

# 林麝和马麝随机扩增多态 DNA 的研究<sup>\* \*</sup>

包惠芳 徐宏发 陆厚基

(华东师范大学生物系, 上海, 200062)

**摘要:** 用随机扩增多态 DNA (RAPD) 技术对饲养的林麝和马麝进行分子遗传标记研究。在选用的 42 种随机引物中, 有 25 种引物产生了清晰稳定的条带, 单个引物获得标记数在 1~14 之间, 平均每个个体获得 168 个 RAPD 标记, 其中林麝、马麝特异性标记各 5 个, 个体特异性标记有 3 个, 这些标记可用来鉴定种或个体。平均遗传距离在林麝种内为  $0.127 \pm 0.023$ , 马麝为  $0.105 \pm 0.013$ , 种间为  $0.241 \pm 0.02$ , 种间差异显著大于种内差异。分析表明饲养马麝种内遗传多样性低, 为增强饲养马麝的生存力, 最好从不同种群中引入种麝进行繁殖。

**关键词:** 林麝; 马麝; 随机扩增多态 DNA (RAPD)

**中图分类号:** Q751    **文献标识码:** A    **文章编号:** 1000-1050 (1999) 04-0241-07

麝是名贵的药用动物, 目前我国主要以饲养林麝 (*Moschus moschiferus*) 和马麝 (*Moschus chrysogaster*) 为主<sup>[1]</sup>。为推动养麝业的发展, 许多学者在两种麝的形态学和生理学方面进行了研究<sup>[1,2]</sup>。在微观方面, 近年来对麝的核型、线粒体 DNA 也有研究<sup>[3,4,5]</sup>, 但未见核 DNA 方面的研究。随机扩增多态 DNA (RAPD) 技术是 1990 年 Williams 等人发展起来的一种有效遗传标记技术<sup>[6,7]</sup>, 以 9~10bp 的寡聚核苷酸为随机引物进行多聚酶链反应 (PCR), 经电泳其扩增产物, 据其带型的有无来分析 DNA 多态性。它因简便、快速、灵敏、安全而得以广泛应用于遗传作图、品系鉴定、遗传多样性分析等, 并已取得很大成果<sup>[8~12]</sup>。本文尝试用该技术对林麝、马麝的基因组 DNA 进行研究, 一方面在 DNA 水平上建立这两个种的鉴定依据; 另一方面探讨人工饲养的小种群中所出现的近亲繁殖等问题, 为进一步研究并解决人工饲养过程中出现的问题提供遗传学上的依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

实验用麝的冷冻肌肉, 分别采自 4 只林麝和 4 只马麝。编号为 1、4 的林麝是成体, 来自四川康定, 2、3 为幼体, 是华东师范大学饲养场自繁的第一代个体。马麝编号为 6、7 的是成体, 来自甘肃兴隆山, 5、8 为幼体, 是华东师范大学自繁的第一代个体, 其中编号 6、8 系母子关系。

\* 基金项目: 国家自然科学基金 (39670108) 资助

作者简介: 包惠芳, 女, 九六级硕士研究生, 研究方向: 分子生态学

收稿日期: 1998-10-08, 修回日期: 1999-05-18

## 1.2 仪器和试剂药品

本实验所用的 PCR 扩增仪是上海高机应用技术研究所以研制的 SPX - 481 型。Taq DNA 聚合酶及配套缓冲液、25 mM 氯化镁 ( $MgCl_2$ ) 均为立陶宛 MBI 公司产品。所用 42 种引物购于上海生物工程公司 (序列见表 1), 其它药品试剂均为进口分装或国产 AR 级。

表 1 随机引物序列及扩增情况

Table 1 The primers and results of RAPD

| 引物<br>Primer | 5' - 3' 序列<br>Sequence | 扩增条带<br>Number of bands | 引物<br>Primer | 5' - 3' 序列<br>Sequence | 扩增条带<br>Number of bands |
|--------------|------------------------|-------------------------|--------------|------------------------|-------------------------|
| S31          | CAATCGCCGT             | 7~10                    | S153         | CCCATTTCGG             | 1~3                     |
| S46          | ACCTGAACGG             | 4~5                     | S155         | ACGCACAACC             | -                       |
| S49          | CTCTGGA GAC            | 不稳                      | S159         | ACGGCGTATG             | -                       |
| S51          | AGCGCCATTG             | 7~8                     | S163         | CAGAA GCCCA            | 5                       |
| S53          | GGGGTGACGA             | 5~8                     | S166         | AAAGCGGCGA             | 4~6                     |
| S54          | CTCCCCAAAG             | 不稳                      | S167         | CAGCGACAAAG            | 9~10                    |
| S60          | ACCCGGTCAC             | 11~14                   | S169         | TGGA GAGCA G           | -                       |
| S61          | TTCGAGCCAG             | 10                      | S173         | CTGGGGCTGA             | 6                       |
| S63          | GGGGGTCTTT             | 3~5                     | S174         | TGACGGCGGT             | 12~14                   |
| S86          | GTGCCTAACCC            | -                       | S175         | TCA TCCGAGG            | 不稳                      |
| S88          | TCACGTCCAC             | 8                       | S176         | TCTCCGCCCT             | 8~12                    |
| S89          | CTGACGTCAC             | 9                       | S177         | GGTGGT GATG            | 不稳                      |
| S90          | AGGGCCGTCT             | 8~9                     | S178         | TGCCCA GCCT            | 不稳                      |
| S91          | TGCCCCGTCGT            | 4~6                     | S181         | CTACTGCCCT             | 8~10                    |
| S94          | GGATGAGACC             | 10~11                   | S376         | GAGCGTCGA              | -                       |
| S103         | A GACGTCCAC            | -                       | S379         | CACAGGCGGA             | 不稳                      |
| S140         | GGTCTA GAGG            | -                       | S380         | GTGTCGCGAG             | -                       |
| S147         | AGATGCA GCC            | -                       | S401         | GTTGGTGCCT             | -                       |
| S149         | CTTCAACCGA             | 2~3                     | S755         | AACCGACGGG             | 9                       |
| S151         | GATGCTCAGG             | -                       | S769         | CGCGGACGAT             | 5~7                     |
| S152         | TTATCGCCCC             | 7~10                    | S788         | TGGATTA GGC            | 8~12                    |

注 Note: - 为无条带 stand for band-absent

## 1.3 DNA 提取

取 0.1 g 肌肉加 500  $\mu$ l STE (100 mM NaCl; 10 mM Tris - HCl, pH8.0; 1 mM EDTA, pH8.0) 于冰浴中匀浆, 再加 30  $\mu$ l 10% SDS 和 6  $\mu$ l 蛋白酶 K (10 mg/ml), 55 水浴 2 h 后, 37 水浴过夜。然后加等体积饱和酚充分混匀, 10 000  $\times$ g 离心 10 min; 取上清液用等体积的酚 - 氯仿 (1:1) 抽提, 10 000  $\times$ g 离心 10 min; 上清液用等体积的氯仿 - 异戊醇 (2:1) 抽提, 10 000  $\times$ g 离心 10 min; 取上清液并加 1/10 体积的 3 M NaAc (pH5.2) 和 2 倍体积的预冷的无水乙醇沉淀 DNA, -20 静置 30 min 以上, 10 000  $\times$ g 离心 10 min, 后用预冷的 70% 乙醇洗涤沉淀。最后加适量 0.1  $\times$ TE (10 mM Tris - HCl, 1 mM EDTA, pH8.0) 溶解沉淀的 DNA, 于 4 下保存备用。

## 1.4 PCR 反应和电泳

RAPD 反应体系为 25  $\mu$ l, 其中含 10 mM Tris - HCl, pH8.8; 50 mM KCl; 0.8% Nonidet P40; 2.5 mM  $MgCl_2$ ; 0.1 mM 4 种 dNTP; 0.28  $\mu$ M 引物; 25 ng 基因组 DNA; 3 U TaqDNA 聚合酶。反应混合物用 25  $\mu$ l 石蜡油覆盖, 反应程序如下: 反应混合物先在 97 预变性 10 min, 冷却后再加 Taq 酶。然后在扩增仪上进行 40 个循环, 每个循环包括 94 变性 1 min, 36 复性 1 min, 72 延伸 2 min。最后一次循环后在 72 延伸 10 min。扩增产物经 1.4% 琼脂糖凝胶电泳, 分子量标记是 DNA/ECORI + HindIII,

电泳缓冲液是  $1 \times$ TBE。溴化乙锭染色后于紫外透射仪下观察并拍照。

### 1.5 数据处理

RAPD 扩增片段共享度 (F) 根据 Nei 和 Li 的公式计算<sup>[13]</sup>:  $F = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$ 。  $N_{xy}$  为个体 x 和 y 拥有相同分子量的片段数,  $N_x$ 、 $N_y$  分别是个体 x 和 y 扩增产物 DNA 片段数。任意两个个体间的遗传距离 (D), 用公式  $D = 1 - F$  计算。

## 2 结果

### 2.1 麝的 RAPD 产物和检测结果

在选用的 42 种引物中 (每一引物至少重复 1 次以上), 11 种引物未出现扩增产物, 6 种引物扩增的条带不稳定或不清晰而不能明确计数, 25 种重复性良好。

从表 1 中可见, 在这 25 种引物中, 有 6 种即 S163、S173、S61、S89、S88、S755 呈单型, 占引物的 24%; 19 种引物呈多态性, 占引物的 76%。其中 7 种引物扩增出林麝、马麝特异性条带各 5 条, 个体特异性条带为 3 条 (见表 2)。

表 2 麝 RAPD 特有标记片段大小及其引物序列

Table 2 The fragment size of the Musk Deer's special RAPD markers and its primers

| 引物<br>Primers | 序列<br>Sequences | 麝<br>Musk deer                                | 片段大小 (bp)<br>Size |
|---------------|-----------------|---|-------------------|
| S90           | AGGGCCGTCT      | 林麝<br><i>Moschus moschiferus</i>              | 791               |
| S181          | CTACTGCGCT      | 林麝<br><i>Moschus moschiferus</i>              | 1 382             |
| S167          | CAGCGACAAG      | 马麝<br><i>Moschus chrysogaster</i>             | 2 040             |
| S788          | TGGATTAGGC      | 林麝个体 1<br>No. 1 of <i>Moschus moschiferus</i> | 3 530             |
| S174          | TGACGGCGGT      | 林麝<br><i>Moschus moschiferus</i>              | 454               |
|               |                 | 马麝<br><i>Moschus chrysogaster</i>             | 433               |
| S60           | ACCCGGTCAC      | 林麝<br><i>Moschus moschiferus</i>              | 444、1 252         |
|               |                 | 马麝<br><i>Moschus chrysogaster</i>             | 525               |
| S176          | TCTCCGCCCT      | 林麝个体 4<br>No. 4 of <i>Moschus moschiferus</i> | 685、832           |
|               |                 | 马麝<br><i>Moschus chrysogaster</i>             | 677、1 986         |

引物 S167 扩增出 1 条分子量约为 2 040bp 的马麝特异带 (图版 —a); 引物 S174 扩增出 1 条分子量约为 454bp 的林麝特有条带和 1 条分子量约为 433bp 的马麝特有条带 (图版 —b); 引物 S788 则产生了个体 1 的特异带分子量为 3 540bp (图版 —c); 林麝 4 号个体在引物 S181 的扩增下产生了 1 条分子量为 1 382bp 的特征带 (图版 —d)。仅对扩增产物电泳图谱中清晰可辨的条带进行分析, 平均每个个体获得 168 个 RAPD

标记, 单引物获得标记数在 1~14 之间, 标记的分子量在 324~3 540bp 之间。

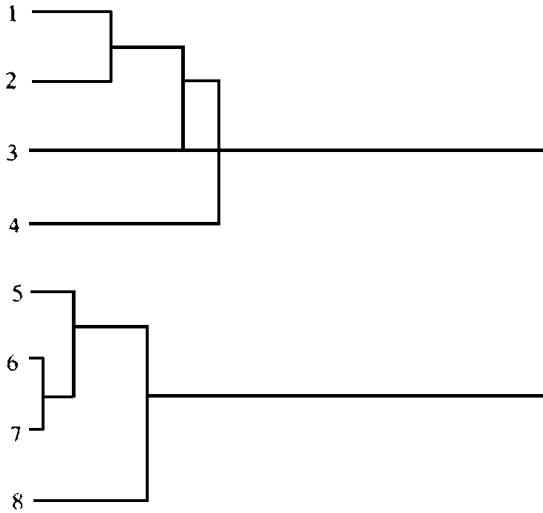


图 1 林麝和马麝 RAPD 共享片段聚类图

Fig. 1 The dendrogram based on shared fragment among 8 individuals

1、2、3、4 为林麝 1、2、3、4 for Forest musk deer; 5、6、7、8 为马麝 5、6、7、8 for Alpine musk deer

### 2.2 麝的共享度、遗传距离和聚类图

根据前面的公式计算得出林麝、马麝种内及种之间的平均共享度分别是  $0.873 \pm 0.023$ ,  $0.895 \pm 0.013$ ,  $0.759 \pm 0.02$  (见表 3); 平均遗传距离分别为  $0.127 \pm 0.023$ ,  $0.105 \pm 0.013$ ,  $0.241 \pm 0.02$  (见表 4)。根据共享度大小进行聚类分析, 构建了图 1。

## 3 讨论

### 3.1 林麝和马麝在核 DNA 上的鉴定

林麝、马麝在体色、体型及头骨结构上差异明显, 盛和林等通过比较头骨特征, 确立它们为两个独立种<sup>[1]</sup>; 根据分析 RAPD 数据得出, 林麝、马麝之间的平均共享度是  $0.759 \pm 0.02$ , 林麝种内的平均共享度是  $0.873 \pm 0.023$ , 马麝为  $0.895 \pm 0.013$  (见表 3), 这些

共有扩增片段是物种演化过程中较为保守的部分, 共享度的大小反映了物种之间亲缘关系的远近。经 *t*-检验, 种间平均共享度显著小于种内共享度, 随机扩增片段平均共享度的大小可以作为种属划分的参考依据之一。

表 3 林麝、马麝 RAPD 片段的共享度

Table 3 The proportion of RAPD fragments shared among 8 individuals

| 样品号 No. of Simple | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     |
|-------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 2                 | 0.898 |       |       |       |       |       |       |
| 3                 | 0.877 | 0.888 |       |       |       |       |       |
| 4                 | 0.832 | 0.878 | 0.867 |       |       |       |       |
| 5                 | 0.790 | 0.789 | 0.753 | 0.758 |       |       |       |
| 6                 | 0.781 | 0.780 | 0.750 | 0.772 | 0.904 |       |       |
| 7                 | 0.749 | 0.747 | 0.716 | 0.733 | 0.881 | 0.888 |       |
| 8                 | 0.766 | 0.752 | 0.746 | 0.756 | 0.901 | 0.909 | 0.886 |

表 4 林麝、马麝种内及两者之间的平均遗传距离

Table 4 Average genetic distances within and between Forest musk deer and Alpine musk deer

|                                | 林麝<br><i>Moschus moschiferus</i> | 马麝<br><i>Moschus chrysogaster</i> |
|--------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| 林麝 <i>Moschus moschiferus</i>  | $0.127 \pm 0.023$                |                                   |
| 马麝 <i>Moschus chrysogaster</i> | $0.241 \pm 0.020$                | $0.105 \pm 0.013$                 |

在所用的 25 种引物中, 6 种引物扩增出林麝、马麝特有片段 (见表 2), 这些特有

片段为种特异并为种内所有个体共有，为种间多态性。它们是物种演化中非保守的部分即变异活跃的部分，是种的鉴定标记，所以引物 S90、S181、S174、S60 可用来鉴定林麝，引物 S167、S174、S176 可用来鉴定马麝。另外，2 种引物扩增出个体特有片段，它们为某些个体所独有，称为种内多态性，种内个体间的共有和特有片段反映了遗传的同一性和变异性<sup>[8]</sup>。如果将这些特有片段回收、测序、设计相应引物，在此基础上可建立一套鉴定标准，这对那些不能用形态标记进行鉴定的材料如血液、肌肉等的鉴定很有实际意义。

### 3.2 林麝和马麝种内遗传多样性分析

遗传多样性的高低通常由遗传距离的大小来反映，种内个体间遗传距离小，彼此间亲缘关系近，说明遗传多样性低；反之，遗传距离大则遗传多样性高。从表 3 可看出，林麝、马麝之间的平均遗传距离是  $0.241 \pm 0.02$ ，林麝种内平均遗传距离是  $0.127 \pm 0.023$ ，马麝为  $0.105 \pm 0.013$ ，种间差异明显大于种内差异，林麝种内平均遗传距离大于马麝，这可能是由于林麝取自不同的饲养场，彼此间隔较远，属于不同的种群，而马麝来自兴隆山同一饲养场，属于同一个种群。

从图 1 聚类结果看，同种内不同个体首先互相聚在一起，最后才是两个种的互聚，图 1 中最先聚在一起的是个体 6、8，它们系母子关系，亲缘关系自然很近，接着是个体 5，再是个体 1、2，然后是个体 7，紧跟着是个体 3，然后是个体 4，最后是两种互聚在一起，马麝个体间相对距离为 0.02，林麝个体间相对距离是 0.015，两种内相对距离为 0.095，是种内个体间相对距离的 4.5~6.3 倍，这进一步说明种间差异显著大于种内差异，从图 1 也可看出马麝种内个体间平均遗传距离比林麝种内的小，遗传多样性低，可以推测，马麝种群如果再这样自行繁殖下去，它们间的遗传距离会越来越小，最终会导致近亲衰退，这是人工饲养中易出现的问题，因为饲养种群往往是小种群。在饲养麝的过程中，麝的繁殖力、存活率及产香量等关键性问题常制约着人工养麝业的发展，幼麝存活率不高的问题尤其突出，食物、生境等外部因素是原因，但问题的关键可能是近亲繁殖引起种的衰退，本实验因受实验材料的限制，如果有林麝、马麝连续 4 代的材料，用该技术比较每一代的遗传多样性，可能很好地证明这一点。从分析结果看，为了增加该马麝种群的生存力，最好从野外不同种群中引入种麝进行繁殖。

用 RAPD 技术分析物种遗传多样性，根据其遗传距离的大小在繁殖策略中可选择遗传距离远的个体进行交配，也可让获得野生种参与繁殖，这是饲养麝过程中防止近亲衰退的有效途径。

从实验结果看 RAPD 技术具有良好的分辨率，在所用的 25 种引物中，没有发现任何 2 个个体具有相同的 RAPD 标记，事实上，每个个体均有其特定的 RAPD 标记，只要增加引物，势必会找到这些特定标记。实践证明，利用 RAPD 技术分析麝的基因组 DNA，方法简便，快速，只要在实验中严格控制影响 RAPD 的各个因素，其结果重复性较好。

## 参 考 文 献

- [1] 盛和林等. 中国鹿类动物 [M]. 上海: 华东师范大学出版社, 1992. 45~89.

- [2] 林忠, 徐宏发, 盛和林. 林麝妊娠期和哺乳期的能量代谢特征 [J]. 兽类学报, 1995, **15** (2): 98~105.
- [3] Shi Liming, Ma K. The mitotic and synaptonemal karyotypes of the musk deer, *Moschus berezovkii* [J]. *Mammalian chromosomes newsletter*, 1986, (2): 103~108.
- [4] 郭健民, 王建华, 范晖, 邓凤鸣, 张治国. 林麝核型研究初报 [J]. 兽类学报, 1988, **8** (1): 73~75.
- [5] Lang Hong, Shi Liming. Restriction endonuclear analysis of mtDNA of *Munjac* and related Deer. In: Ohtaishi N, Sheng Heling eds. *Deer of China* [C]. Elsevier Science Publishers B V, 1993. 22~30.
- [6] Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, Rafalski J A, Tingey S V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primer are useful as genetic markers [J]. *Nucleic Acids Res*, 1990, **18** (22): 6531~6535.
- [7] Welsh J, Peterson C, McClelland M. Polymorphism generated by arbitrary primers in the mouse application to strain identification and genetic mapping [J]. *Nucl Acids Res*, 1991, **19**: 303~306.
- [8] 王义权, 周开亚, 秦树臻. 用 RAPD 标记检测六种蛇基因组 DNA 多态性 [J]. 动物学报, 1996, **42** (2): 172~181.
- [9] 陈永久, 张亚平, 齐瑾, 刘瑞清. 中国貉随机扩增多态 DNA 及其亚种分化关系 [J]. 遗传学报, 1998, **25** (1): 16~21.
- [10] 兰宏, 张文艳, 王文, 宿兵, 施立明. 滇金丝猴的随机扩增多态 DNA 与遗传多样性分析 [J]. 中国科学 (c 辑), 1995, **26** (3): 244~249.
- [11] Hidetoshi B, Tamate, Kiyotaka Shibata, Takeshi Tsuchiya, Noriyuki Ohtaishi. Assessment of genetic variations within populations of sika deer in Japan by analysis of randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) [J]. *Zoological Science*, 1995, **12**: 669~673.
- [12] Coppenoll D V, Watanabe I, Van Hove C, Second G, Huang N, McCouch S R. Genetic diversity and phylogeny analysis of *Azolla* based on DNA amplification by arbitrary primers [J]. *Genome*, 1993, **36**: 686~693.
- [13] Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers [J]. *Nucleic Acids Res*, 1990, **18** (24): 7213~7218.
- [14] Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic distance in terms of restriction endonucleases [C]. *Proceeding of the National Academy of Science*, 1979. **76**: 5269~5273.

## STUDIES ON FOREST MUSK DEER AND ALPINE MUSK DEER USING RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA (RAPD)

BAO Huifang XU Hongfa LU Houji

(Department of Biology, East China Normal University, Shanghai, 200062)

**Abstract** : Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) was employed to screen the genetic markers in Forest musk deer and Alpine musk deer. About 168 RAPD markers were generated in each individual with 42 primers, 5 special markers were found in Forest musk deer and Alpine musk deer respectively, and also 3 individual special markers were generated, these can be used to identify species or individuals. The average genetic distances in Forest musk deer and Alpine musk deer and between them were  $0.124 \pm 0.023$ ,  $0.105 \pm 0.013$ ,  $0.241 \pm 0.020$ , respectively. The results indicated that the difference detected by proportion of shared fragments between the species was obviously larger than those within a species. The population of Alpine musk deer need new individuals from different populations to avoid inbreeding depression.

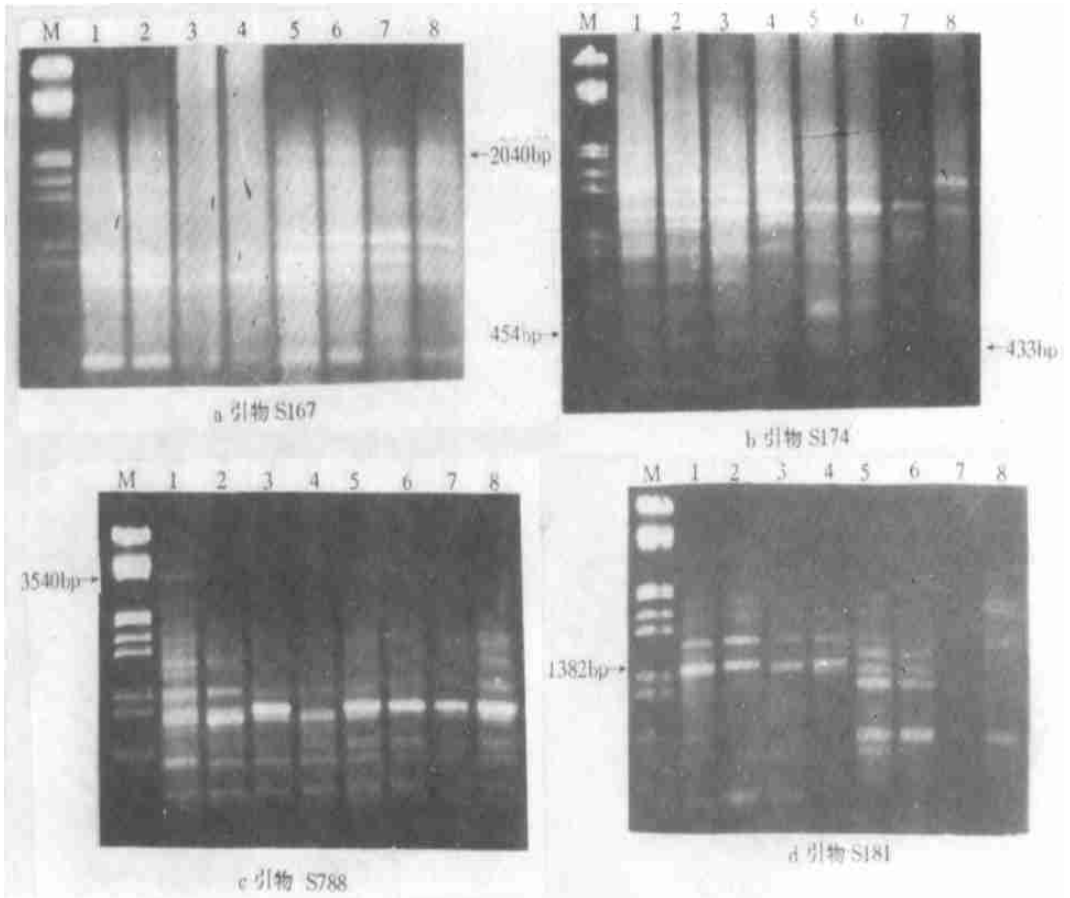
**Key words** : Forest musk deer (*Moschus moschiferus*); Alpine musk deer (*Moschus chrysogaster*); RAPD

包惠芳等：林麝和马麝随机扩增多态 DNA 的研究

图版

Bao Huifang et al: Studies on Forest Musk Deer and Alpine Musk Deer using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

Plate



## 图版说明

M: 标记 Marker; 1, 2, 3, 4 号为林麝 1, 2, 3, 4 for Forest musk deer;  
5, 6, 7, 8 为马麝 5, 6, 7, 8 for Alpine musk deer