

筛选普氏原羚粪便 DNA 中微卫星引物 并应用于个体识别

洪艳云^{1,2}, 李迪强², 易图永¹, 张于光², 刘毅¹

(¹ 湖南农业大学, 长沙 410128; ² 中国林业科学院森态与环境保护研究所, 北京 100091)

摘要:为了更好地保护极度濒危的普氏原羚物种, 选择非损伤性样品 - 粪便作为研究材料, 选用 10 对非洲麋羚微卫星引物和 10 对绵羊微卫星引物作为筛选普氏原羚基因组 DNA 微卫星位点的引物。通过非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测微卫星 PCR 的扩增产物, 结果发现 20 对引物中有 8 对引物在普氏原羚基因组 DNA 中扩增出了多态性位点。通过等位基因数目和等位基因频率对这 8 个位点的基因杂合度、多态性信息含量、有效等位基因数进行了计算, 结果发现这 8 个位点在 39 个普氏原羚粪便样品中的基因杂合度介于 0.71~0.84, 平均杂合度为 0.78; 多态性信息含量介于 0.79~0.66, 平均多态信息含量为 0.73; 有效等位基因数介于 3.40~6.08, 平均有效等位基因为 5.98, 这表明所筛选到的 8 个微卫星基因座在研究普氏原羚粪便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, 完全适合普氏原羚各种分子遗传分析。因此试验应用这 8 对多态性引物对 39 个粪便样品的个体进行识别, 发现这 39 个粪便样品来自 35 个不同的个体。

关键词:普氏原羚; 微卫星引物; 个体识别; 粪便 DNA

中图分类号:Q953 **文献标识码:**A

Screening Microsatellite Primers and their Application for Individual Identification in Faecal DNA from *Procapra praprzewalskii*

Hong Yanyun^{1,2}, Li Diqiang², Yi Tuyong¹, Zhang Yuguang², Liu Yi¹

(¹Hunan Agricultural University, Changsha 410128;

²Institute of Forestry Ecology, Environment and Protection, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091)

Abstract: To protect *Procapra praprzewalskii* appointed as CR (Critically Endangered), twenty pairs of microsatellite primers from Granti's gazelle and sheep separately were used to screen microsatellite locus in faecal DNA from *Procapra praprzewalskii*, eight polymorphism loci was found. The PCR amplified products of microsatellite loci were detected by non-denatured polyacrylamide gel electrophoresis. Gene heterozygosity (He), polymorphism information content (PIC) and effective number of allele (Ne) from the eight loci were calculated by allele numbers and allelic frequency. The heterozygosity (He) ranged from 0.71 to 0.84, the average was 0.78; the PIC were from 0.79 to 0.66, their average was 0.73; and Ne were from 3.40 to 6.08, the average was 5.98; which showed the eight microsatellite loci had high or medium polymorphism in the *Procapra praprzewalskii* and had high genetic diversity. So the 8 loci were use to identify Individual, the result was 35 individuals from 39 faecal samples from *Procapra praprzewalskii*.

Key words: *Procapra praprzewalskii*, microsatellite, individual identification, faecal DNA

基金项目: 国家科技部社会公益性项目:“濒危动物保护技术研究”(2001DIH10058)和国家自然科学基金项目:“普氏原羚生境选择与空间异质性动态研究”(30370217)资助。

第一作者简介: 洪艳云, 女, 1973 年出生, 湖南邵东人, 博士研究生, 研究方向为动物分子生物学。通信地址: 410128 湖南长沙湖南农业大学实管中心, Tel: 0731-6126582, E-mail: hongyanyun@126.com。

通讯作者: 李迪强, 男, 1966 年出生, 湖南湘乡人, 副研究员, 博士学历, 研究方向为野生动物保护学。通信地址: 100091 北京中国林业科学研究院森态与环境保护研究所, Tel: 010-62889551, E-mail: diqianli@yahoo.com.cn。

收稿日期: 2008-06-19, 修回日期: 2008-07-12。

普氏原羚(*Pracapra przewalskii*), 又名滩原羚、滩黄羊、是中国特有的羚羊种^[1], 且国际自然保护联盟(IUCN)物种生存委员会在1996年将普氏原羚列为极度濒危级(CR)^[2]。为了保护极度濒危的普氏原羚, 蒋志刚和李迪强等专家已经对普氏原羚的食性、生境选择、种群生存力等宏观方面作了大量的研究^[3-11]。随着分子生物学的发展, 人们保护普氏原羚的研究工作也从宏观转向微观, 雷润华等^[12]人就利用线粒体分子标记对普氏原羚的分类地位进行了研究。

微卫星(simple sequence repeat, SSR)是指基因组中以2~6个碱基为一个单位的重复序列。由于微卫星具有高度多态性, 呈共显性遗传, 遍布于整个基因组且分布均匀, 因此被广泛应用于动物遗传分析。如张于光等^[13]应用微卫星标记对东北虎进行了亲子鉴定、Koskinen M.T 等^[14,15]应用微卫星分析种群遗传结构、Wisely S.M 等^[16]应用微卫星标记揭示了 black-footed ferrets 物种进化历史, 潘志萍等^[17]应用微卫星对桔小实蝇的抗性进行了研究, 李猛华和范晶^[18-21]等人将微卫星标记应用于个体识别的研究, 周慧等^[22]应用微卫星分析了可可西里藏羚羊的遗传多样性, 张勇等^[23]人应用微卫星标记对贵州地方鸡的遗传多样性及亲缘关系进行了分析。

粪便样品易于收集, 对研究对象不造成任何伤害, 且粪便中所含遗传物质能够为动物的分子遗传学、种群生态学和行为生态学提供很多信息。20世纪70年代国外就有许多学者应用粪便分子生物学方法进行了野生动物种群数量的估计、种群亲缘关系的确定、母系的认定、父权的排除、物种的鉴定、个体的识别、动物性别的鉴定、遗传图谱的构建等多方面的研究^[24]。近代国内的粪便分子生物学也得到了迅速的发展, 如方盛国^[25]就利用粪便分子生物学构建了大熊猫的指纹图谱, 张保卫等人^[26]对大熊猫和小熊猫粪便中的线粒体DNA进行了研究, 李娜等^[27]对粪便DNA提取条件进行了探讨。

为了保护极度濒危级(CR)的普氏原羚, 该文选择了微卫星作为分子标记, 同时选择对野外种群影响最小的无伤害样品—粪便作为研究材料, 对普氏原羚微卫星位点进行了筛选, 并对青海省青海湖湖东地区的普氏原羚野外种群的个体进行识别。

1 材料与方法

1.1 试验时间、地点

试验于2002年1月至2004年5月在中国林业科学院森林生态与环境保护研究所的森林生态与环境保护国家重点实验室完成。

1.2 材料

采集青海湖湖东地区普氏原羚野外种群新鲜粪便样品和人工喂养的普氏原血液样品, 样品采集后低温(-10℃采样箱)保存并迅速空运至实验室-20℃冰箱保存。

1.3 方法

1.3.1 普氏原羚粪便DNA的提取 普氏原羚粪便DNA提取在参照大熊猫粪便DNA提取方法(方盛国1997、张保卫2004和程宏毅等(2006), 稍作修改; 常规方法提取普氏原羚血液DNA。

1.3.2 PCR扩增 反应体系为25μl: 总DNA(约1μg)、10×Buffer 2.5μl、25mmol/L MgCl₂1.5~2.5μl、2mmol/L dNTPs 2.5μl、PrimerL (10μmol/L)2.5μl、PrimerF (10μmol/L)2.5μl、TaqDNA聚合酶(5U/μl)0.3μl、补水至25μl。PCR反应参数为95℃ 5min; 94℃ 30s, 52℃ 30s, 72℃ 30s, 35个循环; 72℃ 7min, 4℃保存。

1.3.3 PCR产物的检测 聚丙烯酰胺凝胶电泳结合银染检测, 部分检测结果见图1至图4。

2 结果与分析

2.1 粪便DNA质量检测结果

从图1中表明普氏原羚粪便中提取的DNA比较完整, 粪便DNA与皮张DNA大小一致, 完全适合作动物遗传分析。

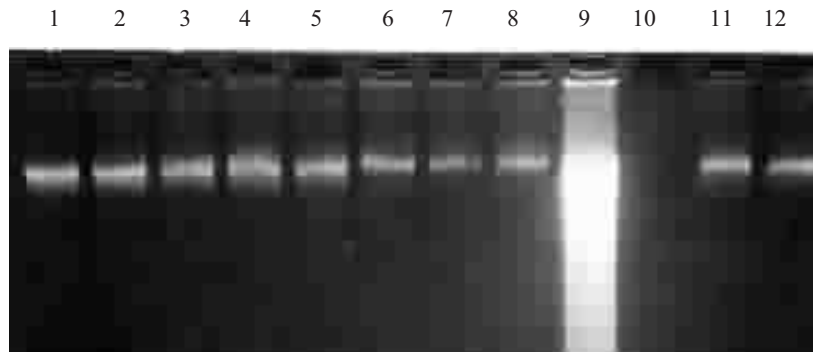


图1 部分普氏原羚粪便DNA琼脂糖电泳图

注: 第8泳道是普氏原羚血液DNA, 第10泳道为空白对照, 其它为普氏原羚不同粪便样品DNA。

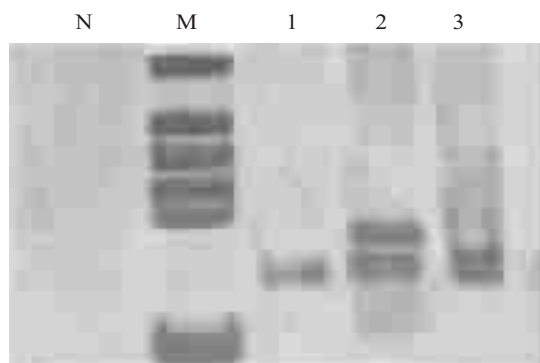


图2 微卫星位点 MNS64 部分扩增结果(分子量标记为 λ DNA/Hind III+EcoR I Marker)

M (267, 234 213, 192, 184, 124)

N (Negative control) 10 (162, 162) 8 (174, 164) 3 (166, 160)

注:M 为分子量标记为 λ DNA/Hind III+EcoR I Marker, N 表示空白对照, 1、2、3 代表 3 个不同编号的粪便样品, 扩增产物大小依次对应为(197/197, 197/207, 197/189)。

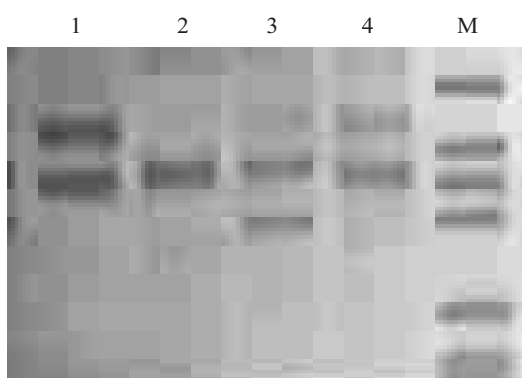


图3 微卫星位点 BM1392 部分扩增结果 (分子量标记为 PBR322/Msp III)

注:M 为分子量标记为 PBR322/Msp I, 1、2、3、4 代表 4 个不同编号的粪便样品扩增产物大小依次为 (211/199, 199/199, 199/185, 211/199)。

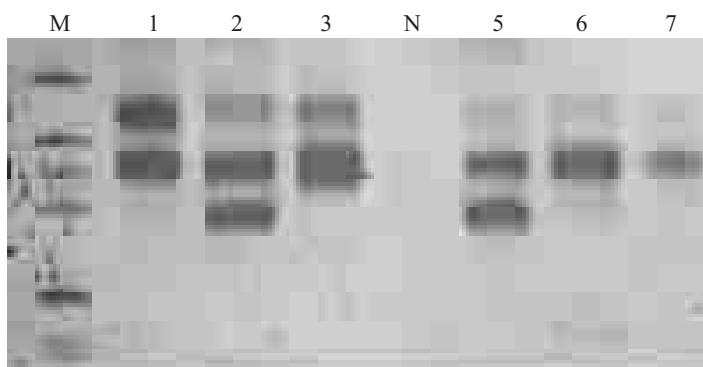


图4 微卫星位点 SMHCC 部分扩增结果(分子量标记为 PBR322/Msp I)

注:M 为分子量标记为 PBR322/Msp I, N 表示空白对照, 1、2、3、5、6、7 代表 6 个不同编号的粪便样品, 扩增产物大小依次为 (211/199, 199/189, 199/199, Negative control 199/189, 199/199, 199/199)。

2.2 普氏原羚微卫星多态性及识别能力统计结果

根据微卫星基因座位上的等位基因频率, 计算了普氏原羚粪便 DNA 中筛选到的 8 个微卫星基因座在样品中的基因杂合度、多态信息含量、有效等位基因数和个体识别能力。统计结果表明各位点基因杂合度介于 0.71~0.84, 其中最大的是 OarFCB304, 最小的 MNS61, 平均杂合度为 0.78; 各位点多态性含量介于 0.79~0.66 之间, 其中最大的是 OarFCB304, 最小的 MNS61, 平均

为 0.731, 有效等位基因数介于 3.40~6.08, 其中最大的是 OarFCB304, 最小的 MNS61, 平均有效等位基因为 5.98; 各位点的个体识别能力介于 0.71~0.84 之间, 平均数为 0.79, 其中 OarFCB304 位点个体识别能力最强, MNS61 最弱, 且 8 个位点的累计个体识别能力为 99.99%。所以, 在 8 个微卫星基因座中, OarFCB304, 具有最大的遗传多样性和个体识别能力, MNS61 具有最小的遗传多样性和个体识别能力。统计结果见表 1。

表 1 8 个微卫星位点的个体识别能力、基因杂合度、多态信息含量和有效等位基因数、片段大小、重复单位

位点	个体识别能力	基因杂合度	多态信息量	有效等位基因数	重复单位
MNS61	0.71	0.71	0.66	3.40	(CA) ₁₇
MNS64	0.82	0.81	0.77	6.08	(TG) ₁₉
Oare133	0.78	0.78	0.73	4.05	(TG) ₂₄
TGLA54	0.78	0.78	0.72	4.55	(AC) ₁₅
BM1329	0.79	0.79	0.73	4.82	(AC) ₁₅ GC(CA) ₃
OarFCB304	0.84	0.84	0.79	6.59	(TG) ₂₅
SMHCC	0.78	0.78	0.72	4.62	(CA) ₂₀
BM1862	0.78	0.78	0.72	4.65	(CA) ₁₈

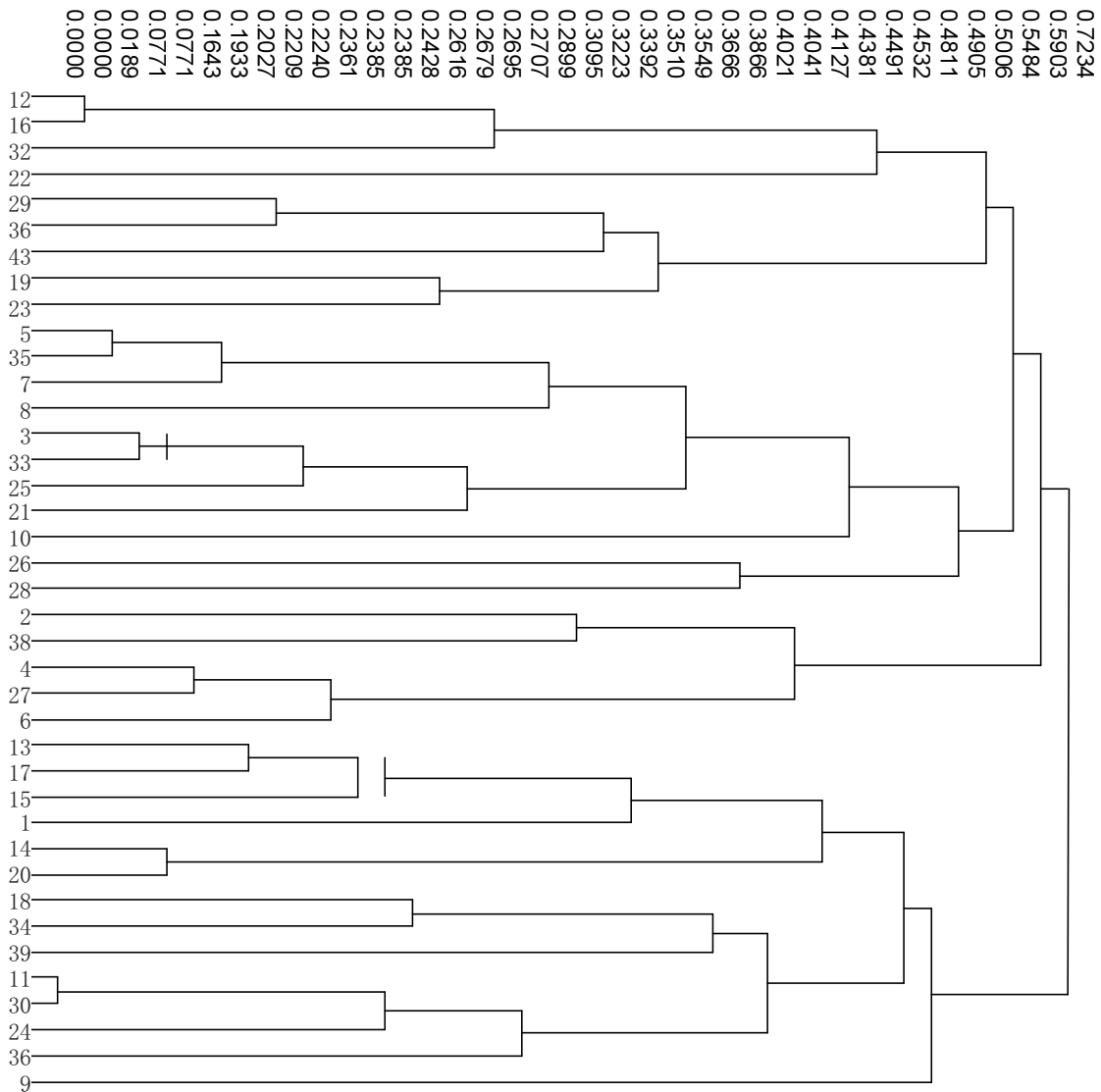


图 5 39 个样品的聚类分析图

注: 左边数字为粪便样品编号; 上边数字为遗传距离。

2.3 个体识别

根据聚类分析及法医上个体识别判断的标准, 即基因型完全一致或遗传距离为 0 的两个检测对象则被判定为来自同一个体或同卵双生^[28]。笔者对青海省湖东地区小白湖的野生普氏原羚个体进行识别, 最终判定 39 个粪便样品来自 35 个不同个体, 这与采样期间记录的普氏原羚个体数 32 个基本相符。

3 讨论

3.1 微卫星两端的侧翼序列在生物的基因组中特别是在具有高度近亲关系的种间具有不同程度的保守性, 这就使得种间扩增成为可能。研究从 10 对绵羊和 10 对非洲麋羚的微卫星位点中筛选到 8 个在普氏原羚 DNA 基因组中显示多态性的位点, 这进一步证实了今后可以利用微卫星侧翼序列的保守性开展微卫星标记

种间扩增, 并能够筛选一定数量的标记用于野生濒危动物个体识别的研究中。从 8 个微卫星位点的基因杂合度、多态信息含量、有效等位基因数及个体识别能力的统计分析, 表明该研究从普氏原羚粪便中所提取的基因组完全能满足微卫星分析; 引物条件优化合理; 这为普氏原羚遗传多样性研究与保护提供了基础性技术支持。

3.2 普氏原羚作为一种极度濒危物种, 它的种群生存状况已经相当脆弱, 不允许科研人员再对其进行破坏性的取样活动, 因此以粪便作为普氏原羚遗传分析的实验材料学对于普氏原羚的保护和管理具有十分重要现实的意义^[29]。但是, 由于粪便中含有未被消化的食物等其它成分, 且粪便很大程度上暴露在大自然中, 因而易于受到外源遗传物质的污染^[30]。因此笔者在普氏原

羚粪便样品收集、保存以及提取过程中,采用严格的消毒措施尽最大可能减少污染的机会,同时 DNA 提取及 PCR 扩增的全过程中,所有步骤进行空白对照实验。

参考文献

- [1] 施立明,贾旭.中国生物多样性保护与现状对策[M].遗传多样性.北京:科学出版社,1993.
- [2] 汪松.《中国濒危动物红皮书 - 兽类》[M]. 北京: 科学出版社,1999: 352-354.
- [3] Jiang Z, Li D. Antelopes in China[J].Bulletin of Russian Academy of Sciences,1998,(4):458-461.
- [4] 蒋志刚,雷润华,刘丙万,等.普氏原羚研究概述[J].动物学杂志,2003,38(6):129-132.
- [5] 李迪强,蒋志刚,王祖望.普氏原羚食性研究[J].动物学研究,1999,20: 74-77.
- [6] 李迪强, 蒋志刚. 青海湖地区普氏原羚种群结构 [J]. 动物学报, 2001,47(2):158-162.
- [7] 李迪强,蒋志刚.人类活动对普氏原羚分布的影响[J].生态学报,1996,19(6):890-896.
- [8] 李迪强,蒋志刚.普氏原羚生境选择的数量化分析[J].兽类学报,2002,22(1):15-21.
- [9] 李迪强,蒋志刚.普氏原羚的生境分析与 GAP 分析生物多样性与人类未来 [C]. 生物多样性保护与持续利用研讨会论文集,1996: 66-67.
- [10] 王秀磊,李迪强,吴波,等.青海湖东—克图地区普氏原羚生境适宜性评价[J].生物多样性,2005,13(3):213-230.
- [11] 易湘蓉,王秀磊,周慧,等.普氏原羚食性研究[J].湖南农业大学学报(自然科学版),2005,31(3):289-292.
- [12] 雷润华,蒋志刚,胡志华,等.原羚属分类地位研究兼论中国羚羊分类[J].动物分类学报,2004,29(14):622-627.
- [13] 张于光,李迪强,饶力群等.东北虎微卫星的筛选及在亲子鉴定中的应用[J].动物学报,2003,49:118-123.
- [14] Koskinen M.T, Nillsson J, Veselov A. J, et al. Microsatellite data resolve phylogeographic patterns in European grayling [J]. Heredity, 2002, (88):391-401.
- [15] Wei Bin-Sun, Hong Chen, Chu Zhao-Lei, et al. Study on Population Genetic Characteristics of Qin Chuan Cows Using Microsatellite Markers[J]. Journal of Genetics and Genomics, 2007, 34(1):17-25.
- [16] Wisely S.M, Buskirk S.W, Fleming M.A, et al. Genetic diversity and fitness in black-footed ferrets before and during a bottleneck[J]. Journal of Heredity, 2002, (93):231-137.
- [17] 潘志萍,曾玲,温硕祥.桔小实蝇抗性品系的微卫星DNA 分析[J].昆虫学报,2006,49(15):874-877.
- [18] 李孟华,王海生,刘榜,等.DNA 分子标记在动物个体识别与亲权鉴定方面的应用[J].生物技术通报,2001,(5):4-7.
- [19] 程宝文,陈国弟,张华建.银染法检测 STR 复合扩产物应用于法医个体识别的初步研究[J].遗传,2002,24(1):15-18.
- [20] 陈耕夫,伍新,罗超权等.用 PCR-SSCP 法进行亲子鉴定及个体识别[J].中国法医学杂志,1996,11(4):219-220.
- [21] 范晶,许杨.STR-PCR 分型技术在法医上的应用[J].生物技术通报,2003,(2):29-32.
- [22] Hui Zhou, Di Qiang-Li, Yu Guang -Zhang, et al. Genetic Diversity of Microsatellite DNA Loci of Tibetan Antelope (Chiru, Pantholops hodgsonii) in Hoh Xil National Nature Reserve, Qinghai, China[J]. Journal of Genetics and Genomics, 2007, 34(7):600-607.
- [23] 张勇,肖李华,陈祥,等.利用微卫星标记分析贵州地方鸡种遗传多样性及亲缘关系[J].畜牧兽医学报,2006,37(12):1274-1281.
- [24] 洪艳云,李迪强,刘毅粪便 DNA 分子标记在濒危动物保护中的应用[J].中国草食动物,2004,(3):41-43.
- [25] 方盛国,丁朝武,冯文和,等.大熊猫 DNA 指纹分析材料的初步研究[J].四川大学学报,1997,(6):94-98.
- [26] 张保卫,魏辅文,李明,等.大熊猫和小熊猫 DNA 提取的简易方法[J].动物学报,2004,50(3):452-458.
- [27] 李娜,李迪强,王秀磊,等.粪便不同保存方法对动物基因组 DNA 提取效果的影响[J].国际遗传学杂志,2006,29(5):341-345.
- [28] 姜先华.DNA 指纹图在法医学鉴定中的应用和研究[J].中国法医学杂志,1990,1(5):11-14.
- [29] 王戎疆.粪便 DNA 分析技术在动物生态学中的应用[J].动物学报,2001,47(6):699-703.
- [30] 魏辅文,李明,方盛国,等.分子粪便学及其应用—可靠性“局限性”和展望[J].兽类学报,2001,2(21):142-162.