

一种从雉类孵化卵壳中提取 DNA 的方法

张永强^① 王宁^① 詹祥江^② 张正旺^{①*}

(^①北京师范大学生物多样性与生态工程教育部重点实验室,生命科学学院 北京 100875;

^②中国科学院动物研究所 北京 100080)

摘要:从鸟类已孵化的卵壳中提取 DNA 属于一种非损伤性取样技术,在鸟类分子生态学研究中具有广阔的应用前景。本实验以河南董寨自然保护区白冠长尾雉(*Syrnaticus reevesii*)和环颈雉(*Phasianus colchicus*)已孵化的卵壳为材料,利用红细胞破碎液、蛋白酶 K 及 RNA 酶等试剂,对卵壳膜内的总 DNA 进行了提取,建立了一种提取高质量 DNA 的新方法。琼脂糖凝胶电泳检测显示,采用新改进的方法提取出的 DNA 条带清晰。同时,利用聚合酶链式反应(PCR)技术成功地从总 DNA 中扩增出两种雉类的线粒体 DNA 控制区(CR)片段,测序后与 GenBank 中同一物种的 CR 序列进行比对,结果证实了 PCR 产物的真实性。文中利用卵壳膜提取出的 DNA,对一窝环颈雉的雏鸟进行了性别鉴定,其结果与根据形态特征进行鉴定的结果完全一致,均为 3 雄 4 雌,从而证实了从卵壳膜中提取 DNA 的真实性。该种 DNA 提取方法在雉类研究中将具有广泛的应用。

关键词: DNA 提取;卵壳膜;雉类;线粒体 DNA 控制区

中图分类号:Q81 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2006)06-76-06

A Method for DNA Extraction from Incubated Eggshells of Pheasants

ZHANG Yong-Qiang^① WANG Ning^① ZHAN Xiang-Jiang^② ZHANG Zheng-Wang^①

(^①Key Laboratory for Biodiversity Science and Ecological Engineering of Ministry of Education, College of Life Sciences, Beijing Normal University, Beijing 100875; ^②Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract: Extracting DNA from eggshells is a non-invasive sampling method which has a wide application in the studies of avian molecular ecology. By using red blood cell broken-up solution, proteinase K and RNase, total DNA with high quality was extracted from the egg membranes in the incubated eggshells of two pheasant species, Reeves' Pheasant *Syrnaticus reevesii* and Ring-necked Pheasant *Phasianus colchicus* from Dongzhai Nature Reserve in Henan Province. An improved method for extracting DNA from eggshells has been established. The mitochondrial control region (CR) of the two species was successfully amplified and sequenced. The DNA sequences were the same as those published in the Genbank for the same two species, which showed the reliability of the PCR products. At the same time, the sexes of one brood of Ring-necked Pheasant were identified by detection of the Chromo-helicase-DNA-binding genes. The molecular sexing results of 3 males and 4 females were consistent with those identified by their morphological characteristics. Eggshell has been proved to be an ideal source of DNA extraction and can be widely used in the pheasant studies.

Key words: DNA extraction; Egg-membrane; Pheasant; Mitochondrial control region

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 30570234, 30330050);

* 通讯作者, E-mail: zzw@bnu.edu.cn;

第一作者介绍 张永强,男,硕士;研究方向:鸟类学。

收稿日期:2006-05-12,修回日期:2006-09-11

近年来,随着生物多样性保护工作的开展,珍稀野生动物的保护力度逐渐加强,这就要求在开展分子生态学研究时不仅要保证取样的科学性,还要考虑到研究对象的稀有性,在野外尽量避免采用破坏性取样的方法^[1-5]。抽取血液^[6]、拔取羽毛等操作虽然都属于非破坏性取样,但或多或少都会给动物带来伤害,从而干扰其正常生活甚至会影响其生存。因此非损伤性取样(non-invasive sampling)技术在动物分子生态学中得到了越来越广泛的应用^[7-10]。在鸟类分子生态学研究,目前非损伤性样品主要有自然脱落的羽毛^[11]、鸟类排出的粪便^[12,13]等。然而,上述样品中的DNA含量十分有限,致使很多研究工作难于进行。为此,寻找一种更好的非损伤性取样方法以获得高质量DNA,对开展鸟类分子生态学研究具有重要意义。鸟类具有营巢产卵的习性,实验表明,从鸟类已孵化卵壳的内膜中能提取出足量的DNA^[14]。由于已孵化卵壳内膜上的血丝是雏鸟发育后残留的,包含有鸟类子代的遗传信息,因此对从卵壳膜上提取的DNA进行分析可以确定雏鸟的遗传组成。目前国外一些学者已经开始利用鸟类卵壳膜提取DNA来开展相关的研究^[14],但国内迄今尚未有人从事这方面的工作。

白冠长尾雉(*Syrmaticus reevesii*)是我国现有4种长尾雉中尾羽最长的一种^[15],由于数量稀少而被列为全球易危物种和我国Ⅱ级重点保护野生动物^[16]。而环颈雉(*Phasianus colchicus*)是我国分布最广、数量最多的一种资源雉类。本文以这两种雉类为实验对象,探讨从已孵化卵壳中提取DNA的可行性,并尝试了将其应用于野生雉类新生雏鸟性别鉴定的研究中。

1 材料与方法

1.1 材料的采集和保存 实验所涉及的2种雉类样品均取自河南董寨国家级自然保护区(114°18'~114°30'E, 31°28'~32°09'N)。该保护区位于罗山县境内,以白冠长尾雉和候鸟为主要保护对象。目前保护区内分布有鸟类233种,占河南省鸟类总数的77.7%,其中包括国

家重点保护的鸟类36种。白冠长尾雉集中分布在该保护区的核心区内,而环颈雉主要分布在保护区的实验区和外围。在野外取样工作中,遵循以下原则:(1)采用非损伤性取样方法;(2)避免样品污染,并保证每个样品独立而完整。具体方法为:将野外采集的整窝卵(董寨保护区用来饲养繁殖和扩大人工种群)标记、测量,然后用家鸡进行孵化,待幼鸟出壳后,收集卵壳,从卵壳内取出内层带血丝的卵膜,放进2 ml IMEC 塑料保存管中,加满无水乙醇保存。

1.2 研究方法

1.2.1 DNA的提取

(1)取0.03 g带血丝的卵膜放进1.5 ml的Eppendorf管中,将其剪碎,加入1 ml红细胞破碎液(10 mmol/L Tris-HCl pH 7.5; 10 mmol/L NaCl; 3 mmol/L MgCl₂) ,吹打混匀,5 000 r/min离心5 min,弃上清。重复此步骤至沉淀呈白色。

(2)加入330 μl提取液,包括:1 mol/L Tris-HCl(pH 7.5); 0.5 mol/L EDTA(pH 8.0); 1 mol/L NaCl; 1 mol/L DTT; ddH₂O。然后加10 mg/ml蛋白酶K 30 μl; 10% SDS 40 μl至总体积为400 μl,吹打混匀,55℃水浴,消化(12~14 h)过夜^[11]。

(3)重新加入30 μl 10 mg/ml的蛋白酶K,继续消化(6 h)。

(4)加入16 μl 10 mg/ml RNase, 37℃水浴(1~1.5 h)。

(5)酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)萃取液(等体积约400 μl)萃取2次,10 000 r/min离心5~10 min,取水相,然后用氯仿:异戊醇(24:1)萃取1~2次,至中央无蛋白层为止;

(6)吸取水相后,加入2倍体积的冰冻无水乙醇,-20℃沉淀20 min;

(7)12 000 r/min离心5~10 min,去上清,加70%乙醇溶液洗2~3遍,然后在超净台风干,待乙醇挥发后,加入20 μl TE或ddH₂O(TE:10 mmol/L Tris-HCl pH 8.0; 1 mmol/L EDTA pH 8.0),50℃水浴溶解20 min,4℃放置一夜使其充分溶解;

(8)放入冰箱-20℃保存,备用。

1.2.2 DNA 的检测与含量的测定 取少量 DNA (约 2 μl) 溶液在 1% 琼脂糖 (Promega, USA) 凝胶上电泳 30 min, 电泳缓冲液为 $1 \times \text{TAE}$, 电压为 5 V/cm, 凝胶经溴化乙锭 (EB) 染色后在紫外灯下观察照相, 以检测 DNA 提取的质量; 利用紫外分光光度计 (DU-640, Beckman, Germany) 测定 DNA 含量, 当 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 在 1.75 ~ 2.0 之间, 260 nm 处吸光值在 0.1 左右时, 将提取液稀释至一定浓度后分装于 1 ml Eppendorf 管内, -20°C 保存备用。

1.2.3 PCR 扩增、产物回收及序列测定 利用一对引物 (L16757: 5'-AGGACTACGGC-TTGAAAAGC-3' 及 H1259: 5'-CATCTTGGCAT-CTTCAGTGCC-3' 上海生工)^[17] 对白冠长尾雉和环颈雉的线粒体 DNA 控制区 (control region, CR) 的全序列进行 PCR 扩增, 验证从卵壳膜中提取 DNA 的实用性。

PCR 反应体系 (共 25 μl) 为: DNA 模板 100 ng; 引物 0.5 $\mu\text{mol/L}$; Taq DNA 聚合酶 (Takara) 1 U; 2.5 mmol/L MgCl_2 (Takara); dNTP 各 0.2 mmol/L (Takara); $10 \times \text{PCR Buffer}$ (Takara)。反应条件为: 94°C 预变性 3 min; 94°C 变性 30 s, 白冠长尾雉 50°C 退火 45 s, 环颈雉 48°C 退火 1 min, 72°C 延伸 60 s, 40 个循环; 72°C 延伸 10 min。扩增在 PTC-100 型 PCR 仪上进行。

PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色后在紫外凝胶成像仪 (北京鼎国公司) 上观察、照相, 产物为单一条带。切割目的片段, 用凝胶片段回收试剂盒 (上海华舜生物工程有限公司) 回收后, 对产物直接进行测序 (北京华大中生科技发展有限公司)。

1.2.4 性别鉴定 利用引物 (P8 5'-CTCCCA-AGGATGAGAACTG-3' 及 P2 5'-TCTGCATCGCA-TAATCCTTT-3' 上海生工)^[18] 对一窝环颈雉的卵壳膜所提取 DNA 进行 PCR 扩增。所扩增的染色体解旋酶 DNA 结合基因 (Chromo-helicase-DNA-binding, CHD) 是位于性染色体上的一个功能基因, 在鸟类中相对保守。CHD-W 仅存在于雌性个体, 而 CHD-Z 在 2 种性别中都存在。2 个基因的外显子序列相似但内含子序列长度

不同, 扩增产物经电泳检测: 雌性显示 2 条带, 而雄性只有一条带, 因此可以通过判断条带的数目来鉴定性别。

PCR 反应体系 (共 25 μl) 为: DNA 模板 100 ~ 200 ng; 引物 1.5 $\mu\text{mol/L}$; $10 \times \text{PCR Buffer}$ (Takara); 1.0% Triton X-100; 1.5 mmol/L MgCl_2 (Takara); 0.2 mmol/L dNTP (Takara); Taq DNA 聚合酶 (Takara) 1 U。反应条件除了在 48°C 退火 45 s 外, 其余与前文所述相同。

取 10 μl PCR 扩增产物, 加入 2 μl $6 \times \text{loading buffer}$, 用 2% 琼脂糖凝胶在 $1 \times \text{TAE}$ 溶液中 80 V 电泳 1 h。经溴化乙锭染色后, 在紫外灯下观察, 分析并拍照。

2 结果

2.1 DNA 含量及电泳检测结果 卵壳膜所提取的 DNA 利用紫外分光光度计测定含量, 白冠长尾雉和环颈雉卵壳膜的 DNA 电泳图见图 1, 其中图 1a 为检测质量的电泳图。

2.2 PCR 扩增线粒体控制区结果 图 1b、图 1c 分别为白冠长尾雉及环颈雉的不同个体 (1 ~ 5 号) 线粒体 DNA 控制区 PCR 产物的电泳图。从图中可以看出, 利用卵壳膜提取的 DNA 在 PCR 扩增时条带长度在 1 000 ~ 2 000 bp 之间, 亮度清晰, 产物浓度较高。

2.3 测序结果 对 2 只白冠长尾雉个体的线粒体 DNA 控制区 PCR 产物进行回收测序, 结果显示该片段序列长度为 1 151 bp, 2 只个体为同一单倍型, 与 GenBank 里的白冠长尾雉序列 (AY368066) 进行比对, 发现有一个位点不同: 第 190 位点存在一个碱基转换 (T \rightarrow C), 变异率约为 0.087%。对 4 只环颈雉个体的线粒体 DNA 控制区进行回收测序, 结果显示该片段序列长度为 1 145 bp, 4 只个体为同一单倍型, 与本实验室用环颈雉肌肉提取的 DNA 线粒体控制区扩增测序结果进行比对 (肌肉样品来自河南董寨), 发现有 2 个位点不同: 第 267 位为碱基转换 (T \rightarrow C), 第 915 位点为碱基颠换 (T \rightarrow A), 变异率约为 0.17%。

2.4 性别鉴定结果 对一窝环颈雉卵 (共 7

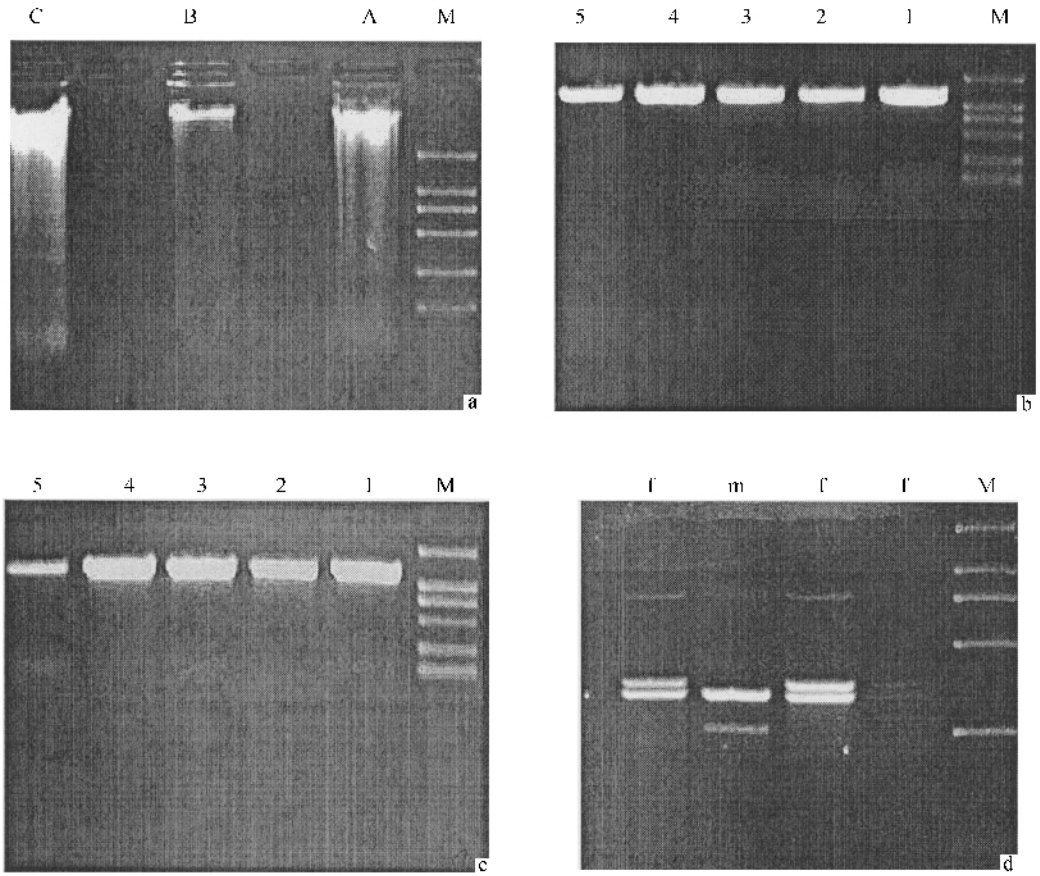


图 1 白冠长尾雉和环颈雉卵壳膜的 DNA 电泳图

a. 总 DNA :A 为环颈雉 DNA ,其含量为 256 ng/ μ l ,B、C 为白冠长尾雉 DNA ,其含量分别为 170 ng/ μ l、200 ng/ μ l ;b. 白冠长尾雉线粒体 DNA 控制区 PCR 扩增产物 ;c. 环颈雉线粒体 DNA 控制区 PCR 扩增产物 ;d. 利用 *CHD* 基因对环颈雉进行性别鉴定的电泳图 (f 雌性 ,m 雄性) ,M 表示 DNA Marker DL2000 (Takara) ,从上到下依次为 2 000、1 000、750、500、250、100 bp.

枚)孵化后的卵壳进行 DNA 提取 ,用紫外分光光度计检测 ,含量分别为 :232 ng/ μ l、1 000 ng/ μ l、660 ng/ μ l、284 ng/ μ l、44 ng/ μ l、256 ng/ μ l、704 ng/ μ l。性别鉴定显示 7 只雏鸟为 3 雄 4 雌 ,即该窝环颈雉的新生雏鸟性比为 1 : 1.33。此结果与同窝新生雏鸟发育到成鸟后通过外形观察得到的结果完全一致。图 1d 所示为部分电泳检测图 ,*CHD* 基因扩增条带位于 300 bp 左右。由于非特异性扩增 ,使 f 在 750 bp 产生非特异性条第 ;m 在 250 bp 产生非特异性条第。

3 讨论

3.1 利用卵壳膜提取 DNA 的可靠性及应用前景 利用卵壳膜提取的遗传物质与采用其他非

损伤取样方法如从动物的唾液、毛发、羽毛、粪便、尿液^[19]、食团中提取出的遗传物质^[20]在实际应用中并没有本质差别。Pearce 等^[14]对巢中可利用资源的研究发现 ,卵壳膜可提供充足的子代 DNA ,同时结合亲代羽毛 DNA 进行分析 ,可以为婚配制度提供大量的可靠数据。由于不需要捕捉及伤害动物 ,而且提取的 DNA 含量相对较多 ,因此卵壳膜作为又一种非损伤取样材料开始受到生态学家尤其是保护生物学家的关注。

在探讨物种生活史问题和婚配制度时 ,必须考虑样品采集的真实性和纯净性 ,避免交叉污染。本研究在独立取样的前提下 ,收集幼鸟出壳后的卵壳膜 ,对其进行 DNA 提取 ,利用一

对引物 L16757 及 H1259^[17]对两种雉类线粒体 DNA 的控制区进行扩增,并对 PCR 产物进行了回收测序。通过与已知序列的比对,证实我们的扩增产物确实是目标物种的线粒体 DNA,从而说明利用卵膜提取鸟类 DNA 的真实性。

然而在有些研究中,也有人提出从鸟卵中所提取的 DNA 因受母体 DNA 的影响,而不能真正代表子代遗传信息的观点^[21]。我们认为这与取样的部位以及鸟卵孵化的程度有关。对于雏鸟已经成功孵化后所遗留的卵壳,其内部卵壳膜上的血丝来自于雏鸟,因此利用该血丝提取的 DNA 可以反映雏鸟的遗传组成。此外,本实验还利用卵壳膜提取的 DNA 进行了雏鸟性别的鉴定,所得结果与同窝新生雏鸟长大后根据其形态特征对性别进行鉴定的结果完全一致,从而证明了卵壳膜 DNA 能够反映子代的遗传信息,作为一种可靠的实验材料可以在鸟类分子生态学领域中得到应用。我们认为,从卵壳膜中所提出的 DNA,在种群遗传结构、亲缘关系、扩散、婚配制度、性比等多方面问题的探讨中具有广阔的应用前景。

3.2 一些技术问题的讨论 在利用卵壳膜提取 DNA 过程中,有时会出现 DNA 浓度过低(少于 10 ng/ μ l)的现象。分析原因,主要与样品质量以及取样部位不当有关。由于卵壳膜中含有包括胎粪、新生雏鸟血丝、胎膜、残余卵黄在内的多种成分,如果采集的样品保存时间过久或受到泥土灰尘污染,就可能导致所取到的样品大部分是蛋白,从而影响提取 DNA 效果。因此,建议在取样时尽可能地保证卵壳膜新鲜清洁,而且应选择卵壳膜中含有血丝的部分进行 DNA 提取实验。

除此之外,DNA 的提取量还取决于细胞的裂解程度,采用适当的方法破碎细胞,尽可能多地释放出 DNA,能有效提高 DNA 的收获量^[22]。本实验采用红细胞破碎液对样品进行了处理,目的就是为了使细胞能释放出更多的 DNA。

由于卵壳膜中含有大量的蛋白质,在实验过程中可能造成 DNA 的纯度降低,最终影响到 PCR 反应的质量。根据多次实验,发现蛋白酶

K 的添加量不足和消化时间的减少,会显著降低 DNA 的回收量。因此在 DNA 提取的过程中,应适当增加蛋白酶 K 并延长消化时间,这样能使蛋白含量大大降低,DNA 纯度提高,OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值也有所提高。

另外,在实验过程中,如出现 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值大于 2.0 的情况,则提示提取物中 RNA 含量过多^[23]。杂质 RNA 会降低 DNA 纯度,严重影响 PCR 反应。因此,在用酚/氯仿/异戊醇萃取前,可添加 RNase,37℃ 水浴 1~1.5 h,这样可使 RNA 含量减少。适当调整 RNase 的用量,尽可能地降解 RNA,可大大提高 DNA 的纯度,提高后续 PCR 的成功率。

本研究利用鸟类孵化卵壳中的卵壳膜提取 DNA,获得了良好的实验效果,从而为开展我国雉类分子生态学研究提供了新的取样途径。借助这种非损伤取样技术,可以在不干扰动物活动的前提下,开展诸如性比、扩散行为、婚配制度等方面的研究工作。

参 考 文 献

- [1] Hiroki H, Soichi K, Satoru M, *et al.* Rapid sexing of bovine preimplantation embryos using loop-mediated isothermal amplification. *Theriogenology*, 2004, **62**: 887~896.
- [2] Wan Qiu-Hong, Qian Kai-Xian, Fang Sheng-Guo. A simple DNA extraction and rapid specific identification technique for single cells and early embryos of two breeds of *Bos taurus*. *Animal Reproduction Science* 2003, **77**: 1~9.
- [3] Delefosse T, Hienne R. Extracting DNA from all forensic samples with KingFisher technologies. *International Congress Series*, 2004, **1 261**: 577~579.
- [4] Taberlet P, Bouvet J. A single plucked feather as a source of DNA for bird genetics studies. *The Auk*, 1991, **108**: 959~960.
- [5] Taberlet P, Griffin S, Goossens B, *et al.* Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic Acids Research*, 1996, **24**: 3 189~3 194.
- [6] 万发春, 王慧, 吴乃克. 血液中 DNA 提取方法的比较研究. *山东畜牧兽医*, 1999, (1): 6~7.
- [7] 饶刚, 李明, 牛屹东等. 陈旧皮张中 DNA 提取的新方法. *动物学杂志*, 2001, **36**(4): 53~57.
- [8] 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. *动物学报*, 2001, **47**(3): 338~342.

- [9] Morin P A , Chambers K E , Boesch C , *et al.* Quantitative PCR analysis of DNA from noninvasive samples for accurate microsatellite genotyping of wild chimpanzees (*Pan troglodytes verus*). *Molecular Ecology* , 2001 , **10** : 1 835 ~ 1 844 .
- [10] Reed Z , Tollit D J , Thompson P M , *et al.* Molecular scatology : the use of molecular genetic analysis to assign species , sex and individual identity to seal faeces . *Molecular Ecology* , 1997 , **6** : 225 ~ 234 .
- [11] 詹祥江 , 张正旺 , 吴爱平等 . 基于线粒体细胞色素 *b* 基因序列的虹雉属鸟类的系统发育关系 . *动物学研究* , 2003 , **24** (5) : 337 ~ 342 .
- [12] 钟华 , 赖旭龙 , 魏荣平等 . 一种从大熊猫粪便中提取 DNA 的改进方法 . *动物学报* , 2003 **49** (5) : 670 ~ 674 .
- [13] Idaghdour Y , Broderick D , Korridal A . Faeces as a source of DNA for molecular studies in a threatened population of great bustards . *Conservation Genetics* , 2003 , **4** : 789 ~ 792 .
- [14] Pearce J M , Fields R L , Scribner K T . Nest materials as a source of genetic data for avian ecological studies . *J Field Ornithol* , 1996 , **68** (3) : 471 ~ 481 .
- [15] 郑作新 . 中国动物志 (第四卷) 鸟纲 : 鸡形目 . 北京 : 科学出版社 , 1978 .
- [16] 郑光美 , 王岐山 . 中国濒危动物红皮书 鸟类 . 北京 : 科学出版社 , 1998 .
- [17] Randi E , Lucchini V . Organization and evolution of the mitochondrial DNA control region in the avian genus *Alectoris* . *J Mol Evol* , 1998 , **47** (4) : 449 ~ 462 .
- [18] Griffiths R , Double M , Orr K , *et al.* A simple DNA test to sex most birds . *Molecular Ecology* , 1998 , **7** : 1 071 ~ 1 076 .
- [19] Valiere N , Taberlet P . Urine collected in the field as a source of DNA for species and individual identification . *Molecular Ecology* , 2000 , **9** : 2 150 ~ 2 152 .
- [20] Lam K M , Apoptosis in chicken embryo fibroblasts caused by Newcastle disease virus . *Veterinary Microbiology* , 1995 , **47** : 357 ~ 363 .
- [21] Arnold K E , Orr K J , Griffiths R . Primary sex ratios in birds : problems with molecular sex identification of undeveloped eggs . *Molecular Ecology* 2003 , **12** : 3 451 ~ 3 458 .
- [22] Julia R de Liphay , Christiane Enzinger , *et al.* Impact of DNA extraction method on bacterial community composition measured by denaturing gradient gel electrophoresis . *Soil Biology & Biochemistry* 2004 , **36** : 1 607 ~ 1 614 .
- [23] 魏群 . 分子生物学实验指导 . 北京 : 高等教育出版社 , 施普林格出版社 , 1999 , 66 ~ 68 .