

滇金丝猴的随机扩增多态 DNA 与遗传多样性分析*

兰 宏 张文艳** 王 文 宿 兵 施立明

(中国科学院昆明动物研究所细胞与分子进化开放实验室, 昆明 650223)

摘要 对6只笼养滇金丝猴(*Rhinopithecus bieti*)进行了随机扩增多态 DNA (RAPD) 及遗传多样性分析. 用45个10 bp 随机短引物对每只滇金丝猴的基因组 DNA 进行了扩增, 平均每个个体观察到的 RAPD 标记约为130个左右, 单个引物获得的标记在1~7个之间. 80%的 RAPD 标记表现为无多态的单型性. 个体间的遗传距离为0.052, 表明笼养滇金丝猴群体的遗传多样性很低. 此研究结果与在蛋白多态研究中得到的一致. 贫乏的遗传多样性一方面使目前处于濒危境地的滇金丝猴生存情况更加危险, 同时其本身也可能是造成目前滇金丝猴濒危的原因之一. 另外, 通过成对的遗传距离分析, 构建了这一群滇金丝猴的谱系关系图, 提出了让遗传距离较远的个体间进行交配的笼养繁育计划.

关键词 滇金丝猴 RAPD 遗传多样性

滇金丝猴(*Rhinopithecus bieti*)是一种外形惹人喜爱的重要珍稀野生动物. 它具有深灰色体毛和红色嘴唇, 以及扁平的鼻子, 生长在高山雪地森林中, 主要以苔藓和地衣为生^[1]. 1879年 Milne-Edwards 首先报道滇金丝猴的存在, 其后的将近一个世纪中动物学家一直不能证实是否存在活的滇金丝猴, 直到1962年, Peng 等发现了一些滇金丝猴的毛才证实了滇金丝猴的存在.

通常人们所知的有四种金丝猴(*Rhinopithecus* 属), 滇金丝猴(*R. bieti*)被认为是其中最进化的一种^[2]. 然而不幸的是, 目前滇金丝猴的数量仅为2000只左右, 并且其分布也仅限于云南西北部及相邻的西藏境内针叶林内, 滇金丝猴由于其狭窄的分布和群体数量少正面临着濒临灭绝的境地^[3].

在过去的几十年里, 对滇金丝猴的研究主要集中于形态学, 解剖学, 种系发生学和生态学方面. 对于群体的遗传结构和特点, 例如, 近交系数等了解得非常少. 研究滇金丝猴的遗传多样性以便采取合理、科学、有效的保护措施已成为目前非常紧迫的任务.

随机扩增多态 DNA(RAPD) 分析提供了一种方便、快速分析不同个体间遗传差异的方法^[4]. RAPD 技术采用9 bp 或10 bp 随机序列的核苷酸引物进行多聚酶链反应(PCR)^[4, 5],

1995-07-24 收稿

* 中国科学院“八五”重大项目基金资助

** 现为中国医学科学院医学生物学研究所硕士研究生

然后通过观察扩增产物电泳后带型的增减来分析 DNA 的多态性。这种快速、简便的方法特别适用于分析种内变异和多态性,能够极大地提高遗传多样性分析的分辨率。最近已有不少用 RAPD 方法研究遗传多样性的文章发表,主要是对植物的研究^[6],但运用 RAPD 方法研究高等动物的文章还比较少^[7]。本文报道了运用 RAPD 方法研究一小群捕获并笼养的滇金丝猴 (*R. bieti*) 遗传多样性结果,并据此制定了一个针对该群体的遗传管理和繁殖方案。

1 材料和方法

1.1 动物材料

血液样品取自 6 只 (4 雌, 2 雄) 来自云南维西县分 3 次捕获的滇金丝猴。这 6 只滇金丝猴目前笼养于中国科学院昆明动物研究所 (表 1)。

表 1 研究用的动物个体

样品号	性别	年龄(岁)	体重/kg	捕获日期 (年 月)	地点
1	雌	8	9.2	1991-12	维西县
2	雌	6	7.6	1991-12	维西县
3	雌	3	5.1	1991-12	维西县
4	雌	7	10.0	1987-03	维西县
5	雄	6	9.9	1992-06	维西县
6	雄	2	4.5	1992-06	维西县

1.2 DNA 分离和 PCR 扩增基因组 DNA

每只动物抽约 5 mL 血液。800×g 离心 10 min 分离血液样品,上层血浆和下层红细胞用于蛋白电泳分析。基因组 DNA 采用本实验室改进的 Sambrook 方法^[8]从淋巴细胞层中提取。将淋巴细胞转至 1 只 Eppendorf 管中,加入 400 μL DNA 抽提缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L EDTA, 10 mmol/L NaCl, 1.0% SDS, 200 μg/mL 蛋白酶 K, pH 8.0) 混合均匀,置 56℃ 消化 3~5 h 直到淋巴细胞完全消化。加入等体积饱和酚于自制转轮上缓慢抽提 24 h; 5 000×g 离心 10 min; 上清用等体积酚-氯仿 (1:1) 抽提 24 h; 取上清用等体积氯仿-异戊醇 (24:1) 抽提 12 h。离心后上清液用 2 倍体积预冷的无水乙醇沉淀 DNA; 70% 乙醇洗涤 DNA 沉淀后将 DNA 晾干。加入适量体积 TE 缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0) 溶解并调整 DNA 浓度至大约 25 ng/μL, 保存于 4℃。

用于 PCR 反应的随机 10 bp 引物其 G/C 含量约为 60% (美国 Operon Technologies 公司出品)。RAPD 反应体系为 10 μL, 其中含有 10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.9, 50 mmol/L KCl, 2.5 mmol/L MgCl₂, 0.001% 明胶, 100 μmol/L dNTPs, 0.2 μmol/L 引物, 25 ng DNA 模板和 1~2 单位 Taq DNA 聚合酶 (华美生物工程公司)。反应混合物用 20 μL 石蜡油覆盖。DNA 扩增采用 NT1109 型扩增仪 (北京新技术运用研究所)。RAPD 反应过程包括 40 个循环,每个循环包括 94℃ 变性 1 min, 36℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 2 min。首次循环前于 94℃ 预变性 200 s, 最后一个循环后再于 72℃ 延伸 5 min。每次反应均设置不含模板 DNA 的空白对照。扩增片段用 1.4% 琼脂糖凝胶 (含 0.5 μg/mL 溴化钬锭) 电泳 2 h (3V/cm), 紫外光下观察拍照。

1.3 数据分析

任意两个个体间遗传距离 (P) 根据两个个体的共享 RAPD 标记来计算^[9]:

$$P = 1 - F,$$

$$F = 2N_{xy} / (N_x + N_y),$$

P 是遗传距离, N_x 和 N_y 分别为第 X 和 Y 个体拥有的 RDAP 标记数, N_{xy} 是 X, Y 两个个体共享的 RAPD 标记数.

根据遗传距离用 UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) 和 NJ (neighbor-joining)^[10] 方法构建关系图.

2 结果

2.1 DNA 扩增结果

我们采用 100 个引物 (Operon 公司引物 Kit 中的 D, E, G, H, 和 I 组引物) 进行了扩增, 其中 45 个引物在所有个体中得到了良好结果. 扩增产物中只有那些电泳后清晰的带才选作进一步的分析. 实验中, 单个 10 bp 的引物扩增出的 RAPD 标记在 1~7 之间, 用 45 个引物扩增每只滇金丝猴平均约获得 130 条带 (或称作标记). 每个引物提供平均 2.9 个标记的信息 (表 2). 图 1 列举了 OPD13, OPD20, OPD14 三种引物扩增产物的电泳带型.

表 2 用于滇金丝猴 (*Rhinopithecus bieti*) DNA 随机扩增的引物及其扩增情况^{a)}

引物	5'-3' 序列	扩增带数	引物	5'-3' 序列	扩增带数
D-04	TCTGGTGAGG	1	D-08	GTGTGCCCCA	3
D-10	GGTCTACACC	1	D-11	AGCGCCATTG	3~4
D-12	CACCGTATCC	1~3	D-13	GGGGTGACGA	4
D-14	CTTCCCCAAG	3	D-16	AGGGCGTAAG	1
D-19	CTGGGGACTT	1	D-20	ACCCGGTCAC	4
E-03	CCAGATGCAC	1	E-04	CCAGATGCAC	1~2
E-06	AAGACCCCTC	2~3	E-07	AGATGCAGCC	3
E-09	CTTCACCCGA	4	E-10	CACCAGGTGA	2~3
E-11	GAGTCTCAGG	6	E-12	TTATCGCCCC	4
E-13	CCCGATTTCGG	3	E-14	TGCGGCTGAG	1~3
E-15	ACGCACAACC	3	E-19	ACGGCGTATG	4
E-20	AACGGTGACC	1	G-05	CTGAGACGGA	2
G-06	GTGCCTAACC	5	G-08	TCACGTCCAC	4
G-09	CTGACGTCAC	3	G-10	AGGGCCGTCT	3
G-11	TGCCCCGTCT	2~4	G-12	CAGCTCACGA	1
G-13	CTCTCCGCCA	1~3	G-14	GGATGAGACC	3
G-15	ACTGGGACTC	1~2	G-18	GGCTCATGTG	1
G-19	GTCAGGGCAA	3~4	H-03	AGACGTCCAC	4
H-18	GAATCGGCCA	2	H-20	GGGAGACATC	1
I-02	GGAGGAGAGG	1	I-03	CAGAAGCCCA	6~7
I-07	CAGCGACAAG	2~4	I-09	TGGAGAGCAG	4
I-13	CTGGGGCTGA	4~6	I-17	GGTGGTGATG	6~7
I-18	TGCCCAGCCT	4~6			

a) 引物编号及序列参照 Operon 引物 Kit (美国 Operon Technologies 公司)

2.2 遗传多样性分析

这一群滇金丝猴群体的 RAPD 扩增带型变异很小. 45 个引物中有 30 个引物的扩增带型在 6 只滇金丝猴中均没有变化. 在检测到的 130 个 RAPD 标记中, 有 100 个标记 (80%) 在整个群体中表现为单型性; 如果随机选择两只滇金丝猴, 则约有 120 条扩增带 (95%) 都相同.

从滇金丝猴个体间共享的 RAPD 标记数, 得出了遗传距离矩阵图。在此矩阵图中, 我们列出了每只动物所检测到的 RAPD 标记数和个体间共享的或非共享的标记数(表 3)。

表 3 滇金丝猴(*Rhinopithecus bieti*) 个体间的遗传距离 ($1-F$ 值)^{a)}

	1	2	3	4	5	6
1	<u>130</u>	125/11	128/6	123/14	126/9	125/15
2	4.21	<u>131</u>	126/11	121/19	125/12	123/20
3	2.29	4.18	<u>132</u>	124/14	126/11	125/17
4	5.38	7.28	5.34	<u>130</u>	123/15	125/14
5	3.45	4.58	4.18	5.75	<u>131</u>	125/16
6	5.66	7.52	6.37	5.66	6.02	<u>135</u>

a) 对角线上的数字(下划线标出)表示每个个体所检测到的 RAPD 位点数。对角线以上的数据为位点的共享程度/个体间的变异程度, 对角线以下的数字为遗传距离($\times 100$)

P (个体间的遗传距离)是目前分析 RAPD 标记杂合度的一个重要参数。滇金丝猴的 P 平均值为相对低的 0.052, 显示了这群滇金丝猴遗传多样性比较贫乏。此结果与我们在蛋白多态性研究中得到的结论一致(未发表)。

2.3 谱系关系分析

由遗传距离的数据我们采用 UPGMA 和 NJ 方法^[10] 构建了谱系关系图。这两种方法得出的谱系图是相似的。从图 1 上看出, 个体 1 和个体 3, 个体 4 和个体 6 在遗传上比较相近。上述每一对似乎属于同一“支序”。个体 2 和个体 5 处于独立的位置上, 但它们与个体 1 和 3 的关系较与个体 4 和 6 的关系近。

3 讨论

3.1 遗传多样性的贫乏

从 RAPD 数据分析我们得出这一小群捕获笼养滇金丝猴的分子杂合度很低的结论。因为这 6 只金丝猴是从云南省维西县高山中的一群野生滇金丝猴中随机捕获的, 由此似可推断该野生滇金丝猴群体的遗传多样性贫乏。

在研究某一动物群体的遗传多样性时, 取样误差, 群体的瓶颈效应/或动物的近交等因素均会使我们得出遗传多样性贫乏的结论。

实验中所研究的 6 只滇金丝猴虽然是 3 次分别捕获的, 但是来自于同一个群体(龙勇

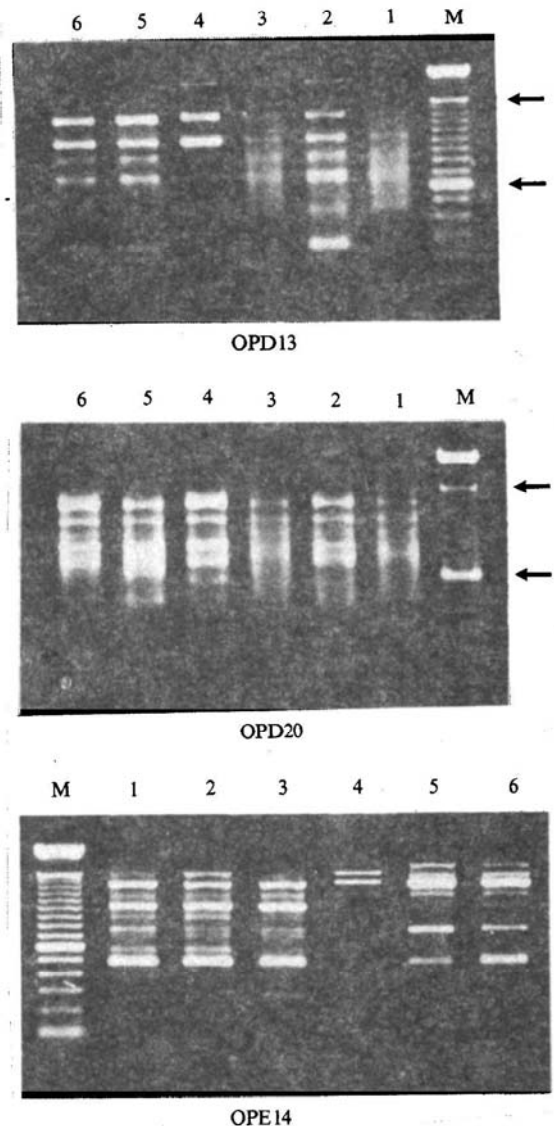


图 1 引物 OPD-13, OPD-20, OPE-14 随机扩增滇金丝猴基因组 DNA 产物的电泳带结果
图中 1~6 列表示 1~6 个个体的带型。M 为分子量标识 (100-bp ladder, BRL)。箭头所指为 600-bp 和 1200-bp 片段大小

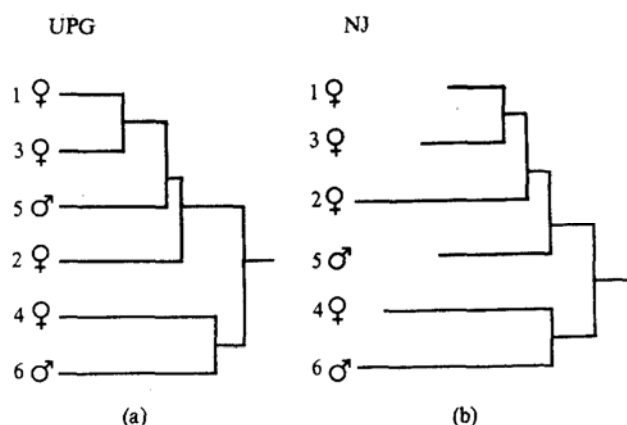


图 2 根据 RAPD 标记用 UPGMA 和 NJ 方法构建的
6 只滇金丝猴间的谱系关系图
水平轴代表遗传距离

诚, 个人交流)。图 2 中, 滇金丝猴 4 和滇金丝猴 6 虽然为不同时间和不同地点所捕获, 但它们的遗传关系很近, 这一结果似乎支持了这几只滇金丝猴来自同一群体。目前认为约有 18 群金丝猴 (约 2000 只) 生活在云南西部和西藏东南部高寒地区, 只有维西滇金丝猴群体是人易于接近的。总的说来群体片段化已很严重, 发生基因交流的可能性非常小。由于较难捕获滇金丝猴, 我们不可能对滇金丝猴的家系进行确认, 所以我们不知这 6 只滇金丝猴是否存在亲缘关系。但已有资料证实, 如果用于分析的位点很多且被分析的平均杂合度很低的话, 所取样

品个体数可以很少^[11]。整个群体杂合度和遗传距离的分析受所分析位点数的影响远大于受取样个体数的影响^[12]。实验中我们运用了大量的引物 (100 个), 多态性分析中重点选取了 45 个引物, 引物数目远远超过这方面其他研究。我们相信, 云南维西县的滇金丝猴群体遗传多样性贫乏这一事实应是可靠的。

群体的瓶颈效应/近交效应常常是导致群体遗传多样性贫乏的一个主要原因。古生物学证据支持了金丝猴群体存在瓶颈效应的观点。自上新世开始, 巨大的喜马拉雅地壳构造运动使得后更新世气候变冷。滇金丝猴的祖先被迫适应雪地高山生境, 致使滇金丝猴群体越来越隔离于较小的范围内。也就是说, 滇金丝猴经历了一个大规模的群体数目减少的过程, 导致了所谓的瓶颈效应。瓶颈效应过程中, 少数滇金丝猴祖先由于遗传漂变和不可避免的一代又一代近交丧失了大量的遗传多样性。

瓶颈效应和近交的结果可能会使滇金丝猴群体的生命力越来越差, 这可能是导致目前滇金丝猴处于濒危境地的一个原因。头盖骨的不对称研究为近交衰退提供了证据。例如非洲猎豹 (*Acinonyx jubatus*) 头骨不对称与其群体数量少和近交有关。彭燕章等采用多变量分析研究了滇金丝猴头盖骨的 16 个参数, 发现有明显的由于近交所引起的不对称现象。

众所周知, 遗传多样性贫乏导致了低的进化适应性以及物种易于遭受生态环境灾变的影响^[13, 14]。目前我们已知该滇金丝猴群体内的遗传多样性很低, 虽然群体间的遗传差异亦可能低亦可能高, 但由于没有证据证明滇金丝猴群体间有任何的基因交流, 因此群体数目小且相互隔离的滇金丝猴群体有着由于近交衰退而走向更加濒危的风险。

3.2 繁殖和复壮

小群体笼养滇金丝猴的频繁近交会导导致这些滇金丝猴后代生活力和生殖潜力的下降。根据 Gilpine 和 Soule^[15] 的理论分析, 我们建议采取一些有效的措施来改变目前滇金丝猴濒临灭绝的状况。这里我们推荐一种在中国科学院昆明动物研究所笼养滇金丝猴小群体内的遗传管理和繁殖方法。

遗传背景不同的个体间进行交配可以提高后代的杂合性, 也易于后代存活和繁殖。群体中选择遗传距离较远的个体进行交配可维持群体的杂合度。采用 RAPD 方法对滇金丝猴个

体间进行遗传关系的谱系分析,为滇金丝猴繁殖提供了有用的信息。从遗传关系谱系图上可知,滇金丝猴 1(雌)和滇金丝猴 3(雌),滇金丝猴 4(雌)和滇金丝猴 6(雄)之间的遗传关系较近,滇金丝猴 2(雌)和滇金丝猴 5(雄)处于独立的位置,但它们与滇金丝猴 1 和 3 支序的关系较与滇金丝猴 4 和 6 支序的关系近。第 1 代(F1)繁殖中,我们建议将滇金丝猴 1(雌)、滇金丝猴 3(雌)和滇金丝猴 6(雄)放置于一笼中让其交配,将滇金丝猴 4(雌)和滇金丝猴 5(雄)放于第 2 笼中让其交配。第 2 代(F2)繁殖中,采用 3 笼繁殖方式:即选择第 1 笼中 1 只雌性 F1 与第 2 笼中 1 只雄性 F1 交配;其他来自第 1 笼的雄性与第 2 笼的雌性交配;第 3 笼采用来自第 1 笼的雌性个体与滇金丝猴 5 进行交配(如果它还不太老还能进行生殖)。

如果类似的繁殖策略一代又一代地进行下去,并且又有从野外获得的野生滇金丝猴参入到繁殖过程中来,我们相信,这一小群笼养滇金丝猴群体能够在瓶颈效应的压力下存活下来,最终发展到一定的数量而可放养回自然中。这种策略同样可以为保护整个金丝猴群体或其他濒危物种提供有用的借鉴。

致谢 感谢邹如金研究员、刘爱华研究员、刘瑞清研究员、余定会和朱春玲同志对本研究所给予的帮助。感谢 W. Bleisch 博士对此文章的修改和订正。

参 考 文 献

- 1 Zhao Q K, He S J, Wu B Q *et al.* Excrement distribution and habitat use in *Rhinopithecus bieti* in winter. *American Journal of Primatology*, 1988, 16: 275~284
- 2 彭燕章,叶智彰,张耀平等. 金丝猴分类及系统发育关系. *动物学研究*, 1988, 9: 239~248
- 3 Harlward T M, Stalker H T, Larue E A *et al.* Use of single-primer DNA amplifications in genetic studies of peanut (*Arachis hypogaea* L). *Plant Molecular Biology*, 1992, 18: 315~325
- 4 Williams J G K, Kubelik A R, Livak J *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18(22): 6 531~6 535
- 5 Welsh J, Peterson C, McClelland M. Polymorphisms generated by arbitrarily primed PCR in the mouse: application to strain identification and genetic mapping. *Nucleic Acids Res*, 1991, 19(2): 303~306
- 6 Copenoll B V, Watanabe I, Hove C V *et al.* Genetic diversity and phylogeny analysis of *Azolla* based on DNA amplification by arbitrary primers. *Genome*, 1993, 36: 686~693
- 7 王 文,兰 宏,宿 兵等. 云南四种少数民族的随机多态 DNA 分析. *科学通报*, 1994, 39: 1 900~1 903
- 8 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatic T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 464~467
- 9 Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic distance in terms of restriction endonucleases. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 1979, 76: 5 269~5 273
- 10 Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for restriction phylogenetic tree. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, 4: 406~425
- 11 Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 1978, 89: 583~590
- 12 Gorman G C, Renzi Jr J. Genetic distance and heterozygosity estimates in electrophoresis studies: effect of sample size. *Copelia*, 1979, 2: 242~249
- 13 Gilpine M E, Soulé M E. Minimum viable populations: processes of species extinction. In: ed. Soulé M E *Conservation Biology, the Science of Scarcity and Diversity*. Sunderland: Sinauer Associates Inc. 1986, 19~34
- 14 Ralls K, Harvey P H, Lyles A M. Inbreeding in natural populations of birds and mammals. In: ed. Soulé M E *Conservation Biology, the Science of Scarcity and Diversity*. ed. Sunderland: Sinauer Associates Inc. 1986, 35~56