

doi:10.16779/j.cnki.1003-5508.2016.06.018

通过粪便确定大熊猫性别的方法研究

周莎¹, 彭桦¹, 刘健¹, 胡进耀^{*1}, 余凌帆², 毛波勇³

(1. 绵阳师范学院, 生命科学与技术学院, 四川 绵阳 621000;

2. 四川省林业科学研究院, 四川 成都 610081; 3. 天全县林业局, 四川 天全 625500)

摘要: 本文采用 SDS、核酸吸附柱提取了大熊猫粪便中的 DNA, 根据大熊猫性别决定因子基因序列设计引物, 以非性别特异性的脑源性神经营养因子基因片段 (BDNF) 作为正对照。使用人工饲养的大熊猫粪便 DNA 进行验证引物的有效性, 结果表明该引物鉴定结果可靠。实验表明该方法方便快捷、可靠有效。

关键词: 大熊猫; DNA 提取; 性别鉴定

中图分类号: Q958 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5508(2016)06-0082-04

A Method of Sex-determination Tests of Giant Pandas

ZHOU Sha¹ PENG Hua¹ LIU Jian¹ HU Jin-yao^{*1} YU Ling-fan² MAO Bo-yong³

(1. College of Life Science & Biotechnology, Mianyang Normal University, Mianyang 621000, China;

2. Sichuan Academy of Forestry, Chengdu 610081, 3. Tian Quan Forestry Bureau in Sichuan Province, Tianquan 625500, China)

Abstract: In this paper, SDS and nucleic acid adsorption column were used for extraction of the giant panda fecal DNA. According to the giant panda sex determination gene primers design factor, BDNF was taken as the positive control. Validation of the effectiveness of the primers was conducted for the use of fecal DNA from artificially reared giant pandas. It was showed that the results were reliable for the identification of the primers. Experiments showed that this method was convenient and reliable.

Key words: Panda, DNA extraction, Determination of sex

大熊猫 (*Ailuropoda melanoleuca*) 是我国濒危保护动物 (陈远飞, 1986), 是生物多样性保护的旗舰物种。保护大熊猫及其栖息地是保护生物多样性和生态系统功能完整性与稳定性的重要保障 (申国珍, 2008)。通过保护大熊猫旗舰种来保护其生存的整个生态系统, 保护该生态系统的生物多样性, 大熊猫作为保护其他珍稀物种及生物多样性保护的旗舰种已经成为了保护行为的一种象征。

性别鉴定是研究和保护野生大熊猫种群的一个重要课题。近年来随着分子生物学的发展, 非损伤性取样或非损伤性基因取样在不伤害或触及动物的前提下收集脱落的毛发、粪便、口腔脱落细胞、陈旧

皮张等作为分析样品获取样品中的 DNA (魏辅文等, 2001; 李明等, 2002; 张于光等, 2003; 刘海等, 2003; 史燕等, 2004)。由于非损伤性取样的广泛性、随机性和便利性, 使其在物种鉴别、个体识别、性别鉴定、种群亲缘关系鉴定、种群数量估计等方面得到了广泛的应用 (陈璐, 2007)。睾丸决定基因位于 Y 染色体上, 哺乳动物在发育期的性腺分化主要依赖于雄性特有的 Y 染色体 (杨晓娟, 1999)。随着性别决定的分子生物学机制的深入研究, 以及 PCR 技术的广泛应用, 近年来很多研究者应用哺乳动物 Y 染色体上连锁的特定基因 PCR 进行扩增, 鉴定动物性别, 如 (田新民, 2008) 通过 ZFY 基因对奶

收稿日期: 2016-09-07

基金项目: 天全县喇叭河-紫石-二郎山大熊猫基因交流走廊带建设项目、天全县大熊猫栖息地修复项目调查监测及技术培训部分项目 (项目编号: 天政采招[2014]28号); 国家自然科学基金项目 (31170319)。

作者简介: 周莎 (1992-), 绵阳师范学院本科生。

通讯作者: 胡进耀, 博士、教授, 主要从事生态系统健康与安全维护研究。

牛的性别鉴定(龚荣慈,1997);S R Y 基因对野生狍性别鉴定(杨宝田,2005)。本研究拟通过对人工大熊猫性别的研究,探索大熊猫非损伤性性别鉴定的实验方法。

1 材料与方 法

材料:大熊猫戴丽、傲傲、怡畅、英英粪便样本均采自都江堰大熊猫人工繁育基地、取样方法为非损伤性取样。方式为采集新鲜的大熊猫粪便。

基因组 DNA 提取:用酚—氯仿法对粪便样本 DNA 进行提取。方法提取产物的含量和纯度在凝胶电泳仪上进行检测。(张保卫,2004)

PCR 扩增:PCR 反应体系 20 μ l,重蒸馏水 14.5 μ l,10 \times buffer 2 μ l,dNTP1.5 μ l,

引物 1 0.5 μ l,引物 2 0.5 μ l,模板 DNA 1 μ l,Taq 酶 0.2 μ l。在 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 数据库上查找大熊猫性别决定因子 SRY (Sex Determining Region Y) 基因序列。NCBI 基因登录号 AB292070.1,如图 3 所示。根据该序列使用 DNAMAN 软件设计的一对引物:

SRY F 5'-AGTTAGGCAGTGTGTGTGACC-3'

SRY R 5'-ATAGTCTGGGTATTTCTCTCGGTC-3'

预期扩增片段 600 bp 左右。

为了保证结果的准确性,参考相关文献选用大熊猫脑源性神经因子基因 BDNF 作为对照基因,设计对照引物基因:

BDNF F 5'-TCGGTTCATGAAGGC-3'

BDNF R 5'-TTGCTATCCATGGTAAGGG-3'

其扩增程序为:预变性:94 $^{\circ}$ C,4 min 变性:95 $^{\circ}$ C,45 s 退火:50.4 $^{\circ}$ C,45 s 延伸:72 $^{\circ}$ C,50 s,变性、退火、延伸共 35 个循环;最末一个循环紧接 72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min 补缺口。

电泳及结果记录:取 10 μ lPCR 扩增基因产物,在 3% 的琼脂糖凝胶上电泳 30 min,用凝胶成像仪 (VilberLourmat 公司) 进行拍照并记录结果。基因电泳结果中,单条带表示此个体性别为雄性,双带表示此个体性别为雌性。

2 结果与分析

2.1 引物 SRY、BDNF 扩增结果

4 只人工饲养大熊猫的详细资料(见表 1)。

表 1 人工饲养大熊猫粪便采集信息

采集时间	姓名及编号	性别	年龄(岁)	粪便量(团)
10 月 28 日	戴丽 M1	雄	15	2
10 月 28 日	傲傲 M2	雄	4	2
10 月 28 日	怡畅 F1	雌	2	2
10 月 28 日	英英 F2	雌	23	2

2.2 不同预处理对提取 DNA 的影响

2.2.1 人工饲养大熊猫 DNA 提取

由图 1 可知,未预处理提取的 DNA 效果好,条带清晰,目标 DNA 质量较高,碎片少;用乙醇预处理提取的 DNA 碎片较多;用丙酮预处理的 DNA 碎片多,条带不清晰。

根据图 1 的 DNA 提取结果,我们得出用 SDS 法提取及核酸吸附柱纯化回收 DNA 效果较好,我们决定采用之前的提取方法并用丙酮及乙醇预处理。

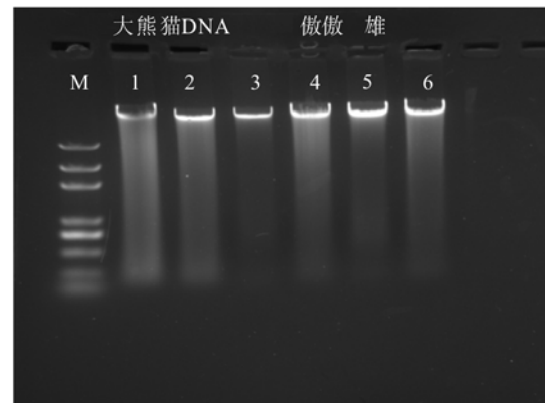


图 1 熊猫傲傲 DNA 检测

M,trans2Kplus maker;1,2 泳道为乙醇预处理提取的 DNA;3,5 泳道为未预处理提取的 DNA;4,6 泳道为丙酮预处理的 DNA

实验结果如图 2 所示:4 只大熊猫都提取出了比较清晰完整的 DNA 条带,M1 熊猫戴丽食物不是纯竹叶,粪便中残留了大量的水果消化残渣,提取出的条带有弥散现象,其它 3 个样品条带较好。F1DNA 浓度较低,质量差,DNA 破碎严重,杂 DNA 较多;F2 目标 DNA 质量较好,有大量小段 DNA;M1 DNA 破碎严重,可能有较多杂质 DNA;M2DNA 质量较好。

2.3 不同退火温度扩增的结果

对人工饲养 4 只大熊猫粪便 DNA 进行了 PCR 扩增所得到的结果,加入 SRY 基因引物的是实验组,加入 BDNF 基因引物的是对照组。本次 PCR 扩增分别用大熊猫 SRY 基因引物及 BDNF 基因引物扩增对 4 只人工养殖的大熊猫 DNA 进行 PCR 扩增。

用提取质量较好的 M2 DNA 为模板,如上所示

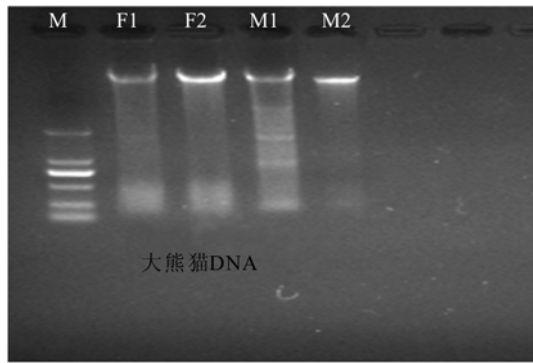


图2 人工饲养大熊猫 DNA 检测

M, trans2Kplus maker; F1 泳道是雌性大熊猫怡畅的样品 DNA; F2 泳道是雌性大熊猫英英的样品 DNA; M1 泳道是雄性大熊猫戴丽的样品 DNA; M2 泳道是雄性大熊猫傲傲的样品 DNA

进行温度梯度 PCR 扩增, 设置了 5 组温度, 分别是 48℃、50.4℃、51.6℃、54℃、56℃ 进行扩增以确定最佳的退火温度, 结果如图 3 所示。SRY 基因扩增最佳退火温度在 50℃ 左右, 扩增的条带大小为 500 bp 左右, BDNF 基因最佳退火温度在 48℃ 左右(图 3 和图 4)。

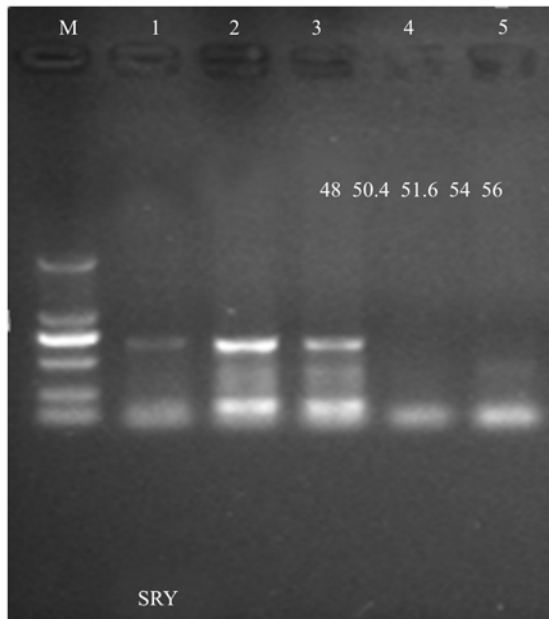


图3 SRY 温度梯度 PCR 检测结果

M, trans2Kplus maker; 1~5 泳道分别为 48℃、50.4℃、51.6℃、54℃、56℃

3 结论

在采集大熊猫粪便过程中, 尽量选取 7 d 以内的表面带有粘膜的新鲜粪便, 用此粪便提取 DNA 效果较好。在保存样品中不同的保存方法在刘艳华等

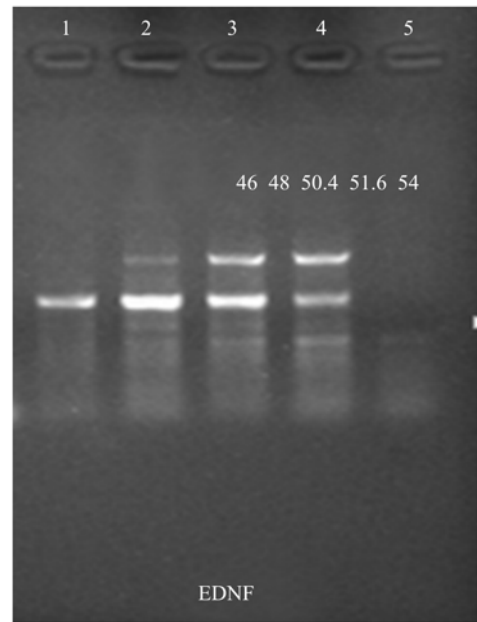


图4 BDNF 温度梯度 PCR 检测结果

1~5 泳道分别为 48℃、50.4℃、51.6℃、54℃、56℃

人的论述中已有了较全面的论述(刘艳华, 2006), 我们参考钟华等人使用丙酮预处理样品(钟华, 2003)发现丙酮影响后续 DNA 的质量, 参考使用乙醇预处理样品也发现乙醇影响后续 DNA 的处理。实验结果表明, 直接采用冷藏保存处理方便, 提取的 DNA 效果好。

影响粪便 DNA 提取的因素除了保存方法外, 动物的取食和环境的温度也会影响。(G oossens et al, 2000; Melanie et al., 2003; Lucchini et al, 2002) 提取 DNA 使用 SDS 和核酸纯化柱方法提取, 提取 DNA 质量好, 方便快捷, 便于后续的 PCR 实验。由于粪便中含有 DNA 聚合酶抑制物、植物多糖等 PCR 抑制剂, 传统的提取纯化方法不能将其去除, 便会影响 PCR 扩增的结构, 所以选择使用乙醇提取纯化粪便中的 DNA, 并将其用于 PCR 检测。

根据 NCBI 上面公布的大熊猫的性别决定基因序列, 采用 DNAMAN 软件设计的特异性引物, 扩增效果好, 特异性高。对照引物采用田新民等使用的大熊猫脑源性神经营养因子基因片段(BDNF)引物(田新民, 2008), 在 50 摄氏度左右扩增效果最好。

通过粪便 DNA 扩增鉴定的 4 只人工饲养的大熊猫的性别与实际相符, 表明我们的鉴别方法方便、快捷、准确, 可以对野外鉴定大熊猫性别起到重要的作用。

参考文献:

- [1] 魏辅文,饶刚,李明,等. 分子粪便学及其应用——可靠性、局限性和展望[J]. 兽类学报,2001,21(2):143~152.
- [2] 李明,魏辅文,饶刚,等. 非损伤性取样在保护遗传学研究中的应用[J]. 动物学报,2001,47(3):338~342.
- [3] 张于光,李迪强,饶力群,等. 东北虎微卫星 DNA 遗传标记的筛选及在亲子鉴定中的应用[J]. 动物学报,49(1):118~123.
- [4] 刘海,杨光,魏辅文,等. 中国大陆梅花鹿 mtDNA 控制区序列变异及种群遗传结构分析[J]. 动物学报,2003,49(1):53~60.
- [5] 史燕,吴孝兵,晏鹏,等. 扬子鳄鞣制皮革和鳞片的 DNA 提取方法[J]. 动物学报,2004,50(2):297~301.
- [6] 陈璐,岳曦. 非损伤性取样研究进展[J]. 四川动物,2007,01:224~226.
- [7] 杨晓娟,杨玉华,张义正. 大熊猫与熊类动物性别的分子鉴定[J]. 应用与环境生物学报,1999,5(3):288~290.
- [8] 田新民,张明海,罗理扬. 通过粪便确定野生马鹿性别的试验[J]. 东北林业大学学报,2008,03:68~69.
- [9] 龚荣慈. 性别鉴定的分子生物学技术与 ZFY 途径[J]. 西南民族大学学报:自然科学版,1997,23(1):85~89.
- [10] 杨宝田. 应用 SRY-PCR 扩增鉴定狍 (Capreolus capreolus) 的性别[J]. 中国兽医学报,2005,25(4):435~438.
- [11] 李平,白秀娟. 狍 SRY 基因 PCR 扩增的初步研究[J]. 经济动物学报,2005,9(2):107~109.
- [12] 张保卫,魏辅文. 大熊猫和小熊猫粪便 DNA 提取的简易方法[J]. 动物学报,2004,(3):452~458.
- [13] 刘艳华,张明海. 野生动物粪便在濒危物种遗传结构研究中的应用[J]. 野生动物杂志,2006,27(1):46~49.
- [14] 钟华,赖旭龙. 一种从大熊猫粪便中提取 DNA 的方法[J]. 动物学报,2003,(5):670~674.
- [16] Goossens B, Chikhi L, Utami S S, et al. A multi-samples, multi-extracts approach form icrossa tellite analysis off aeal samples in an arboreal ape [J]. Conservation Genetics,2000,1:157~162.
- [15] Melanie A, Murphy, Waits, et al. The influence of diet on faecal DNA amplification and sex identification in brown bears (Ursus arctos) [J]. Molecular Ecology,2003,12:2261~2265.
- [16] Lucchini V, Fabbri E, Marucco F, et al. Noninvasive molecular tracking of colonizing wolf (Canis lupus) packs in the western Italian Alps [J]. Molecular Ecology,2002,11:857~868.

(上接第 81 页)

元素快速释放,易被土壤中重金属固定或随雨水流失,不能被作物利于,造成浪费。黄荣林^[11]认为,施用沼肥是促进桉树生长的有效方法,但是沼肥用量并不是越多越好,要结合实际情况施用。合理适当的施肥,是促进桉树生长的一个方面,要想桉树快速生长,还应加强水、病虫害等方面的管理。

参考文献:

- [1] 姚姜铭,周建群,刘新鸾,等. 等养分量不同肥料施肥对桉树生长的影响[J]. 广西林业科学,2014,43(1):80~83.
- [2] 谭长强,覃世杰,覃梅,等. 不同桉树专用肥对尾巨桉 DH32-29 苗木生长的影响[J]. 西北林学院学报,2014,29(2):125~128.
- [3] 王力,侯庆春. 林地施肥与水肥效益[J]. 西北林学院学报,2012,15(2):84~88.
- [4] 曹继钊,张英,农必昌,等. 广西桉树速丰林施肥技术问题分析[J]. 广西林业科学,2005,34(1):35~36.
- [5] 陈笑,史剑茹,孟蝶,等. 沼气与沼肥在农业和环境方面的运用与成效[J]. 中国沼气,2011,29(1):44~47.
- [6] 梁合荣,蒋华,李忠碧,等. 避雨栽培与施用沼液对葡萄产量和品质的影响[J]. 贵州农业科学,2016,35(2):102~103.
- [7] 甘福丁,魏世清,覃文能,等. 施用沼液对土豆品质及土壤肥效的影响[J]. 中国沼气,2011,29(1):59~60.
- [8] 农必昌,叶敏敬,曹继钊,等. 不同复混肥料对桉树生长影响调查[J]. 广西林业科学,2011,40(1):58~60.
- [9] 高丽. 沼肥是个宝综合利用效益高[J]. 河南农业,2003(6):35.
- [10] 廖胜彪. 闽江下游山地巨桉无性系施肥试验研究[J]. 福建林业科技,2005,32(3):100~104.
- [11] 黄荣林,黄加祥,杨炳壮,等. 桉树人工林沼肥对比试验研究[J]. 造林与经营,2015,(2):17~20.