

# 圈养东北虎 ISSR 指纹分析初报

白秀娟

(东北农业大学动物科技学院, 哈尔滨, 150030)

关键词: 东北虎; ISSR 指纹; 遗传变异

中图分类号: Q751

文献标识码: A

文章编号: 1000 - 1050 (2004) 01 - 0090 - 04

## ISSR Fingerprint for Manchurian Tigers in Captivity

BAI Xiujuan

(Animal Science and Technology College, Northeast Agriculture University, Harbin, 150030, China)

**Abstract:** Manchurian tigers kept in Hengdaohezi Breeding Center, Heilongjiang province, were fingerprinted using inter simple sequence repeated (ISSR) technique. Seven primers were screened out of 20 primers with 41 sites deprived. The results indicated that 31 bands were polymorphic sites and the frequency was 76%. The maximum genetic similarity coefficients among the 15 tigers were 0.526 3 and 0.090 9, respectively. The average genetic similarity coefficient of the population was 0.327 1.

**Key words:** Manchurian tiger (*Panthera tigris altaica*); ISSR fingerprint; Genetic variation

东北虎 (*Panthera tigris altaica*) 是国家一级保护动物, 由于其野外生境逐渐丧失和岛屿化, 野生东北虎只有 10 余只分布在中国<sup>[1]</sup>。为此, 国家在黑龙江省横道河子成立了猫科动物繁育中心, 迁地保护东北虎种群。本研究应用 ISSR (Inter Simple Sequence Repeats, ISSR)<sup>[2]</sup> 遗传标记检测分析了圈养东北虎种群的遗传多样性, 为该种群建立遗传档案、避免近交衰退奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 样本的采集和基因组 DNA 的制备

在东北虎换毛季节收集脱落被毛百余根, 去污

剂清洗后晾干, 带回实验室。基因组 DNA 的制备根据孟安明等<sup>[3]</sup>的方法并稍加改进。向装有裂解液 [10 mM Tris - Cl (pH 8.0), 0.2 M EDTA (pH 8.0), 2% SDS、500 μg/ml 蛋白酶 K] 的 1.5 ml 离心管中加入剪碎的虎毛, 55 水浴消化 4~5 h。饱和苯酚抽提 1 次, 再用酚/氯仿/异戊醇 (24/23/1) 及氯仿/异戊醇 (23/1) 各抽提 1 次, 无水乙醇沉淀, 最后以 75% 乙醇洗涤并干燥后加入 TE 溶解

### 1.2 试剂

20 个双核苷酸引物序列委托东北林业大学野生动物资源学院动物遗传工程实验室合成, 其序列组成见表 1<sup>[4]</sup>; 其他生化试剂购自 Promega 公司。

表 1 ISSR 引物序列

Table 1 ISSR Primer sequences

引物代码 Primer code	序列 Sequence	引物代码 Primer code	序列 Sequence
802	ATATATATATATATAT	815	CTCTCTCTCTCTCTCTG
803	ATATATATATATATATC	816	CACACACACACACACAT
805	TATATATATATATATAC	817	CACACACACACACACAA
806	TATATATATATATATAG	818	CACACACACACACACAG
807	AGAGAGAGAGAGAGGT	820	GTGTGTGTGTGTGTGTC
808	AGAGAGAGAGAGAGCC	822	TCTCTCTCTCTCTCTCA
809	AGAGAGAGAGAGAGGG	824	TCTCTCTCTCTCTCTCG
811	GAAGAGAGAGAGAGAC	827	ACACACACACACACAG
812	GAAGAGAGAGAGAGAA	829	TGTGTGTGTGTGTGTGTC
814	CTCTCTCTCTCTCTCTA	830	TGTGTGTGTGTGTGTGTC

基金项目: 林业部指南项目“濒危动物遗传规律与障碍的研究”

作者简介: 白秀娟 (1963 -), 女, 教授, 主要从事野生动物保护与利用方面的研究。

收稿日期: 2002 - 09 - 27; 修回日期: 2003 - 08 - 21

### 1.3 PCR 扩增与电泳检测

ISSR - PCR 反应体系参照文献<sup>[5,6]</sup>及本研究 PCR 扩增条件的优化试验结果, 确定扩增反应总体积 25  $\mu$ l, 其中含模板 DNA 10 ng, dNTP 2.5 mmol/L 甲酰胺 2% 引物 10 pmol/L、Tag DNA Polymerase 1U 10  $\times$ Buffer 3.5  $\mu$ l。用 PTC - 200 型 DNA 扩增仪 (美国) 扩增, 反应条件: 94 30 s, 48 45 s, 72 1 min, 40 个循环, 72 延伸 7 min。扩增产物在含溴化乙锭的 2% 琼脂糖凝胶中电泳 2~3 h (电压 2 V/cm), 电泳结束直接在 GDS - 8000 凝胶成像系统 (英国 UVP 公司) 上扫描记录。

### 1.4 数据分析

根据电泳结果, 统计扩增产物的多态性, 并依据 Nei 和 Li 的公式<sup>[7]</sup>, 计算个体间的相似系数 (Similarity index, S)。

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

式中  $N_{xy}$  是 X、Y 两个个体共享的 ISSR 条带数,

$N_x$ 、 $N_y$  分别为 X 和 Y 个体独有的 ISSR 条带数。

## 2 结果与分析

### 2.1 PCR 扩增结果

以 20 个双核苷酸引物对 15 个东北虎个体基因组 DNA 扩增结果, 有 7 个引物得到扩增产物, 13 个引物没有得到扩增。这 7 个引物为 807, 808, 809, 811, 812, 815, 822。从 7 个引物的碱基组成可见, AG、GA、CT 3 种双核苷酸的引物均得到扩增, 这说明东北虎基因组中, AG、GA、CT 的分布频率较高, 这与哺乳动物微卫星 DNA 的碱基组成特点相符。

7 个引物对东北虎共扩增出 41 条谱带, 其中 31 条是多态性片段, 多态率为 76%。扩增片段长度在 400~1100 bp 之间。图 1、2 是引物 809、812 扩增电泳图。

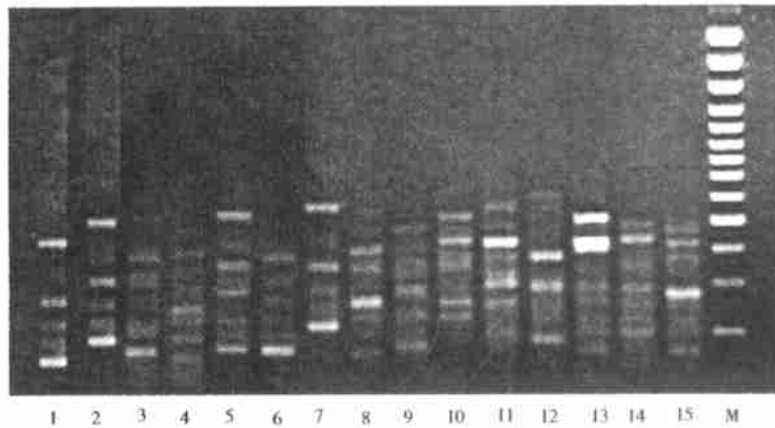


图 1 东北虎 1~15 号个体 809 号引物扩增结果

Fig. 1 Amplification results of primer 809 for 15 Manchurian tiger  
16 泳道是 Marker, 1~15 为东北虎 1~15 号个体的扩增产物

Lane 16 is marker; lanes 1 to 15 are amplification products of Manchurian tiger from No. 1 to No. 15

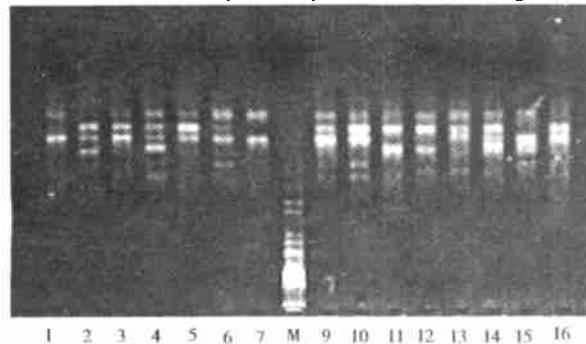


图 2 东北虎 1~15 号个体 812 号引物扩增结果

Fig. 2 Amplification results of primer 812 for 15 Manchurian tiger  
8 泳道是 Marker, 1~7、9~16 为东北虎 1~15 号个体的扩增产物

Lane 8 is marker; lanes 1 to 7 and 9 to 16 are amplification products of Manchurian tiger from No. 1 to No. 15

## 2.2 15 个东北虎个体间遗传相似指数 数据统计结果见表 2

表 2 东北虎个体间遗传相似性矩阵

Table 2 Genetic similarity among individuals in Manchurian tigers

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	1.0000													
2	0.3590	1.0000												
3	0.4500	0.4878	1.0000											
4	0.2857	0.1860	0.2727	1.0000										
5	0.3416	0.2857	0.3256	0.4444	1.0000									
6	0.2792	0.0909	0.2667	0.3404	0.3913	1.0000								
7	0.3077	0.1000	0.0976	0.3721	0.3338	0.3636	1.0000							
8	0.3500	0.1951	0.3338	0.2727	0.4186	0.4444	0.4390	1.0000						
9	0.1818	0.2609	0.2500	0.2979	0.3265	0.2667	0.4783	1.0000						
10	0.1500	0.2439	0.2381	0.1364	0.3256	0.1333	0.1463	0.3333	0.3913	1.0000				
11	0.2778	0.2703	0.2105	0.2000	0.2564	0.1956	0.2162	0.4211	0.4762	0.5263	1.0000			
12	0.3500	0.4390	0.3333	0.4090	0.4651	0.3111	0.2430	0.3333	0.3478	0.2857	0.4211	1.0000		
13	0.3721	0.3182	0.4000	0.2979	0.4783	0.3750	0.2273	0.4444	0.3265	0.4000	0.4390	0.4839	1.0000	
14	0.2001	0.1951	0.2587	0.2273	0.3256	0.4000	0.2439	0.2857	0.4348	0.2381	0.2105	0.2381	0.3556	1.0000

由上表可见, 15 个个体中遗传相似系数最大的是 0.526 3, 最小的是 0.090 9; 平均为 0.327 1。本研究表明, 黑龙江省横道河子猫科动物繁育中心的圈养东北虎具有较高的遗传多样性, 如果对该种群建立遗传档案, 是可以有效避免近交衰退的。

## 3 讨论

当前, 有关生物多样性的保护已成为国际社会瞩目的重大环境问题之一, 其中心环节是遗传多样性的保护。检测遗传多样性的方法随着生物学尤其是遗传学和分子生物学的发展而不断提高和完善, 从形态学水平、细胞学水平 (染色体)、生理生化水平逐渐发展到分子水平。有关东北虎 DNA 水平遗传多样性方面的研究报道不多。徐艳春<sup>[1]</sup>采用微卫星遗传标记 (Simple Sequence Repeats, SSR) 检测分析了东北虎、华南虎、孟加拉虎圈养种群的遗传多样性, 东北虎群体的遗传相似指数为 0.369 1~0.800 3, 由于采样群体及检测分析方法不同, 因此, 实验结果没有可比性。

ISSR 标记是 1994 年由 Zetkiewicz 建立起来的分子生物学技术。它是在 PCR 技术基础上发展起来的一种检测方法, 具有 PCR 技术的高效率、DNA 样品用量少、特异性强和检测方便等优点。ISSR 标记与随机引物扩增多态性 (Random Ampli-

fied Polymorphic, RAPD) 标记相同, 具有引物通用性的特点, 无需预先知道受试基因组 DNA 序列, 且引物无种属界限, 具有广泛的适用性。ISSR 标记优于 RAPD 标记的优点, 一是扩增检测的基因位点更加明确, 是基因组内微卫星 DNA 及间隔区 DNA。二是引物长度为 17 个碱基, 因此 PCR 扩增条件中的退火温度较高 (50 左右), 其稳定性和重复性好于 RAPD 标记。与 SSR 标记相比, ISSR 标记无须预先知道微卫星 DNA 的侧翼顺序, 且一次扩增检测的位点在 3~8 个左右或更多, 多态检出率高, 信息量明显高于 SSR。但 ISSR 标记与 RAPD 相似, 不能提供检测位点的纯合与杂合状态。

目前 ISSR 标记在植物遗传变异检测、确定品种 (品系) 的遗传分化、基因定位、目标基因早期鉴定和遗传图谱构建等多个方面得到应用, 并获得有意义的结果, 但在动物遗传多态性检测方面的研究报道较少。本研究将 ISSR 技术应用到东北虎遗传变异的检测, 扩展了动物遗传多样性的检测手段, 是一种有意义的尝试, 但由于采样数量及引物数量较少, 检测到的位点有限, 对横道河子猫科动物繁育中心圈养东北虎的遗传多样性的全面评价, 有待于进一步研究。

(下转第 77 页)

- Genet, 1997, 95: 408 - 417.
- [47] Prevost A, Wilkinson M J. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars [J]. *Theor Appl Genet*, 1999, 98: 107 - 112.
- [48] Godwin I D, Aitken E A B, Smith L W. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats [J]. *Theor Appl Genet*, 1994, 89: 998 - 1006.
- [49] Blair M W, Panaud O, McCouch S R. Inter-simple sequence repeat (ISSR) application for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Theor Appl Genet*, 1999, 98: 780 - 792.
- [50] Kantety R V, Zeng X P, Bennetzen J L, Zehr B E. Assessment of genetic diversity in dent and popcorn (*Zea mays* L.) inbred lines using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification [J]. *Mol Breeding*, 1995, 1: 365 - 373.
- [51] Fang D Q, Roose M L, Kruger R R, Federici C T. Fingerprinting trifoliolate orange germ plasm accessions with isozymes, RFLPs, and inter-simple sequence repeat markers [J]. *Theor Appl Genet*, 1997, 95: 211 - 219.
- [52] Fernandes - Matioli F M C, Matioli S R, Almeida - Toledo L F. Species diversity and geographic distribution of *Gymnotus* (Pisces: Gymnotiformes) by nuclear (GGAC) n microsatellite analysis [J]. *Genet Mol Biol*, 2000, 23 (4): 803 - 807.
- [53] Kumar L S, Sawant A S, Gupta V S, Ranjekar P K. Comparative analysis of genetic diversity among Indian populations of *Scirpophaga incertulas* by ISSR - PCR and RAPD - PCR [J]. *Biochem Genet*, 2001, 39: 297 - 309.
- [54] Abbot P. Individual and population variation in invertebrates revealed by inter-simple sequence repeats (ISSRs) [J]. *J Insect Science*, 2001, 1 - 3.
- [55] Hizer S E, Dhar A K, Klimpel K R, Garcia D K. RAPD markers as predictors of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) resistance in shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) [J]. *Genome*, 2002, 45: 1 - 7.
- [56] Perring T M, Cooper A D, Rodriguez R J, Farrar C A, Bellows T S. Identification of a whitefly species by genomic and behavioral studies [J]. *Science*, 1993, 259: 74 - 77.
- [57] Ostberg C O, Rodriguez R J. Novel molecular markers differentiate *Oncorhynchus mykiss* (rainbow trout and steelhead) and the *O. clarki* (cutthroat trout) subspecies [J]. *Molecular Ecology Notes*, 2002, 2: 197 - 202.
- [58] Reddy K D, Nagaraju J, Abraham E G. Genetic characterization of the silkworm *Bombyx mori* by simple sequence repeat (SSR) - anchored PCR [J]. *Heredity*, 1999, 83: 681 - 687.
- [59] Kóstia S, Ruohonen - Lehto M, Väinölä R, Varvio S L. Phylogenetic information in inter - SINE and inter - SSR fingerprints of the *Artiodactyla* and evolution of the Bov - tA SINE [J]. *Heredity*, 2000, 84: 37 - 45.
- [60] D'Ávila J A, Sánchez de la Hoz M P, Loarce Y, Ferrer E. The use of random amplified microsatellite polymorphic DNA and coefficients of parentage to determine genetic relationships in barley [J]. *Genome*, 1998, 41: 477 - 486.
- [61] Huang J C, Sun M. Genetic diversity and relationship of sweetpotato and its wild relatives in *Ipomoea* series *Batatas* (*Convolvulaceae*) as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) and restriction analysis of chloroplast DNA [J]. *Theor Appl Genet*, 2000, 100: 1050 - 1060.

(上接第 92 页)

## 参考文献:

- [1] 徐艳春. 虎微卫星位点多态性及其在圈养种群管理中的应用 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2001.
- [2] Fang D Q, Krueger R R, Roose M L. Phylogenetic relationships among selected citrus germplasm accessions revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers [J]. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 1998, 123: 612 - 617.
- [3] 孟安明, 齐顺章, 宫桂芬. 用四个探针产生的家禽 DNA 指纹图 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 1993, 20 (2): 139 - 142.
- [4] Ratnaparkhe M B, Tekeoglu M, Muehlbauer F J. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphisms are useful for finding markers associated with disease resistance gene clusters [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1998, 97: 515 - 519.
- [5] 白秀娟. 肉鸡肥度性状 DNA 标记的研究 [R]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2000.
- [6] 白秀娟, 李辉. VLDL 双向选择肉鸡群 ISSR 指纹分析研究 [J]. *吉林农业大学学报*, 2001, 23 (1): 80 - 82.
- [7] Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonuclease [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, 76 (10): 5269 - 5273.