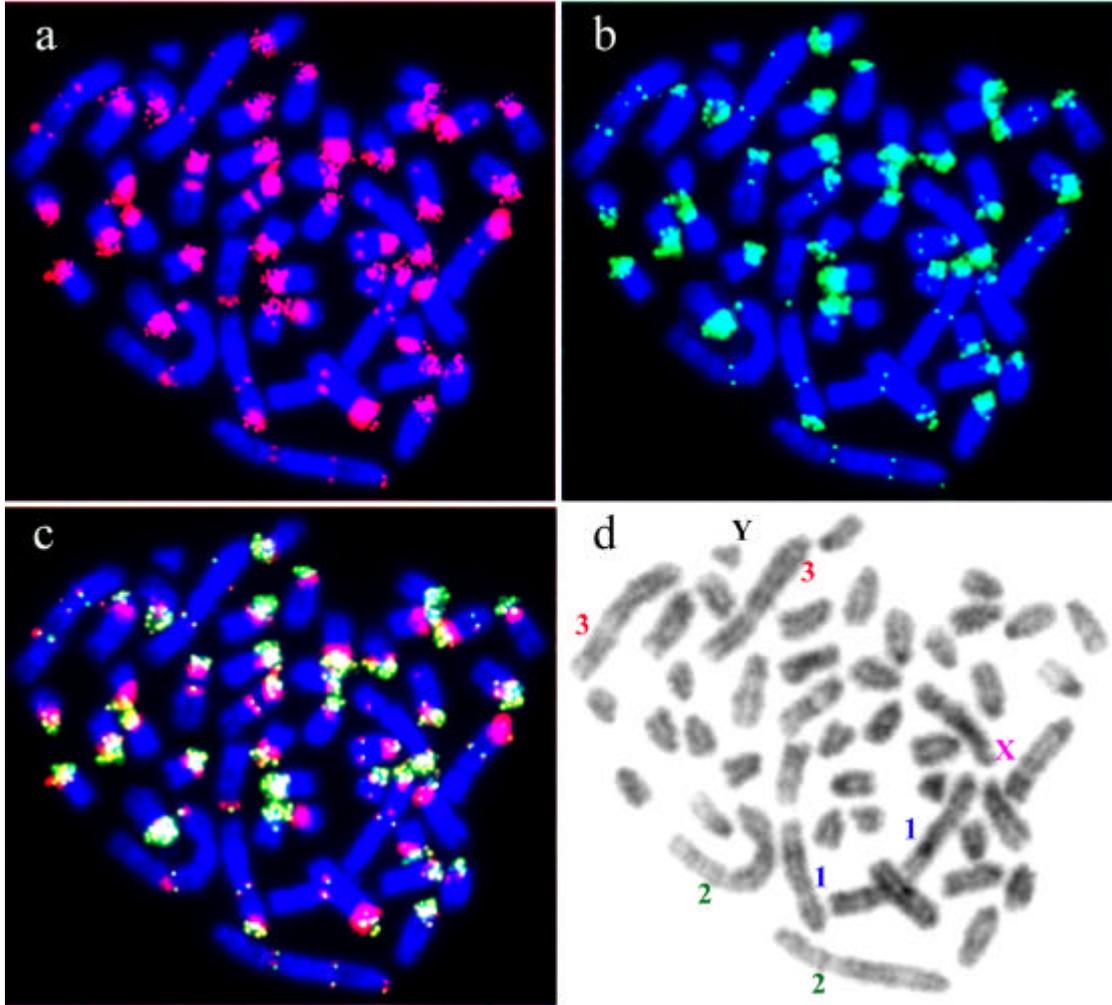


圖十一：螢光原位雜交結果顯示 FM sat I 和 CM sat II 在台灣山羌部份核型上之分佈情形。biotin 標定的 FM sat I 以 Cy3 avidin 偵測。digoxigenin 標定的 CM sat II 以 anti-dig-FITC 偵測。

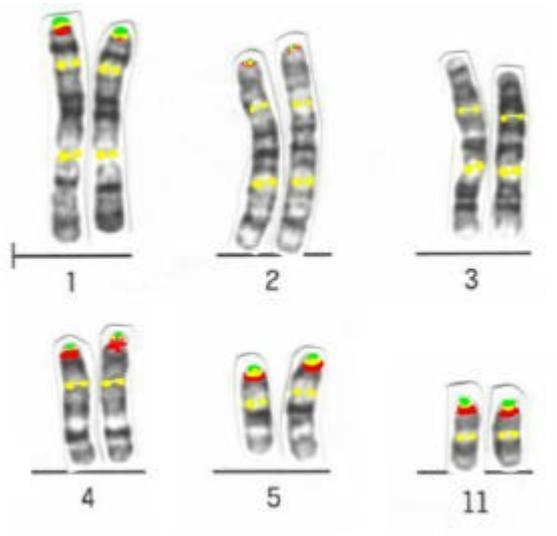
紅色表示只有 sat I 在染色體上的位置

綠色表示只有 sat II 在染色體上的位置

黃色表示 sat I 和 sat II 同時在染色體上的位置



圖十二：圖 a-d 為同一 metaphase，以衛星 I DNA (FM sat I) 標定 biotin 及衛星 1 kb DNA (FM 1 kb) 標定 digoxigenin 與雄性台灣山羌染色體進行螢光原位雜交反應。(a) 紅色螢光表示衛星 I DNA (FM sat I) 在染色體上座落的情形；(b) 綠色螢光表示衛星 1 kb DNA (FM 1 kb) 在染色體上座落的情形；(c) 為衛星 I DNA (FM sat I) 標定 biotin (紅色) 和衛星 1 kb DNA (FM 1 kb) 標定 digoxigenin (綠色) 兩種探針同時進行的雜交反應；(d) 為 DAPI 染色轉換成 G-banding。

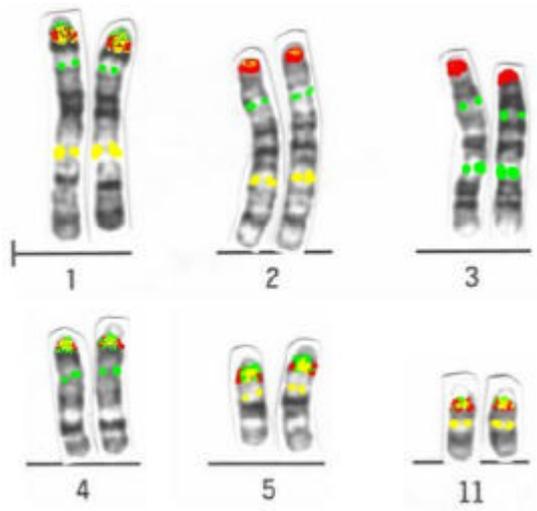


圖十三：螢光原位雜交結果顯示 FM sat I 和 FM 1kb 在台灣山羌部份核型上之分佈情形。biotin 標定的 FM sat I 以 Cy3 avidin 偵測。digoxigenin 標定的 FM 1kb 以 anti-dig-FITC 偵測。

紅色表示只有 FM sat I 在染色體上的位置

綠色表示只有 FM 1kb 在染色體上的位置

黃色表示 FM sat I 和 FM 1kb 同時在染色體上的位置



圖十四：螢光原位雜交結果顯示 CM sat II 和 FM 1kb 在台灣山羌部份核型上之分佈情形。biotin 標定的 CM sat II 以 Cy3 avidin 偵測。digoxigenin 標定的 FM 1kb 以 anti-dig-FITC 偵測。

紅色表示只有 sat II 在染色體上的位置

綠色表示只有 FM 1kb 在染色體上的位置

黃色表示 sat II 和 FM 1kb 同時在染色體上的位置

## 參考文獻

Arnason U (1987) The evidence for a common ancestry of toothed and baleen whales based on studies of chromosomes and highly repetitive DNA. *La Kromosoma* II-45: 1479-1488.

Bengtsson, B. O., (1980) Rates of karyotype evolution in placental mammals. *Hereditas* **92**: 37-47.

Bogenberger JM, Neitzel H, Fittler F (1987) A highly repetitive DNA component common to all Cervidae : its organization and chromosomal distribution during evolution. *Chromosoma* **95**: 154-161.

Brinkley BR, Valdivia MM, Tousson A, Brenner SL (1984) Compound kinetochores of the Indian muntjac : evolution by liner fusion of unit kinetochores. *Chromosoma* **91**: 1-11.

Buntjer JB, Nijman IJ, Zijlstra C, Lenstra JA (1998) A satellite DNA element specific for roe deer (*Capreolus capreolus*). *Chromosoma* **107**: 1-5.

Dod B, Mottez E, Desmarais E, Bonhomme F, Roizes G (1989) Concerted evolution of light satellite DNA in genus *Mus* implies amplification and homogenization of larger blocks of repeat. *Mol Biol Evol* **6**: 478-491.

Don E. Wilson and Dee Ann M. Reeder, Second Edition, (1993) *Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference*.

Dover, G. A. (1986) Molecular drive in multigene families: how biological novelties arise, spread and are assimilated. *Trends Genet.* **168**: 159-165.

Dracopoli, NC, Haines, JL, Korf, B, Moir, DT, Morton, CC, Seidman, CE, Seidman, JG and Smith, DR (2001) Chromosome Banding Techniques: Centromeric heterochromatin staining (C-banding). In: *Current Protocols*

in *Human Genetics*. John Willey & Sons, Inc. Volume 1 unit 4.2. pp25-28.

Fanning TG, Modi WS, Wayne RK, O' Brien SJ (1988) Evolution of heterochromatin-associated satellite DNA in felids and canids (Carnivora). *Cytogenet Cell Genet* **48**: 214-219.

Fry K, Salser W (1977) Nucleotide sequence of Hs-alpha satellite DNA from kangaroo rat. *Dipodomys ordii*, and characterization of similar sequences in other rodents. *Cell* **12**: 1069-1084.

Hamilton MJ, Honeycutt RL, Baker RJ (1990) Intragenomic movement, sequence amplification and concerted evolution satellite DNA in harvest mice, *Reithrodontomys*: evidence from in situ hybridization. *Chromosoma* **99**: 321-329.

Lin CC, Sasi R, Fan Y-S, Chen Z-Q (1991) New evidence for tandem chromosome fusion in the karyotypic evolution of Asian muntjacs. *Chromosoma* **102**: 333-339.

Lee C, Court DR, Cho C, Haslett J, Lin CC (1997) High-order organization of subrepeats and the evolution of cervid satellite I DNA. *J Mol Evol* **44**: 327-335.

Li YC, Lee C, Hseu TH, Li SY, Lin CC (2000a) Direct visualization of the genomic distribution and organization of two cervid centromeric satellite DNA families. *Cytogenetics and Cell Genetics* **89**: 192-198.

Li YC, Lee C, Sanoudou D, Hseu TH, Li SY, Lin CC (2000b) Interstitial colocalization of two cervid satellite DNAs involved in the genesis of the Indian muntjac karyotype. *Chromosome Research* **8**: 363-373.

Lima-de-Faria A, Arnason V, Widegreen B, Essen-Moller J, Isakson N, Olsson E, Jaworska H (1984) Conservation of repetitive DNA sequences in deer species studied by Southern blot transfer. *J Mol Evol* **20**: 17-24.

Maio JJ, Brown FL, Musich PR (1981) Toward a molecular paleontology of primate genomes. *Chromosoma* **83**: 103-125.

Modi WS (1993) Comparative analyses of heterochromatin in *Microtus*: sequence heterogeneity and localized expansion and contraction of satellite DNA arrays. *Cytogenet Cell Genet* **62**: 142-148.

Modi WS, Fanning TG, Wayne RK, O'Brien SJ (1988) Chromosomal localization of satellite DNA sequences among 22 species of felid and canids (Carnivora). *Cytogenet Cell Genet* **48**: 208-213.

Nowak RM (1991) In *Walker's Mammals of the world*, 5th Edition. Vol.II.pp 1134-1400, 1629. The Johns Hopkins University Press, Baltimore and London.

Qureshi SA, Blake RD (1995) Sequence characteristics of a cervid DNA repeat family. *J Mol Evol* **40**: 400-404.

Shi LM, Ye YY, Duan XS (1980) Comparative cytogenetic studies on the red muntjac, Chinese muntjac and their F1 hybrids. *Cytogenet Cell Genet* **26**: 22-27.

Shi LM (1983) Sex linked chromosome polymorphism in black muntjac (*Muntiacus crinifrons*) In : Proceedings of the Fifteenth International Congress of Genetics, M.S.Swaminathan (Ed.) (New Dehli)

Shi LM, Ma CX (1988) A new karyotype of muntjac (*M. sp.*) from Gongshan county in China. *Zool Res* **9**: 343-347.

Soma H, Kada H, Mtayoshi K., Suzuki. Y., Heckvichal, C. Mahannop, A. and Vatanaromya, B (1983) The chromosomes of *Muntiacus feae*. *Cytogenet. Cell Genet* **35**: 156-158

Soma H., Kada H., Meckvichal C, Mahannop A (1987) Confirmation of the chromosomal constitution of Fea's muntjac, *Muntiacus feae*. *Proc Japan Acad* **63** (B): 253-256.

Volobouev V, Voget N, Viegas-Péquignot E, Malfoy B, Dutrillaux B (1995) Characterization and chromosomal location of two repeated DNAs in three *Gerbillus* species. *Chromosoma* **104**: 252-259.

Walker E P (1968) *Mammals of the world*. 2nd edition, pp.1379-1404. The Johns Hopkins Press. Baltimore.

Whitehead G K (1993) *The Whitehead Encyclopedia of Deer*. Voyager Press, Stillwater, MN. pp597.

Wichman HA, Payne CT, Ryder OA, Hamilton MJ, Maltbie M, Baker RJ (1991) Genomic distribution of heterochromatic sequences in equids: implication to rapid chromosomal evolution. *J Hered* **82**: 369-377.

Wijers R, Zijlstra C, Lenstra JA (1993) Rapid evolution of horse satellite DNA. *Genomic* **18**: 113-117.

Wurster DH, Benirschke K (1967) Chromosome studies in some deer, the springbok and the spronghorn, with notes on placentation in deer. *Cytologia* **32**: 273-285.

Wurster DH, Benirschke K (1970) Indian muntjac, *Muntiacus muntjak* : a deer with a low diploid chromosome number. *Science* **168**: 1364-1366.

Yang F, Carter NP, Shi L, Ferguson-Smith MA (1995) A comparative study of karyotypes of muntjacs by chromosome painting. *Chromosoma* **103**: 642-652.

王穎, 王敏男(1989) 台灣山羌之生態及行為之研究。行政院農委會。

王穎, 陳怡君(1991) 台灣山羌之生態及行為之研究(V) - 棲地特性與吠叫行為。行政院農委會。