

# 分子标记技术在灵长类繁殖行为研究中的应用\*

## ——技术

王晓燕 张树义

(中国科学院动物研究所 北京 100080)

关键词 分子标记技术 灵长类 繁殖行为

分子生物学的诞生标志着人类对生命的认知已经进入到一个更深的层次。本世纪后半叶这一领域及其新技术的迅猛发展对于生物学的各个领域都产生了极其深刻的影响,传统生物学的许多分支学科都与分子生物学发生交叉。另一方面,由于与人类特殊的亲缘关系,非人灵长类动物的研究近 30 余年来在国际范围内突飞猛进地向前发展,并且逐渐地独立于其它动物类群的研究而形成一门独立的学科——灵长类学。在灵长类学中,其行为学方面的研究近年来尤其活跃。因此不难相象,先进的分子生物学技术自然而然要渗入到灵长类行为学研究中。本文就从技术和应用两方面介绍目前国际范围内分子标记(Molecular Marker)技术在灵长类繁殖行为研究中的应用。

自分子生物学诞生以来,随着生物技术的发展,遗传标记技术先后经历了形态学水平、细胞学水平、染色体水平、并最终进入分子水平,即在蛋白质和 DNA 水平上更精细和准确地揭示遗传信息。

### 1 蛋白质标记

生物的遗传信息储存在核基因组和细胞器 DNA 的核苷酸序列中。根据遗传信息的中心法则,蛋白质中的氨基酸顺序通过 mRNA 直接反映了 DNA 链上的核苷酸序列。即,蛋白质是基因的产物,蛋白多肽链结构中氨基酸的序列是 DNA 结构基因所携带的遗传信息编码和表达的结果。因此蛋白质多态性可有效地从分子水平阐述这种群中基因频率的变化。

**1.1 血型标记** 这是一种最初源于符合 Mendal 式质量性状的遗传标记。对单位点上三个复等位基因控制的 A、B、O 血型的分析,可以得出该位点三个复等位基因的种类频率以及在种群中的多态性。免疫学和血清学的发展,又使得制备多特异性分型血清成为可能。这项技术可用于检测一些不可识别位点的产物,从这个角度看,多特异的分型血清类似于一个多位点的 DNA 指纹图谱的探针。此外,Stone<sup>[1]</sup>在猕猴中制备了检测 13 个独立血型位点的单特异性试剂,它们几乎可以识别 200 万可能的基因型。因此,血型标记成为首批用于父本鉴定和动物交配行为研究的有力工具之一。

**1.2 血清蛋白标记** 用于分子标记的血清蛋白包括转铁蛋白(TF),补体成分(C),免疫球蛋白(IG),脂蛋白(LP)等,其中转铁蛋白因其在很多物种中高度的多态性而应用广泛。例如,猕猴呈现 13 种不同形式的 TF 等位基因。1993 年采用的全自动程序化 Phast 系统使 TF 电泳更为快速、灵敏和准确。TF 高度的多态性使之尤其适合于亲缘关系的鉴定。

此外,非人灵长类动物淋巴细胞中的 MHC (Major Histocompatibility Complex, 主组织相容性抗原)标记亦倍受重视。已知 I 类 MHC 编码的表面抗原(糖蛋白)可为多克隆血清检测,在免疫移植中的起主要作用的 I 类 MHC 标记

\* 中国科学院“百人计划”资助;

第一作者介绍:王晓燕,女,27岁,助理研究员,硕士;

收稿日期:1997-02-28,修回日期:1997-05-22

在很多物种中高度多态<sup>[2]</sup>。然而, MHC 标记的分型技术虽然精细地反映了个体的特异性, 却费时、费力、价格昂贵。直到不久前, PCR 技术的问世才使得 MHC 位点的分型可在 DNA 水平迅速完成; 同时, 等位基因特异性的寡核苷酸探针亦能识别不同的等位基因。

**1.3 同工酶标记** 同工酶标记是对同种酶不同分子形式的电泳谱带分析, 通过识别控制这些谱带表达的基因位点和等位基因而达到在基因水平上揭示遗传变异的目的。虽然同工酶仍然只是遗传信息的表型, 但通过其谱带的分析能够快速而简便地识别出编码这些谱带的基因位点和等位基因。由于同工酶谱带与基因位点直接相关, 而且几乎 25% 的位点具有多态性<sup>[3]</sup>, 所以这种技术已经成为一种十分有效的分子标记方法。近年来发展的等位酶水平切片凝胶电泳技术再次给同工酶标记以巨大的推进作用。这项技术已被广泛应用于系统学和进化学的研究中。同时, 同工酶标记对于种群的遗传结构, 即遗传变异的种群中的分布的研究, 对保护生物学产生了不可估价的影响。

## 2 DNA 标记

DNA 是遗传信息载体, 遗传信息正是储存于 DNA 的碱基序列中。70 年代末 DNA 重组技术的产生以及随之而来的分子克隆技术突飞猛进地发展使分子标记更准确而直接, 即直接标记遗传物质 DNA 本身, 这种 DNA 标记的直接度量避免了以表型性状推测基因型时可能出现的许多问题。

DNA 标记的来源可分为核基因组 DNA 和细胞器 DNA, 细胞器 DNA 包括线粒体 DNA 与核糖体 DNA (植物中还有叶绿体 DNA)。快速进行化且遵循母系遗传的线粒体 DNA 是动物遗传多态性的研究热点, 尤其适合于种群分析, 其中 *cytb* 的 34bp 适合于种、亚种间的遗传分析; 同一物种不同家族群间的分析则选择可变的 D-loop 及其控制区。核糖体 DNA 在系统学和进化研究中价值非凡, 其中保守的编码区适于高分等级度的系统分析, 而高度可变的非编

码区则适于遗传多样性和与观进化的研究<sup>[4]</sup>。

根据识别位点的不同, DNA 分子标记分为三大技术: 限制性片段长度多态性 (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP), 简单序列长度多态性 (Single Sequence Length Polymorphism, SSLP) 和随机扩增的 DNA 多态性 (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD), 现分述如下:

**2.1 限制性片段长度多态性 (RFLP)** 迄今为止, 已分离到的限制性内切酶种类已有 500 多种, 它们各自有其特异的识别位点, 并且在不同物种中有其各异的切割频率。因此, 源于一个编码或不编码位点的碱基变化 (替换, 缺失, 插入) 可引起或破坏一个识别位点, 从而改变限制性内切酶在该物种中的切割频率, 表现在酶切图谱上即 DNA 片段数量和长度的变化, 由此形成限制性长度的多态性。这种 DNA 分型的多态性受限于物种基因组酶切位点的频率, 即只能检测发生于识别位点的突变。假如突变只发生一个单拷贝基因, 则最多只能揭示两个等位基因的多态现象。然而, 各种限制性内切酶与 DNA 探针的组合, 仍然能揭示出一大批 DNA 标记, 从而有效地揭示 DNA 水平的遗传变异。

### 2.2 简单序列长度多态性 (SSLP)

**2.2.1 多位点探针与 DNA 指纹图谱 (Multilocus Probe and DNA Fingerprint)** 人类基因组包含高达 30% 的重复 DNA 序列, 其它真核生物亦是如此。最初在血红蛋白基因附近发现两个含有高可变重复序列的位点, 它们由 10~60bp 的重复序列串联重复而成, 后来发现类似的高可变重复序列遍布于基因组的很多位点<sup>[5]</sup>。重复 DNA 元件的缺失和插入形成了滚类可变数目串联重复 (Variable Number of Tandem Repeats, VNTR) 的多态性。

以重复序列的核心序列为探针, 与基因组的限制性酶谱进行杂交, 从而得到该物种的 DNA 指纹图谱或称 DNA Profile。因其包含有丰富的多态信息, 选择合适的限制性酶类和探针, 便可得出具有个体特异性的指纹图谱。DNA 指纹

图谱在诞生之初就在父本鉴定的研究中展示出诱人的前景,而且在第一个指纹图谱产生的七年里在个体识别、家系研究、分子进化以及社会生物学的领域中取得长足的进展。然而,由于这项技术不能精细地识别和标记全部位点,即它不可能将斑带(band)归于个体特异的位点,每一条可能包含几个位点相同大小的基因,或者实际上相同长度的位点却具有不同的内部结构<sup>[6]</sup>,因而妨碍了真正的遗传分析,使父本鉴定和其他遗传标记的结果只能建立于最大可能性的基础上。同时,由于其较低的重复性和表现在带深度的变异,有时需辅以其它的方法,才能给出可信和精细的结果。尽管如此,DNA指纹图谱在灵长类动物行为模式、婚配制度、家系分析相关的血亲鉴定中仍独具魅力。

已知有四种多位点探针用于灵长类中的指纹图谱分析,其中三种具有类似的富含C的核心重复序列<sup>[7]</sup>。常用的探针即最早的小卫星探针 33.15 和 33.16<sup>[8]</sup>。人类法医学对这两个探针应用的经验已用于从狐猴到猿的许多非人灵长类动物中<sup>[9-10]</sup>。野生型 M13 分离的探针也成功地用于黑猩猩<sup>[11]</sup>和猕猴<sup>[12]</sup>的研究。有趣的是,人类癌基因 Ha-ras 探针在某些条件下可视为单位点探针,在另外的条件下却可与多位点限制片断杂交<sup>[13]</sup>。此外,人工合成的寡聚微卫星探针已用于多种灵长类动物中<sup>[14-15]</sup>。

**2.2.2 单位点探针与 DNA 分型(Single Locus Probe and DNA Typing)** 多位点探针应用的局限性使人们将目光投向单位点探针的应用。单位点探针即识别单拷贝的 DNA 序列,一对等位基因在杂合状态存在时呈现电泳图谱的二带模式。人们很快发现,单位点 DNA 分型的优点在于种群或家族群中等位基因大小在分子水平上可被精细定义。这些数据形成群体遗传分析的基础,并用于小群体中等位基因频率和种群内的比较。因为这种来自分子水平等位基因的数据适合于方法学上的标准化,所以有可能积累每一物种的分子遗传分析。

单位点探针 Ms1 和 Ms32 已用于很多种非人灵长类的测试中<sup>[16]</sup>。Ms32 在人类中高度可

变,在黑猩猩中有三种不同的等位基因形式,但在另外一些种中呈现单态。Ms1 在猿类中表现为有限的多态,在猕猴中却多态丰富。人类中发现的许多单位点探针也开始用于非人灵长类中。Wolff 等<sup>[17]</sup>用单位点探针 YNZ2 在各种猩猩中发现高度的多态。Inoue<sup>[18]</sup>发现 YNZ22 在日本猕猴中极具价值,但在猩猩中却不能检测到高可变位点。

单位点探针的 DNA 分型需要 4~5 个探针的组合应用才能给出足够的个体信息。即么一个新的问题是单位点探针的开发。如果有专门的实验室开发合适的探针,多个单位点探针组合应用的 DNA 分型技术有可能取代多位点探针的指纹图谱,以获得更准确的血亲关系分析。此外,单位点探针的 DNA 分型技术在种群结构、动物行为以及基因流中的研究也有可能展示诱人的前景。

**2.3.3 随机扩增的 DNA 多态性(RAPD) PCR 技术**在方法学上掀起了一场革命,并在生物学的分支学科中引导出一种新的分子标记技术—随机扩增多态 DNA(RAPD)。Williams<sup>[19]</sup>等首次用随机顺序的 10bp 的寡核苷酸作为引物,对未知序列的 DNA(基因组 DNA,细胞 DNA 或其它 DNA 片段)进行 PCR 扩增,从而得到电泳图谱上一组不连续的片段。因为引物的随机性,所获得扩增片段在整个基因组上亦随机分布;同时,RAPD 谱带呈现典型的 Mendel 遗传模式,因此,这种扩增谱带可被认为是分子图谱的位点,RAPD 也被认为是一种有效的分子标记技术。虽然,显性标记的 RAPD 不能进行等位基因的直接分析,但其快捷、通用,并且在对物种遗传背景无所知的情况下便能进行多态性分析,因此被广泛应用于物种鉴定,品质鉴定和种群遗传学研究。

PCR 技术为宏观动物学研究带来的又一个方法上的革新便是非损伤性 DNA 分型技术(Non-invasive DNA Genotyping)的出现。在此之前,人们无法想像一个毛囊中提取的 DNA 能够适合于任何一种遗传学分析。1988 年 Higuchi 等<sup>[20]</sup>首次以这种非损伤性的取样进行

了 tRNA 基因的 200bp 的遗传分析。此后,非损伤性的 DNA 基因分型技术被用于分子系统学、行为生物学、种群生物学等各个领域,并将对保护生物学产生深远的影响。

### 参 考 文 献

- 1 Stone, W. H., P. C. S. Treichel, J. L. Vandenberg. Genetic significance of some common primate models in biomedical research. 73~93. In: *Animals Models: Assessing the Scope of Their Use in Biomedical Research*, Anal. R. Liss, New York. 1987.
- 2 Jonker, J., G. Meurs, H. Balner. Typing for RhLA-D in Phebus monkeys: II. Genetics of the D antigens and their association with the DR antigen in a population of unrelated animals. *Tissue Antigens*, 1982, 19: 69~78.
- 3 Vandenberg, J. L. Biochemical markers and restriction fragment length polymorphisms in baboons; their power for paternity exclusion. 18~31. In: *Paternity in Primates: Genetic Test and Theories-Implications of Human DNA Fingerprinting*, R. D. Martin, A. F. Dixson, & E. J. Wickings (eds.), Karger, Basel. 1992.
- 4 Avise, J. C. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. New York: Chapman and Hall. 1994.
- 5 Ely, J., D. A. Alford, R. E. Ferrell. DNA fingerprinting and the genetic management of a captive chimpanzee population (*Pan troglodytes*). *Amer. J. Primatol.*, 1991, 24: 39~54.
- 6 Jeffreys, A., R. Neumann, V. Wilson. Repeat unique sequence variation in minisatellite: a novel source of DNA polymorphism for studying variation and mutation by single molecule analysis. *cell*, 1990, 60: 473~485.
- 7 Wassart, D., Georges, R. Monsieur, R. Brocas, A. S. Lequarre and D. Christophe. A sequence in M13 phage detects hypervariable minisatellites in human and animal DNA. *Science*, 1987, 235: 683~684.
- 8 Jeffreys, A., V. Wilson, S. Then. Hypervariable minisatellite region in human DNA. *Nature*, 1985, 314: 67~73.
- 9 Weiss, M. L., V. Wilson, C. Chan, T. Turner and A. J. Jeffreys. Application of fingerprinting probes to Old World monkeys. *Amer. J. Primatol.*, 1988, 16: 73~79.
- 10 Turner, T. R., M. L. Weiss, M. E. Pereira. DNA fingerprinting and paternity assessment in Old World monkeys and ring-tailed lemurs. 32~52. In: *Paternity in Primates: Genetic Tests, Theories*, R. D. Martin, A. F. Dixson, & E. J. Wickings (eds.), Karger, Basel. 1992.
- 11 Ely, J., R. E. Ferrell. DNA fingerprinting and paternity ascertainment in chimpanzees (*Pan troglodytes*). *Zoo Biology*, 1990, 9: 91~98.
- 12 Martin, P. A., O. A. Ryder. Founder contribution and pedigree inference in a captive breeding colony of long-tailed macaques, using mitochondrial DNA and DNA fingerprinting analysis. *Zoo Biology*, 1991, 10: 341~352.
- 13 Washio, G., S. Misawa, S. Ueda. Probe walking: development of novel probes for DNA fingerprinting. *Human Genet.*, 1987, 83: 223~226.
- 14 Kuster, J., A. Paul, J. Arnemann. Paternity determination by oligonucleotide DNA fingerprinting in Barbary macaques (*Macaca sylvanus*). 155~174. In: *Paternity in Primates: Genetic Test and Theories*, R. D. Martin, A. F. Dixson, & E. J. Wickings (eds.), Karger, Basel. 1992.
- 15 Wickings, E. J., A. F. Dixson. Application of DNA Fingerprinting to familial studies of Gabones primates. 113~130. In: *Paternity in Primates: Genetic Tests and Theories*, R. D. Martin, A. F. Dixson, & E. J. Wickings (eds.) Karger, Basel. 1992.
- 16 Gray, I. C., A. J. Jeffreys. Evolutionary transience of hypervariable minisatellites in man and the primates. *Proc. R. Soc. Lon. B*, 1991, 243: 241~253.
- 17 Wolff, R., Y. Nakamura, S. Odelberg, R. Shiang, R. White. Generation of variability at VNTR loci in human DNA. 20~38. In: *DNA Fingerprinting: Approaches and Applications*, T. Burke, G. Dolf, A. J. Jeffreys, & R. Wolf (eds.) Birkhauser Verlag, Basel. 1991.
- 18 Inoue, M., F. Mitsunaga, M. Nozaki, H. Ohsawa, A. Takenaka, Y. Sugiyama, K. Shomizu and O. Takenaka. Male dominance rank and reproductive success in an enclosed group Macaques; with special reference to post conception mating. *Primates*, 1993, 34: 503~511.
- 19 Williams, J. G. K., A. R. Kubeli, K. J. Livak, J. A. Rafalski, S. V. Tingey. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, 1990, 18: 6531~6535.
- 20 Higuchi, R., D. H. von Beroldingen, G. F. Sensabaugh, H. A. Erilgh. DNA typing from single hairs. *Nature*, 1988 332: 543~546.