

# 饲养东北虎的微卫星变异研究

张于光<sup>1,2</sup>, 李迪强<sup>1</sup>, 肖启明<sup>2</sup>, 饶力群<sup>3</sup>, 张学文<sup>3</sup>

(1. 中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所, 北京, 100091;

2. 湖南农业大学生物安全科技学院, 长沙 410128; 3. 湖南农业大学理学院, 长沙 410128)

**摘要:** 东北虎是世界上濒危动物之一, 具有极其重要的研究价值和保护意义。该研究利用 10 个在东北虎基因组中表现多态性的微卫星基因座 (*Fca005*, *Fca075*, *Fca094*, *Fca152*, *Fca161*, *Fca294*, *Pti002*, *Pti003*, *Pti007* 和 *Pti010*) 对 113 只饲养东北虎进行了遗传多样性检测。用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测微卫星的 PCR 扩增产物, 计算了 10 个微卫星基因座的等位基因频率、基因杂合度、多态信息含量和有效等位基因数。在 113 只东北虎样品中, 10 个基因座的等位基因数为 3~6 个, 其中 *Fca152* 最多; 等位基因频率处于 0.009~0.767 之间。基因杂合度值在 0.385~0.707 间, 平均为 0.616, 多态信息含量值在 0.353~0.658 间, 平均为 0.558, 有效等位基因数处于 1.629~3.409 之间, 平均为 2.784, 表明所选用的 10 个微卫星基因座在研究样品中均为中高度多态性基因座, 具有比较明显的遗传变异。113 只样品中包括 75 只毛发样品, 23 只血液样品和 15 只组织样品, 不同样品的结果比较表明, 毛发、血液和组织样品均可以得到清晰的扩增结果。所以, 微卫星基因座与非损伤性 DNA 分析方法可以成功地应用于濒危珍稀动物的遗传多样性研究。

**关键词:** 东北虎; 微卫星基因座; 遗传变异

中图分类号: Q953

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2004)05-0620-05

## Genetic Diversity of Microsatellite Loci in Captive Amur Tigers

ZHANG Yu-Guang<sup>1,2</sup>, LI Di-Qiang<sup>1</sup>, XIAO Qi-Ming<sup>2</sup>, RAO Li-Qun<sup>3</sup>, ZHANG Xue-Wen<sup>3</sup>

(1. Institute of Forestry Ecology, Environment and Protection, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China;

2. College of Biosafety Science and Technology of Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China;

3. College of Sciences of Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

**Abstract:** The tiger is one of the most threatened wildlife species since the abundance and distribution of tiger have decreased dramatically in the last century. The wild Amur tiger (*Panthera tigris altaica*) only distributed in northeast China, the far east area of Russia and the north Korea and its size of wild population is about 450 in the world and 20 in China. Several hundred captive populations of Amur tigers are the main source to protect gene library of tiger and the source of recovering the wild populations. The Breeding Center for Felidae at Hengdaohezi and Ha'erbin Tiger Park in Heilongjiang Province is the biggest captive breeding base in China. How to make clear the genetic pedigree and establish reasonable breeding system is the urgent issues. So we use the microsatellite DNA markers and non-invasive technology to research on the genetic diversity of captive Amur tiger in this study.

Ten microsatellite loci (*Fca005*, *Fca075*, *Fca094*, *Fca152*, *Fca161*, *Fca294*, *Pti002*, *Pti003*, *Pti007* and *Pti010*), highly variable nuclear markers, were studied their genetic diversity in 113 captive Amur tigers. The PCR amplified

收稿日期: 2003-09-16; 修回日期: 2003-11-27

基金项目: 国家科技部社会公益项目“濒危动物保护技术”(No. 2001DIB100058)资助 [Supported by a grant from Conservation Technology for Endangered Wildlife Program, Social Service Project of the Ministry of Science and Technology (No. 2001DIB100058)]

作者简介: 张于光 (1976—), 男, 汉族, 湖南湘乡人, 博士研究生, 专业方向: 分子遗传学。E-mail: yugzhang@sina.com.cn

通讯作者: 李迪强 (1966—), 男, 副研究员, 研究方向: 野生动物保护学。Tel: 86-10-62889551; E-mail: reserve@caf.ac.cn

致谢: 本研究在样品的采集中得到了黑龙江省东北虎林园刘丹、马国庆等同志的大力支持和帮助, 所用 Labwork 分析软件由湖南农业大学苏建明老师等提供, 谨在此一并感谢。

products of microsatellite loci were detected by non-denatured polyacrylamide gel electrophoresis. Allele numbers, allelic frequency, gene heterozygosity ( $H_e$ ), polymorphism information content (PIC) and effective number of allele ( $N_e$ ) were calculated. 41 alleles were found and their size were ranged from 110bp to 250bp in ten microsatellite loci, *Fca152* had 6 alleles, *Fca075*, *Fca094* and *Fca294* had 5 alleles, *Fca005* and *Pti002* had 4 alleles and the others had 3 alleles in all tiger samples, respectively. The allelic frequencies were from 0.009 to 0.767; The  $H_e$  ranged from 0.385 to 0.707, and *Fca294* and *Pti010* locus had the highest and lowest value; the PIC were from 0.353 to 0.658, *Fca294* and *Pti010* locus had the highest and lowest value; and  $N_e$  were from 1.626 to 3.409, *Fca294* and *Pti010* locus had the highest and lowest value, which showed the ten microsatellite loci had high or medium polymorphism in these Amur tigers and had high genetic diversity. At the same time, we only found even bases variability which showed the even bases repeat sequence (CA/GT) maybe the basic unit for length variability of microsatellite in all loci.

In this study, the samples were made up of 75 hair specimens, 23 blood specimens and 15 tissue specimens, we obtained the genome DNA from hairs using the non-invasive DNA technology and demonstrated that DNA derived from hair samples is as good as that obtained from blood samples for the analysis of microsatellite polymorphism. These results imply that microsatellite DNA markers and non-invasive DNA technology can help study the genetic diversity of Amur tiger. This method could be used in the captive management of other endangered species.

**Key words:** Amur tiger; microsatellite locus; genetic diversity

微卫星 DNA (Microsatellite DNA), 又称短串联重复序列 (STR), 是基因组中广泛存在的一种重复序列<sup>[1]</sup>。它散布于整个基因组中, 具有高度的多态性, 能稳定地遗传, 有效信息含量高, 符合孟德尔共显性遗传规律, 扩增技术简单等特点。它已经逐步成为分子生物学研究中应用最广泛的分子标记之一, 被广泛应用于多种动植物的分子遗传学研究<sup>[2~6]</sup>。

东北虎 (*Panthera tigris altaica*) 濒临灭绝, 而且性情凶猛, 很难采集到研究材料, 因而关于东北虎在遗传方面的研究报道很少。陆佩洪等做了华南虎和东北虎血清同工酶的研究<sup>[7]</sup>, 吴平等报道了用 RFLP 和 PCR-RFLP 进行华南虎与东北虎的线粒体研究<sup>[8]</sup>, 在他们的研究中无论是染色体、同工酶还是线粒体都没有发现来源不同个体间存在明显的差异, 因此表明了这些种群的遗传多样性丧失严重, 同时这些研究方法也受到了灵敏度和样品来源的双重限制。Menotti-Raymond 等利用家猫的微卫星基因座成功地在东北虎中扩增到相应的等位基因, 并对虎的分类进行了鉴定<sup>[9]</sup>。张于光等利用从家猫和苏门答腊虎的微卫星基因座中筛选到的 10 对引物, 对 7 只父子关系不清的东北虎成功地进行了亲子鉴定<sup>[10]</sup>。为了进一步研究我国饲养东北虎的遗传现状, 同时制定有效的繁殖计划, 以增加东北虎的遗传多样性和扩大种群数量, 我们必须建立一种高灵敏、易于操作和非损伤 (non-invasive) 的方法, 使东北虎遗传多样性研究更加简便易行。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验样品

本研究所用样品是从黑龙江省横道河子猫科动物繁殖中心和哈尔滨东北虎林园采集得到。共采集到 113 只东北虎的样品, 其中毛发样品 75 只, 血液样品 23 只和毛皮组织样品 15 只。血液样品放入含抗凝剂的离心管中, 与毛发样品和组织样品一同置于  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱内保存备用。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 DNA 的提取

- (1) 全血 DNA 的提取, 按照常规方法进行<sup>[11]</sup>。
- (2) 毛发 DNA 的提取, 参照张于光等的方法<sup>[10]</sup>。
- (3) 毛皮组织 DNA 的提取: 称取毛皮组织 1g, 用干净的剪刀将组织剪碎置于 2mL 离心管; 在离心管中加入 500 $\mu\text{L}$  TEN 溶液, 25 $\mu\text{L}$  蛋白酶 K, 75 $\mu\text{L}$  10% SDS; 混匀后置于  $56^{\circ}\text{C}$  水浴 4h, 隔一定时间混匀一次; 再按照常规方法提取。

#### 1.2.2 微卫星基因座

在本研究中, 我们选取了 10 对微卫星引物 (*Fca005*, *Fca075*, *Fca094*, *Fca152*, *Fca161*, *Fca294*, *Pti002*, *Pti003*, *Pti007*, *Pti010*), 引物序列参见张于光等, 利用这 10 对引物在东北虎 DNA 基因组中都能扩增到较好的多态性基因<sup>[10]</sup>。

#### 1.2.3 PCR 扩增与产物的检测

PCR 扩增的条件、8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳和

银染染色的具体方法同文献[10]。

#### 1.2.4 结果的判定

将染色后的聚丙烯酰胺凝胶放入凝胶成像系统,用凝胶分析软件 Labwork(3.0.2 版本)计算各个微卫星等位基因的大小。

#### 1.2.5 数据的统计处理

根据实验结果,计算 10 个微卫星基因座的等位基因频率<sup>[12]</sup>,基因杂合度<sup>[13]</sup>,座位多态信息含量<sup>[14]</sup>,有效等位基因数<sup>[15]</sup>。

#### 1.2.6 微卫星序列克隆测序与分析

对其中的 2 个微卫星基因座随机挑出 1 个纯合基因型的 PCR 扩增片段,在 2.0% 的琼脂糖凝胶中电泳并回收目标片段,与 pGEM-T Easy 载体连接,

转化到大肠杆菌 DH5 $\alpha$  上,经培养后挑取白色单菌落进行测序。

## 2 结 果

### 2.1 等位基因数目和频率

根据 Labwork 软件和观察确定各基因座等位基因的大小和数目,所有等位基因大小在 110~250bp 之间,10 个基因座的等位基因数目均在 3~6 个之间,共得到 41 个等位基因,其中 *Fca152* 共检测到 6 个等位基因,*Fca075*、*Fca094*、*Fca294* 均有 5 个等位基因,*Fca005*、*Pti002* 均发现 4 个等位基因,*Fca161*、*Pti003*、*Pti007* 和 *Pti010* 则均有 3 个等位基因,等位基因大小和基因频率见表 1。

表 1 10 个微卫星基因座在 113 只东北虎中的等位基因频率分布

Table 1 Allele frequencies for 10 microsatellite loci in 113 Amur tigers

基因座 Locus	等位基因大小幅度(bp)/基因频率 Allelic size range/allelic frequency	基因座 Locus	等位基因大小幅度(bp)/基因频率 Allelic size range/allelic frequency
<i>Fca005</i>	144(0.219), 150(0.364), 156(0.066), 160(0.351),	<i>Fca075</i>	116(0.425), 122(0.035), 124(0.342), 128(0.127), 136(0.070),
<i>Fca094</i>	198(0.250), 202(0.057), 208(0.425), 214(0.039), 218(0.232),	<i>Fca152</i>	140(0.013), 146(0.206), 150(0.009), 156(0.439), 164(0.083), 168(0.250),
<i>Fca161</i>	178(0.254), 194(0.531), 218(0.215)	<i>Fca294</i>	234(0.421), 236(0.101), 242(0.241), 246(0.219), 250(0.018),
<i>Pti002</i>	200(0.298), 206(0.009), 208(0.596), 216(0.096),	<i>Pti007</i>	144(0.504), 150(0.307), 152(0.189),
<i>Pti003</i>	110(0.158), 116(0.531), 122(0.311),	<i>Pti010</i>	128(0.101), 132(0.767), 136(0.132),

### 2.2 10 个微卫星基因座的多态性统计结果

根据表 1 中微卫星基因座的等位基因频率,计算了 10 个微卫星基因座在样品中的基因杂合度、多态信息含量和有效等位基因数(表 2)。从表 2 中的结果可以看出 10 个微卫星基因座的杂合度处于 0.385~0.707 间,其中 *Fca294* 最大,而 *Pti010* 最小,平均杂合度为 0.616。10 个微卫星基因座的多态信息含量值在 0.353~0.658 间,其中 *Fca294* 最大,*Pti010* 最小,平均多态信息含量为 0.558。另外,10 个微卫星基因座的有效等位基因数处于 1.629~3.409 之间,*Fca294* 最大,*Pti010* 最小,平均有效等位基因数为 2.784。所以,在 10 个微卫星基因座中,*Fca294* 具有最大的遗传变异,*Pti010* 具有最小的遗传变异。

### 2.3 测序结果

对东北虎的 *Pti003* 和 *Pti010* 微卫星基因座的 PCR 扩增片段进行测序,得到的结果已经被 GenBank 接受,相关结果见表 3。

表 2 10 个微卫星基因座在 113 只东北虎中的基因杂合度、多态信息含量和有效等位基因数

Table 2 Genetic heterozygosity, polymorphism information content and effective number of alleles of 10 microsatellite loci in 113 Amur tigers

基因座 Locus	等位基因数 Alleles	基因杂合度 Genetic heterozygosity	多态信息含量 Polymorphism information content	有效等位基因数 Effective number of alleles
<i>Fca005</i>	4	0.693	0.637	3.257
<i>Fca075</i>	5	0.680	0.625	3.125
<i>Fca094</i>	5	0.698	0.646	3.311
<i>Fca152</i>	6	0.633	0.546	3.279
<i>Fca161</i>	3	0.607	0.538	2.545
<i>Fca294</i>	5	0.707	0.658	3.409
<i>Pti002</i>	4	0.547	0.476	2.208
<i>Pti003</i>	3	0.596	0.562	2.475
<i>Pti007</i>	3	0.616	0.543	2.604
<i>Pti010</i>	3	0.385	0.353	1.626
平均(Mean)	4.1	0.616	0.558	2.784

表 3 东北虎 2 个微卫星基因座克隆的测序结果  
Table 3 Sequences of clones of 2 microsatellite loci in Amur tiger

微卫星基因座 Micrsatellite locus	GenBank 登录号 No. of GenBank accession	序列 Sequences
<i>Pti003</i>	AY266360	ccttcagga tgccactctg agtgtgtgtg tgt-gcgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg aaatttca ctgcctaag taagagcagc atttctgaaa atgtcatga gaataa
<i>Pti010</i>	AY266361	gggacaactg agagaagaag gaatcttcac cctgtttccc atagaacagt accaggaggg ca-caaaaacc cagaggttac atatatatat acacacac acacacacac agtctgagaa catatctt

使用 BLAST 软件(GenBank),对测序结果 *Pti003* 和 *Pti010* 分别与 GenBank 登录的苏门答腊虎 (*Panthera tigris sumatrae*) 的 *Pti003* 序列(登录号为 AF296747)和 *Pti010* 序列(登录号为 AF296750)进行同源性比较,其同源性分别为 94% 和 93%。同时,序列中的 TG/AC 串联重复表明,双碱基的重复序列是微卫星基因座长度变异的基本单位。

## 2.4 不同样品结果的比较

本研究采用了毛发、组织和血液样品,结果在毛发 DNA、组织 DNA 和血液 DNA 中,我们均得到了较好的扩增效果,如图 1 所示。

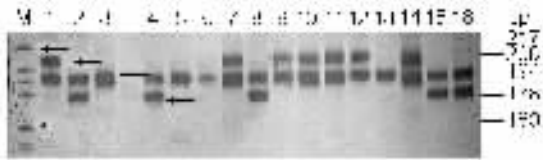


图 1 微卫星位点 *Fca161* 部分扩增结果

1~9 为毛发样品;10~13 为组织样品;

14~16 为血液样品;M 为 pBR322/MspI Marker。

Fig. 1 The amplification result of locus *Fca161*

Lines 1~9: hair samples, lines 10~13: tissue samples,

lines 14~16: blood samples, M: pBR322/MspI Marker.

## 3 讨 论

微卫星是指以少数几个核苷酸为单位的多次串联重复 DNA 序列,其中两核苷酸的重复频率最高<sup>[1]</sup>。本研究采用的 10 个微卫星基因座,在 113 个样品中共产生 41 个等位基因,通过 Labwork 软件分析,我们发现所有等位基因均为偶数碱基长度变异。这一结果表明,双碱基的重复序列基本结构单

位可能是等位基因长度变异的基本单位。同时与张亚平等<sup>[16]</sup>、刘静霞等<sup>[2]</sup>的研究结果相似。但是,基于 PCR 产物的长度来判断等位基因的重复数目,可能会导致一些偏差,一个更为精确的测定微卫星的方法是运用诸如 DNA 芯片(DNA chip)这样的新技术,直接测出重复片段的数目<sup>[17]</sup>。

基因杂合度一般认为是度量群体遗传变异的一个最适函数,从表 2 中可以看出各基因座的杂合度,其中 *Fca294* 的基因杂合度最高,而 *Pti010* 的基因杂合度最低,10 个基因座的平均杂合度为 0.616。可见,这 10 个微卫星基因座在该饲养东北虎种群中具有较低的纯合度,表明该研究种群中具有一定程度的遗传多样性。相对于小种群来说,本研究的结果是比较理想的。如 Zhou 等研究 23 个高度近交系鸡的遗传特性时发现,其基因杂合度大多在 0.50 以下,而最低的只有 0.04<sup>[18]</sup>。屈彦纯等用 8 个微卫星基因座研究猪的 F<sub>2</sub> 自交群体时得到其基因杂合度处于 0.397~0.677 之间<sup>[19]</sup>。

多态信息含量是等位基因频率和数目变化的函数,反映着基因变异程度的高低。从表 2 中可以看出 10 个微卫星基因座在东北虎的多态信息含量的分布,其中 *Fca294* 最大,*Pti010* 最小。根据 Bostein 等提出的衡量基因变异程度高低的多态信息含量指标,当 PIC $\geq$ 0.5 时,该基因座为高度多态基因座,当 PIC $\leq$ 0.25 时,为低度多态基因座,当处于两者之间时,为中度基因座<sup>[14]</sup>。由此可见,我们选择的微卫星基因座在研究样品中均具有中高度多态性。

有效等位基因数,也可以作为群体遗传变异的一个测度,反映了基因座等位基因间的相互影响。从表 2 中有效等位基因数的分布情况可以看出,其中 *Fca294* 最多,*Pti010* 最小。同时从表 2 中观察到的等位基因数和计算得到的有效等位基因数比较可以发现,往往观察到的等位基因数要大于计算的有效等位基因数,如 *Fca152* 中观察得到 6 个等位基因,而计算得到的有效等位基因数却只有 3.279。只有在各个等位基因出现的频率基本相同时,有效等位基因数才会接近于实际观察到的等位基因数,如 *Fca161* 中观察到 3 个等位基因,而计算得到的有效等位基因数为 2.545。所以,观察到的等位基因数并不能完全反映群体的遗传变异,只有那些等位基因出现频率相同的基因座才能真实地反映群体的遗传多样性,因此,应该采用有效等位基因数来衡

量物种的遗传多样性。

东北虎数量稀少,生性凶猛,很难采集到适合的研究材料。本研究中,我们利用微卫星 DNA 标记技术和非损伤性 DNA 分析技术相结合,取得了较为理想的结果。但是,提取的毛发 DNA 因为含量少,在进行 PCR 扩增中,需要对 DNA 的量进行反复摸索。有时可能会因为 DNA 量太少而没有扩增产物,有时因为 DNA 的量太多,而扩增产物中含有较多的非特异带,所以需要进行反复摸索。这一高灵敏度、非损伤性和简便可靠的实验方法的建立,将对濒危动物的遗传多样性特别是如东北虎这样的濒危和性情凶猛动物的研究,起到重要的促进作用。

另外,微卫星基因座数目的多少对于研究结果的精确性和可靠性也是至关重要的。目前已发表的许多论文中,利用 3~20 个微卫星标记对种群遗传变异的研究都得到了较好的结果,但微卫星的优势将因标记数目的减少而大受折扣<sup>[20]</sup>。因而,为了进一步探讨我国饲养东北虎的遗传现状,我们需要寻找更多的微卫星位点,尽可能覆盖整个东北虎 DNA 基因组,使得研究结果更加精确和可靠。

## 参 考 文 献 (References):

- [1] Tautz D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic acid res*, 1989, 17: 6463~6471.
- [2] LIU Jing-Xia, ZHOU Li, ZHOU Zhen-Shan, GUI Jian-Fang. Studies on microsatellite markers of four artificially gynogentic families in Ornamental Carp. *Zool Res*, 2002, 23(2): 97~102.  
刘静霞,周莉,赵振山,桂建芳. 锦鲤 4 个人工雌核发育家系的微卫星标记研究. *动物学研究*, 2002, 23(2): 97~102.
- [3] Hearne C M, Ghosh S, Todd J A. Microsatellites for linkage analysis of genetic traits. *Trends Genet*, 1992, 8: 288~294.
- [4] Stallings R L. Evolution and distribution of (GT)<sub>n</sub> repetitive sequences in mammalian genomes. *Genomes*, 1991, 10: 807~815.
- [5] Jin L, Zhong Y, Chakraborty R. The exact numbers of possible microsatellites motifs. *Am J Hum Genet*, 1994, 55: 582~583.
- [6] Gardner M G, Cooper S J B, Bull C M, Arevalo E. Isolation of microsatellites loci from a social Lizard (*Egernia stokesii*), using a modified enrichment procedure. *The Journal of Heredity*, 1999, 90(2): 301~304.
- [7] LU Pei-Hong, ZHANG Xi-Ran, LIU Miao, HONG Xing, CHEN Yi-Feng, HUANG Gong-Qing. Studies on the isozymes in *P. t. amoyensis* and *P. t. amuresis*. *Journal of Nanjing Normal University*, 1995, 18(1): 81~84.  
陆佩洪,张锡然,刘淼,红星,陈宜峰,黄恭情. 华南虎与东北虎血清同工酶的研究. *南京师范大学学报*, 1995, 18(1): 81~84.
- [8] WU Ping, ZHOU Kai-Ya, WANG Ya-Ming, HUANG Gong-Qing, XU Lin-Mu. Mitochondrial DNA polymorphism between Siberian tiger and South China tiger revealed by mtDNA RFLP and PCR-RFLP. *Chinese Biodiversity*, 1997, 5(3): 173~178.  
吴平,周开亚,王亚明,黄恭情,徐麟木. 用 RFLP 和 PCR-RFLP 技术研究东北虎和华南虎线粒体 DNA 的多态性. *生物多样性*, 1997, 5(3): 173~178.
- [9] Menotti-Raymond M, David V A, Stephens J C, O'Brein S J. Genetic individualization of domestic cats using feline STR loci for forensic analysis. *Journal of Forensic Science*, 1997, 42: 1037~1050.
- [10] ZHANG Yu-Guang, LI Di-Qiang, RAO Li-Qun, XIAO Qi-Ming. Identification of polymorphic microsatellite DNA locus and paternity test of Amur tiger. *Acta Zoologica Sinica*, 2003, 49(1): 118~123.  
张于光,李迪强,饶力群,肖启明. 东北虎微卫星 DNA 遗传标记的筛选及在亲子鉴定中的应用. *动物学报*, 2003, 49(1): 118~123.
- [11] CAI Liang-Wan. *Nucleotide Research Technology*. Beijing: Science Technology Press, 1987, 1~6.  
蔡良琬. 核酸技术研究. 北京: 科学技术出版社, 1987, 1~6.
- [12] Nei M. *Molecular evolutionary genetics*. New York: Columbia Univ, Press, 1987, 111~124.
- [13] Nei M, Roychoudhury A K. Sampling variance of heterozygosity and genetic distance. *Genetics*, 1974, 76: 379~390.
- [14] Bostein D, White R, Skolnick M. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length diversity. *Am J Hum Genet*, 1980, 32: 314~331.
- [15] Kimura M, Crow J F. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics*, 1974, 49: 725~738.
- [16] ZHANG Ya-Ping, WANG Wen, SU Bing, FAN Zhi-Yong, ZHANG He-Min, HE Ting-Mei. Microsatellite DNA and kinship identification of Giant Panda. *Zool Res*, 1995, 16(4): 301~306.  
张亚平,王文,宿兵,范志勇,张和民,何廷美. 大熊猫微卫星 DNA 的筛选及其应用. *动物学研究*, 1995, 16(4): 301~306.
- [17] Southern E M. DNA chip: analysing sequence by hybridization to oligonucleotides on a large scale. *Trends Genet*, 1996, 12: 110~115.
- [18] Zhou H, Lamont S J. Genetic characterization of biodiversity in highly inbred chicken lines by microsatellite markers. *Animal Genetics*, 1999, 30: 256~264.
- [19] QU Yan-Chun, DENG Chang-Yan, XIONG Yuan-Zhu, SU Yu-Hong, ZHENG Rong, LIU Gui-lan. The Microsatellite polymorphism research on Porcine chromosome 1 and the construction of its genetic map. *Hereditas (Beijing)*, 2002, 24(5): 539~542.  
屈彦纯,邓昌彦,熊远著,苏玉虹,郑嵘,刘桂兰. 猪 1 号染色体微卫星多态性研究及遗传连锁图谱的构建. *遗传*, 2002, 24(5): 539~542.
- [20] Meglecz E, Pecsenge K, Varga Z. Comparison of different pattern at allozyme and microsatellite loci in *Parnassius mnemosyne* populations. *Hereditas*, 1998, 128: 95~103.