

福尔马林固定白鲟(*Psephurus gladius*)标本的DNA提取及其相近种微卫星引物的适用性*

杨钟^{1,2,3}, 朱滨^{1,2}, 常剑波^{1,2**}

(1: 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

(2: 水利部、中国科学院水工程生态研究所, 武汉 430079)

(3: 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 白鲟是世界上最大的淡水鱼之一, 为我国独有, 被誉为“长江中的活化石”。目前白鲟群体已极度濒危, 获取其新鲜材料非常困难, 因此本文以保存于中科院水生所标本馆的福尔马林固定白鲟标本为研究材料, 尝试从其肌肉、心脏、鳍条和肝脏组织提取白鲟基因组 DNA, 并检验相近种匙吻鲟和中华鲟微卫星引物对白鲟有无适用性。实验包括福尔马林固定白鲟标本从组织预处理到消化、抽提等步骤的整体优化过程; 通过一系列对比试验分析在不同条件下提取到基因组 DNA 片段大小的差异, 最终实现了福尔马林固定白鲟标本基因组 DNA 的稳定提取, 并提出后续实验的延伸设想加以完善。

关键词: 白鲟; 福尔马林; 预处理; 微卫星

DNA extraction formalin-fixed tissue of *Psephurus gladius* and the applicability of microsatellite primers developed from its related species

YANG Zhong^{1,2,3}, ZHU Bin^{1,2} & CHANG Jianbo^{1,2}

(1: *Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, P.R.China*)

(2: *Institute of Hydroecology, Ministry of Water Resources & Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430079, P.R.China*)

(3: *Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, P.R.China*)

Abstract: The Chinese paddlefish (*Psephurus gladius*(Martens)) named as “the live fossil in the Yangtze River” is the indigenous species in China, which is the biggest freshwater fish in the world. At present, the Chinese paddlefish has been in imminent danger, so it is extremely difficult to gain its fresh specimens. This research got the formalin-fixed tissues of Chinese paddlefish (11 individuals) as experimental materials from the Institute of hydrobiology, Chinese Academy of Science. We have extracted the genomic DNA from the tissues of muscle, heart, fin and liver by optimizing a series of contrastive experiments, and consummated some researches on molecular ecology by microsatellite molecular markers to realize its genetic characteristics.

Keywords: Chinese paddlefish; formalin; pretreatment; microsatellite

白鲟(*Psephurus gladius*(Martens))隶属鲟形目匙吻鲟科白鲟属, 俗称象鼻鱼、象鱼、琴鱼、剑鱼、鲟钻子等, 古名鮠, 是世界上最大的淡水鱼之一。渔民有“千斤腊子万斤象”的注谚, “腊子”指的是中华鲟, “象”专指白鲟而言。20世纪20年代, 我国生物学家秉志教授在南京记录过1尾长达7m重数千斤的白鲟个体, 迄今为止它仍是世界淡水鱼类身体长度的最高记录。白鲟比较集中的产卵场在四川省江安县附近的长江河段和宜宾柏树溪附近的金沙江河段^[1]。由于生态环境的不断恶化, 白鲟物种已处在极度濒危状态。在1976年以前, 长江全江段白鲟年捕捞量约为25t或676尾^[2], 80年代以来, 资源量已出现大幅度下降, 在葛洲坝截流以后的1981-1993年, 在葛洲坝下江段捕获白鲟114尾, 年平均约9尾。但1991-1993

* 国家自然科学基金项目(30490234)资助。2007-06-08 收稿; 2007-08-22 收修改稿。杨钟, 男, 1982年生, 硕士研究生; E-mail: yangzhong8210@tom.com.

** 通讯作者; E-mail: jbchang@mail.ihe.ac.cn.

年低于3尾,1994年以来,在长江中、下游没有发现,仅在长江上游误捕数尾,根据1999年初步统计,白鲟资源量已不足400尾^[3],而且从1985年以后,全江段未发现过长江白鲟幼鱼的补充群体.白鲟在长江已成为偶见种,濒危状况已不亚于大熊猫.为此国务院环境保护委员会于1983年和1987年两次发布的《重点保护野生动物名录》中将白鲟列为一类重点保护的珍贵稀有动物,1988年被列为国家一级保护动物,1996年被列为IUCN红色目录下的极危物种,并被列入CITES附录II加以保护.至今,白鲟在我国还未有一尾活体标本.

过去对白鲟生态学、形态学、行为学和古生物学等已有了较多的研究^[4-10],但对其遗传学背景却知之甚少,要对其进行分子水平等方面的研究,首先必须获得白鲟基因组DNA.但随着近年来大型水利工程的建设、过渡捕捞以及环境污染等人为因素影响已经致使白鲟这一物种处于极危状态,加上人力物力的不足和时间、地理位置等局限性,使得从野外获取白鲟新鲜样本变得异常困难,因此博物馆和标本馆所保存的大量福尔马林固定标本已经成为开展白鲟遗传背景与系统演化研究的宝贵资源.

福尔马林中含有的甲醛成分能与组织蛋白及DNA等生物大分子迅速交联(Cross-linking),在组织中产生一个稳定、紧密的交联网,从而能很好地保持生物体形态,因此被广泛用于标本的长期保存.福尔马林固定标本中也含有DNA,但通过经典方法从福尔马林长期保存的标本中提取基因组DNA非常困难,所提取的DNA分子片段降解得十分严重,实验结果较差^[11-12].随着DNA多聚酶链合反应(PCR)技术的诞生和发展,使得我们从中提取并直接扩增DNA成为可能.在此基础上运用微卫星分子标记开展白鲟保护的分子生态学研究,在已有生态学、形态学、行为学的基础上进一步了解这一物种的遗传学特征,为其种群恢复和繁盛提供遗传学依据.

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

本实验研究材料为中国科学院水生生物研究所一中心标本馆收集保存的白鲟福尔马林固定标本,根据瓶口和鱼体上的标签显示标本保存时间为1974年8月、1983年7月、1983年8月、1984年7月和1988年7月,采集地点均为上海崇明岛.标本共11尾,其中8尾有标签编号,3尾无标签编号,其中最大个体全长67cm,最小个体全长19cm(表1).另有一尾酒精固定白鲟肌肉组织保存于2002年,取材地点为江苏昆山中华鲟东方养殖研究基地.

表1 白鲟样本的标本编号和原始编号

Tab.1 The specimen number and the primitive serial number of Chinese Paddlefish

标本编号	原始编号	标本编号	原始编号
BX1 号个体	74Ⅷ0027	BX7 号个体	88Ⅶ0003
BX2 号个体	83Ⅶ0002	BX8 号个体	88Ⅶ0004
BX3 号个体	83Ⅶ0031	BX9 号个体	大(全长最长)
BX4 号个体	83Ⅶ0063	BX10 号个体	中(全长中等)
BX5 号个体	88Ⅶ0001	BX11 号个体	小(全长最小)
BX6 号个体	88Ⅶ0002		

1.2 酒精固定白鲟组织的DNA提取

按照试剂盒(申能博彩生物科技有限公司3S Spin Genomic DNA Miniprep Kit V3.0)的使用操作提取酒精固定白鲟肌肉组织.

1.3 福尔马林固定白鲟标本的DNA提取

1.3.1 预处理 组织烘干后用无菌剪刀剪碎,再分两组进行预处理对比: 1)双蒸水或PBS溶液冲洗组织后将组织浸泡于20倍体积高浓度高pH的TE9.0(500mmol/L Tris, 200mmol/L EDTA, 10mmol/L NaCl, pH9.0)中,室温下放置24h, 12h换液一次^[13]; 2)综合改进Fang等^[14]及徐来群等^[15]酒精梯度法: 加入30%酒精处理2h, 重复一次; 加入50%酒精处理2h (混匀), 重复一次; 再用70%酒精处理12-24h; 然后再按80%、90%酒精浓度各处理组织1.5h, 重复一次; 最后用100%无水乙醇处理1h, 重复一次.

1.3.2 组织消化 经预处理后的各组织中加入 600 μ l TE9.0(500mmol/L Tris, 200mmol/L EDTA, 10mmol/L NaCl, pH9.0), 180 μ l 10% SDS(终浓度 3%–5%), 30 μ l 蛋白酶 K(终浓度 6–10mg/ml), 于 55 $^{\circ}$ C 烘箱中消化 60–72h, 前 1–2h 内每隔 5min 取出摇晃混匀以促进消化。

1.3.3 消化液抽提 消化液离心后的上清液分两种盐析法进行抽提对比: 1)采用氯仿–异戊醇和饱和 NaCl 溶液(6mol/L)抽提; 2)直接使用饱和 NaCl 溶液(6mol/L)抽提, 再于摇床过夜沉淀蛋白质。

1.3.4 DNA 沉淀 抽提完毕离心后得到的上清液加入等体积异丙醇(预冷)沉淀 DNA, 冻存于–20 $^{\circ}$ C 过夜。沉淀经 70% 乙醇洗涤、敞口晾干后加入 30 μ l TE8.0 反复冲洗管壁, 于摇床过夜溶解 DNA。

1.3.5 试剂盒法 试剂盒法分2组进行, 第一组: 用酒精梯度法做预处理+试剂盒提取; 第二组: 直接取组织按试剂盒操作提取, 所用试剂盒选用申能博彩生物科技有限公司产品(3S Spin Genomic DNA Miniprep Kit V3.0)。取 BX5、6 号个体的肝脏、肌肉、心脏各 0.15g 左右。第一组经酒精梯度法 30%、50%、75%、90%、100% 后离心弃上清, 沉淀在烘箱内烘干后加入 500 μ l Digestion Buffer; 第二组按照试剂盒说明做简单的预处理: 1)加入 2ml PBS, 室温浸泡 30min; 2)12000 转/min, 室温离心 3min; 3)小心移走上清, 再加入 2ml PBS, 室温浸泡 30min; 4)12000 转/min, 室温离心 2min; 5)小心移走上清, 沉淀用 500 μ l Digestion Buffer 悬浮, 组织匀浆器彻底匀浆。再加入 20 μ l 蛋白酶 K 于两组消化液中, 混匀后 55 $^{\circ}$ C 过夜消化。最后得到的 DNA 用 30 μ l TE8.0 溶解。

1.4 微卫星引物扩增

微卫星位点在种间具有的保守性是其得以广泛应用的原因之一。因此, 利用现有的 DNA 数据库资料 (GENBANK, GDB, EMBL 等) 和已发表的文章, 从已知相近种的微卫星 DNA 的 PCR 引物中筛选是寻找物种微卫星位点的一个有效而简捷的途径。

1.4.1 匙吻鲟微卫星引物 按 Heist 等^[16] 筛选出的引物合成与白鲟同科不同属的匙吻鲟微卫星引物 8 对 (表 2, 引物由奥科生物公司合成)。PCR 反应体系总体积 20 μ l, 包括 Buffer(without Mg²⁺) 2 μ l, Mg²⁺ (终浓度 1.5mM) 1.2 μ l, dNTP (终浓度 200 μ M) 1.6 μ l, 前引物 (5pmol/ μ l) 2 μ l, 后引物 (5pmol/ μ l) 2 μ l, Taq 酶 (5U/ μ l) 0.2 μ l, DNA 模版 3 μ l, ddH₂O 8 μ l。反应条件设置: 首先 94 $^{\circ}$ C 变性 5min; 接着进行 35 次循环, 每次循环包括 94 $^{\circ}$ C 变性 40s, 53–60 $^{\circ}$ C 退火 40s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1min, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min (设阴性对照)。

表2 匙吻鲟8对引物序列及退火温度

Tab.2 The 8 pairs of primer sequences and their synthesis request of *Polyodon spathula*

引物名称	引物序列(5'-----3')	退火温度($^{\circ}$ C)
Psp-12	Psp-12F: ATCTGATACAATCTTCACAGTCC	56
	Psp-12R: GAGTTCCAGCTCGCTCTCC	
Psp-18	Psp-18F: CTATGTGAGGAATGCCACGAC	56
	Psp-18R: TGACATCACCATGACCTATTGG	
Psp-20	Psp-20F: GCATAGTTTTTGGGGGATGGC	60
	Psp-20R: ACAACTGCTTCACCCGATTCC	
Psp-21	Psp-21F: TTCAGCAGGTAGTGAGACAGGCAG	56
	Psp-21R: TCAAGTCCCATCCACTCTTCGC	
Psp-26	Psp-26F: TCGGTGTTTGTGTGTGTGTATGC	56
	Psp-26R: TGGTTCCAGTTTCGCTCATCC	
Psp-28	Psp-28F: CAAAGGCATCCCCTACCAC	56
	Psp-28R: GCTGGACAAAAAGTATGGAGTGC	
Psp-29	Psp-29F: GGGGTCTAATAAAATCCACCGTTC	56
	Psp-29R: TTGCCTTGTGCTCTGTGTTC	
Psp-32	Psp-32F: AATGACTCAGTTGTGTGCTGC	60
	Psp-32R: AAGTGTAGGGGAATCTCACCAG	

1.4.2 中华鲟微卫星引物 采用中华鲟引物 AS-073(F: AGCCCCATCTGCAATACTGT; R: CTGATGGCATATC-ACATGCTT) 进行扩增。反应体系同上, 反应条件: 首先 94 $^{\circ}$ C 变性 5min; 接着进行 35 次循环, 每次循环包括 94 $^{\circ}$ C 变性 40s, 56 $^{\circ}$ C 退火 40s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 50s, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min (设阴性对照)。

2 结果

2.1 酒精固定白鲟组织DNA的鉴定

通过试剂盒提取得到酒精固定白鲟基因组DNA大约21kb左右(图1), 可见在比较新鲜状态下酒精保存的组织基因组DNA比较完整, 很少被降解.

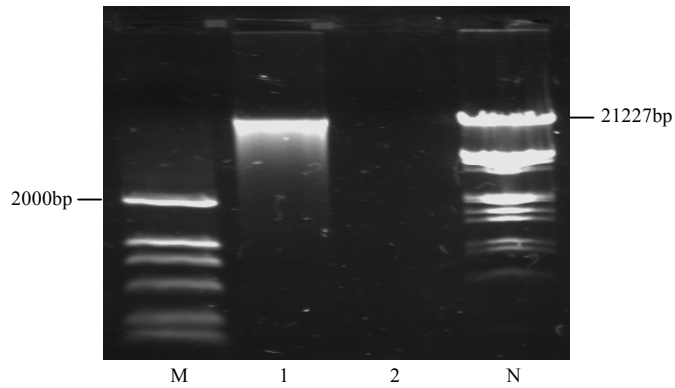


图1 白鲟新鲜组织提取到的基因组DNA

M为DNA分子量标记DL2000; 1为白鲟基因组DNA; 2为空白对照; N为分子量标记
lambdaDNA/*EcoR* I +*Hind*III Marker

Fig.1 Genomic DNA obtained from the fresh tissues of Chinese Paddlefish

Lane M indicates the molecular weight size marker DL2000; 1 indicates the genomic DNA from Chinese Paddlefish; 2 indicates the blank; N indicates the molecular weight size marker lambdaDNA/*EcoR* I +*Hind* III

2.2 福尔马林固定标本 DNA 的鉴定

除组织的预处理外, 一般基因组 DNA 的提取都要经过消化、抽提和沉淀几个步骤. 在福尔马林固定白鲟基因组 DNA 的提取过程中, 反应条件优化和操作步骤等都主要集中在这几个方面展开, 最终经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳后在凝胶成像系统下扫描得到白鲟福尔马林固定组织基因组 DNA 图像(图 2). 除 BX11 号个体暂无可见 DNA 外, 其他 10 尾个体均得到其可见 DNA 条带, 而且都在 600–2000bp 以上.

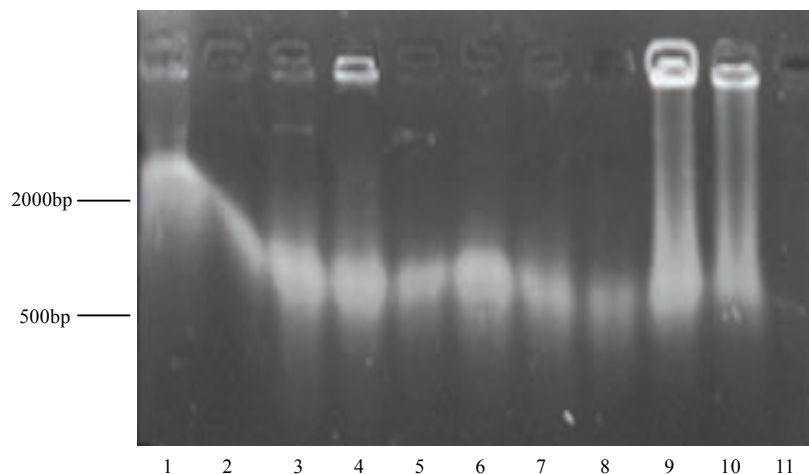


图2 综合优化条件后从11个福尔马林固定白鲟样本的肌肉组织中提取到的基因组DNA

Fig.2 Genomic DNA extracted by optimizing integration conditions from formalin-fixed muscle tissues of Chinese Paddlefish(11 individuals)

预处理的两种方法对标本 DNA 的提取均能起到一定的效果, 实验发现福尔马林固定组织先用双蒸水冲洗后再被浸泡于 TE9.0 中 24 小时(12 小时换液一次), 然后再用改进后的酒精梯度法进行组织处理效果最佳.

通过两种盐析法的比较发现通过氯仿异戊醇+饱和 NaCl 溶液(6mol/L)得到极少可见 DNA 条带, 但直接加入饱和 NaCl 溶液(6mol/L)的方法可以得到明显 DNA 条带, 大约在 500-2000bp 以上(图 3). 基因组 DNA 大都均为弥散带, 只有最后一个个体组织没有得到可见 DNA 条带, 而且证实了在肝脏、肌肉和心脏组织中都能得到 DNA 条带.

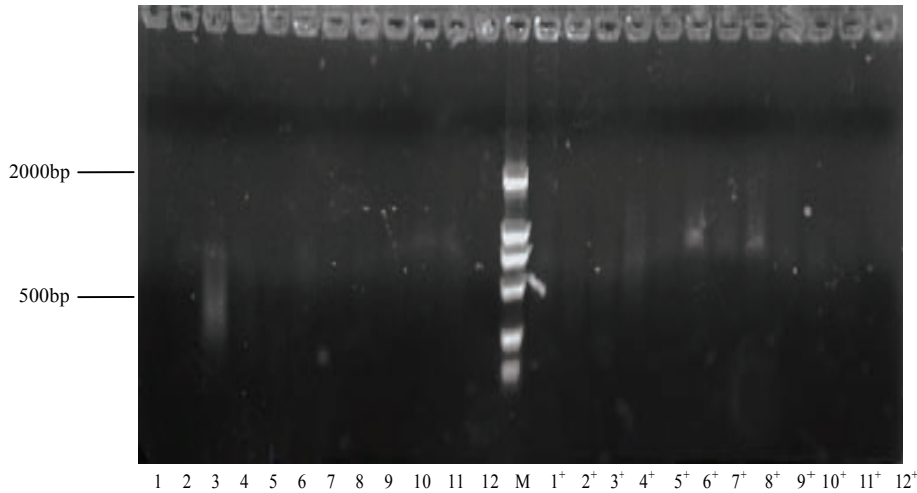


图 3 比较两种盐析法提取基因组 DNA 效果

M 为 DNA 分子量标记 DL2000; 1-12 为不同年代的 4 个个体肝脏、肌肉和心脏三种组织在氯仿异戊醇+饱和 NaCl 溶液(6mol/L)抽提下得到的 DNA; 1⁺-12⁺为前面 12 个组织在饱和 NaCl 溶液(6mol/L)抽提下得到的 DNA

Fig.3 Comparison of genomic DNA extracted from formalin-fixed tissues by two salting-out methods

Lane M indicates the molecular weight size marker DL2000; Lane 1-12 indicate DNA extracted by chloroform-isopentanol + saturated NaCl solution(6mol/L)from liver、 muscle and heart issues of four individuals; Lane 1⁺-12⁺ indicate DNA extracted by saturated NaCl solution(6mol/L)from the same tissues

饱和 NaCl 溶液(6mol/L)盐析法沉淀 DNA 过程中残留的冰冻异丙醇再次离心后其产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳得到的 DNA 条带, 仍可看到清晰的 DNA 图象, 然而通过比较发现离心 3 次后基因组 DNA 就已经相当稀少(图 4).

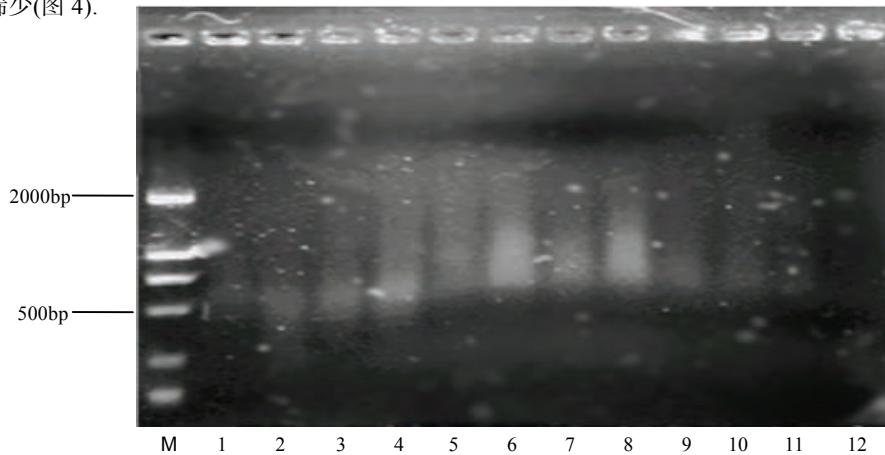


图4 异丙醇再次离心得到的DNA

Fig.4 DNA obtained from re-centrifuging isopropanol

采用试剂盒方法得到的 DNA 较为理想, 提取到的个体及组织之间差异显著, DNA 量少, 效果不稳定, 只有一个样本有 DNA 条带出现, 大小在 500–2000bp 以上(图 5).

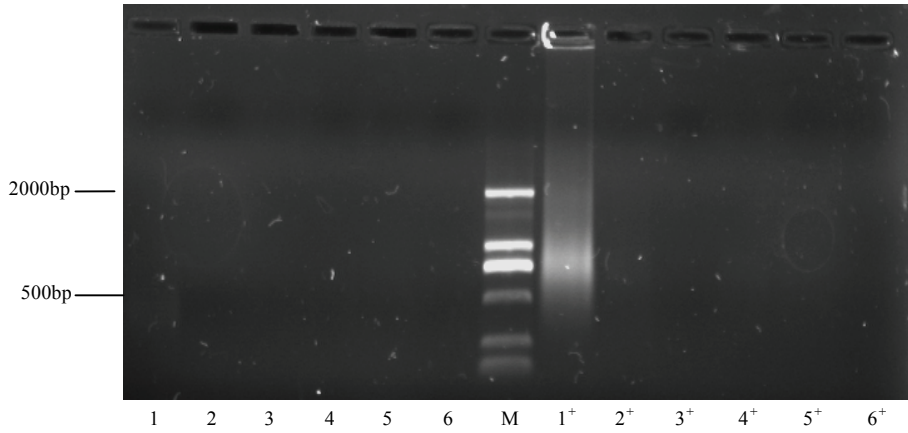


图5 2种试剂盒法提取到的基因组DNA对比

M为DNA分子量标记DL2000; 1–6为酒精梯度法预处理再用试剂盒后提取到的基因组DNA; 1⁺–6⁺为直接用试剂盒处理后提取到的基因组DNA

Fig.5 Comparison of Genomic DNA extracted by two methods of Kit

Lane M indicates the molecular weight size marker DL2000; Lane 1–6 indicate DNA extracted by Alcohol grads pretreatment method and Kit; Lane 1⁺–6⁺ indicate DNA extracted by Kit

2.3 福尔马林固定标本DNA的PCR扩增

匙吻鲟和中华鲟微卫星引物在福尔马林固定组织提取到的DNA模版上难以得到PCR扩增产物, 但以酒精固定白鲟提取的基因组DNA为模版能够得到部分匙吻鲟微卫星引物扩增产物. 八对匙吻鲟微卫星引物对酒精固定白鲟基因组DNA进行扩增, 其中Psp-20(238bp、260bp、270bp)、Psp-26(217bp、238bp、248bp)、Psp-29(210bp)三对引物均能得到明显扩增产物(图6).

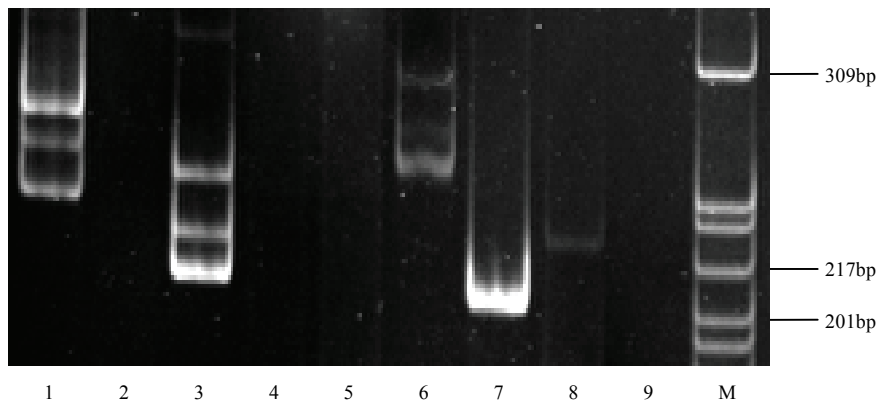


图 6 八对匙吻鲟引物的扩增结果

1–8 为八对引物扩增情况; 9 为阴性对照; M 为 pBR322 DNA/MspI 分子量标记

Fig.6 The amplification results by eight pairs of primers from *Polyodon spathula*

1–8 indicate the amplification results by eight primers; 9 indicates the Negative control; M indicates the molecular weight size marker pBR322 DNA/MspI

3 讨论

3.1 福尔马林固定标本的DNA提取

3.1.1 组织材料的预处理 预处理作为一个优先环节显得尤其重要, 如果组织中残留较多的甲醛会使消化过程中蛋白酶K变性而影响其活性, 为此, 尽可能多的将组织中的福尔马林残留去除, 这样才能更好地进行下一步实验. 简单普遍的是通过双蒸水的冲洗和浸泡使得甲醛生成水合甲醛而被冲洗置换掉. 考虑到这样会导致标本大量吸水而造成对细胞的严重伤害, 因此本研究选用PBS缓冲液代替双蒸水来达到这一效果. 此外运用得最为广泛的是酒精梯度法, 将组织通过由低到高的酒精浓度变化让乙醇逐级与标本中的甲醛反应, 生成半缩醛和缩醛, 并通过酒精的更换将其清除出组织. 本实验在FANG等人基础上改进的梯度法比较理想, 因为首尾跨度大, 而每段之间相差不大, 可在不破坏组织细胞的基础上一步步将甲醛置换去除.

3.1.2 组织的消化 由于甲醛造成大分子相互间的交联, 使得固定标本很难消化. 若能对蛋白酶K的浓度及其他消化条件进行优化调整, 或许可以破坏固定组织中已变性的细胞膜蛋白, 打开DNA与核蛋白之间的连接, 从而使DNA处于自由状态. 肖武汉等^[13]认为固定标本的细胞膜严重变性, 常规浓度的蛋白酶K(200 μ g/ml)和SDS(1%)难以使其破裂, 适当提高蛋白酶K和SDS的浓度, 可能有助于DNA的提取; 陈旧标本中的DNA由于嘧啶和糖基受到修饰以及分子间产生了交联(cross-links), 与新鲜样本中DNA相比, 更易受到一些离子、DNA酶等因素的影响, 适当提高提取液的pH值(9.0), 对DNA可能具有一定的保护作用. 综合上述条件可适当提高消化液TE浓度和pH值(500mmol/L Tris, 200mmol/L EDTA, 10mmol/L NaCl, pH9.0)、蛋白酶K(终浓度6–10mg/ml)和SDS(终浓度3%–5%)的浓度达到优化消化的目的.

选用不同的组织其消化程度各异: 肝脏组织成分复杂, 含有很多难以消化的代谢产物, 故在消化时为很浓的液体, 比较浑浊, 而且肝脏组织里面含有较多降解DNA的核酸酶, 提取的DNA不完整, 作为消化材料并不理想; 鳍条组织和心脏组织所含杂质少, 因而消化也最为彻底, 但二者量少, 并不能广泛使用; 综合来看肌肉组织比较理想, 组织简单容易消化, 加上组织含量多, 因此可选为最佳组织进行DNA的提取.

在DNA的消化过程中各种组织的消化液里都有呈漂浮状态的絮状物存在, 即使延长消化时间也难以将其消化完全, 将其离心后得到的沉淀物再按照优化程序进行基因组DNA的重新提取, 最终仍无可见DNA条带, 本研究认为该物质可能为福尔马林溶液的组成成分与标本组织相互反应所形成, 但其具体成分尚不清楚.

3.1.3 消化液的抽提 由于固定标本中蛋白质与DNA的相互交联, 酚-氯仿抽提可能会在去除蛋白质的过程中顺带造成大量DNA的损失^[17], 本研究的对比实验也证实了这一点: 直接酚-氯仿抽提不能得到可见DNA产物; 两种盐析法的对比中, 加入氯仿—异戊醇的一组得到的DNA比直接饱和NaCl溶液抽提得到的DNA明显减少, 而且效果差异大. 考虑到酚具有高度腐蚀性, 且该抽提方法相对于饱和氯化钠盐析法操作繁琐, 提取时间长, 试剂价格较高, 最终认为直接饱和NaCl盐析法在抽提过程中的效果稳定、明显, 能够得到广泛适用.

3.1.4 DNA的沉淀 实验中普遍使用无水乙醇(冰冻)沉淀DNA, 但DNA微溶于乙醇, 使用乙醇沉淀会使部分DNA溶解损失, 并且由于增加了消化液的体积, 会降低无水乙醇的沉淀效果, 因此本实验选择加入等体积–20 $^{\circ}$ C预冷异丙醇, 但异丙醇较乙醇难挥发, 会加长敞口晾干的时间. 在对异丙醇重离心的过程中仍能得到相当的DNA, 可见一部分DNA溶解于异丙醇中而无法沉淀完全, 因此在实验过程中对异丙醇溶液的多次离心可以减少DNA的损失.

3.1.5 试剂盒法 组织匀浆器的使用在试剂盒法中比较关键, 它可使福尔马林固定组织尽可能地被研磨成浆, 更能容易消化完全. 试剂盒法不需离心, 可以减少这一过程DNA的损失. 通过分开两组实验效果之间的差异可以看出预处理对这种方法实用性不大, 得到的DNA条带差异显著.

3.2 福尔马林固定标本的PCR扩增

分布于亚洲长江中的白鲟和北美洲密西西比河中的匙吻鲟为匙吻鲟科鱼类仅有两属的两种, 在整个鲟形目鱼类中白鲟与匙吻鲟亲缘最为接近, 希冀通过选用匙吻鲟微卫星引物了解白鲟遗传信息.

我国境内的鲟鱼主要分布于长江流域, 中华鲟、白鲟和达氏鲟在长江流域中最为常见. 白鲟和达氏鲟分子遗传学方面的研究很少, 但关于中华鲟的研究在生态学、声纳探测及分子遗传学等方面都已得到

广泛开展, 因此可以探讨白鲟与中华鲟在这相同的栖息环境下遗传水平上有何各自的特点, 两者之间是否有遗传信息的交集, 本实验在选用匙吻鲟微卫星引物的基础上选用中华鲟微卫星引物同样检验对白鲟基因组的适用性, 从而能全面了解两者在分子水平上的相似度。

但在两者的实验过程中难以得到扩增产物, 原因可能有两点: 1) 在标本DNA的提取物中有PCR抑制因子的存在。这些抑制因子是随DNA一起从标本中抽提出来的, 其成分十分复杂, 例如卟啉残基、未知盐离子或金属离子、糖降解产物等。这些抑制子是Taq酶的强力抑制剂, 一般采用稀释法可以降低抑制剂的浓度, 但稀释法也将减少DNA的含量, 同样会导致PCR反应失败。2) 一些实验证明近缘种微卫星DNA引物扩增的成功率并不高, 如铲鲟微卫星引物在鲟属物种中成功扩增的比例比鲟属鱼类微卫星引物在其属内物种间成功扩增的比例小^[18], 即使可直接应用的引物必须是能得到的可清楚分辨的等位基因^[19], 因此, 从近缘种得到能直接应用的引物的机率往往不高。

3.3 实验总结

从实验结果看, 总共10尾福尔马林固定白鲟个体的肌肉组织均能得到其可见DNA条带, 而且都在600–2000bp以上。福尔马林固定云南鲟标本所提取的基因组DNA分子从0.8–1.9kb, 大部分为1kb左右^[13]; 福尔马林固定白暨豚(20世纪80年代)标本基因组DNA分子在200–2000bp之间, DNA降解比较严重^[20], 与本次实验的结果基本一致。

动物死亡后至组织中完全浸透甲醛这一时间的长短可能是决定标本中DNA片段大小的关键因素, 故标本保存时间的长短并不影响DNA分子的大小^[21–22]。本实验11尾个体固定时间不同(1974–1988年), 但所得到的DNA条带并无多大差异, 从而验证了标本保存时间的长短并不影响DNA分子的大小, 而主要与保存液是否被暴露于空气中发生氧化有关^[23]。

DNA的降解程度与标本的保存质量密切相关, 凡是用玻璃瓶装且密封好的标本所提取的DNA较为完整, 一些标本的保存除了玻璃瓶外, 还用石蜡密封瓶口, 这样便不会被氧化而造成DNA的不完整。本实验材料均保存于大玻璃瓶中, 但没有石蜡密封瓶口, 使得福尔马林溶液部分挥发, 瓶子顶端的组织器官都暴露于空气中, 加上福尔马林溶液长久未更新, 因此为提取到白鲟完整基因组DNA加大了难度, 也是导致本实验福尔马林保存白鲟标本所提取基因组DNA电泳检测结果为弥散带的主要原因。

3.4 实验延伸设想

由于相近种鲟鱼的微卫星引物对白鲟适用性并不高, 加上本身DNA片段较小, 导致扩增效果较差, 无法满足实际工作的需要, 所以只能从白鲟本身基因组入手来获得其适合的微卫星引物。通过酒精固定白鲟组织提取完整基因组DNA, 按FIASCO(Fast Isolation by AFLP of Sequences containing repeats)法构建富集微卫星文库^[24]筛选出合适的微卫星引物, 检验扩增效果和忠实度, 建立白鲟微卫星DNA片断富集文库, 筛选多态性微卫星位点进行相近种之间的相互扩增, 可以评价微卫星序列在相似的遗传结构下的表现程度, 并能更为令人信服地阐明白鲟及其相关物种的亲缘关系和进化距离。

3.5 白鲟保护展望

虽然建立了自然保护区, 而白鲟人工繁殖是白鲟物种保护的关键措施之一。由于白鲟过于稀少, 产卵场尚未准确定位, 加上白鲟极易受伤死亡, 至今人们仍未能获得可长期存活的白鲟亲体, 而且, 要想同时获得成熟的双亲更是难上加难。因此, 人工繁殖白鲟是一项长期而艰巨的任务。如果能够突破其人工繁殖, 那么便能实现在长江上游和葛洲坝下游进行增殖放流, 从而恢复白鲟自然种群。

由于目前白鲟数量非常有限, 其后代的繁殖会不可避免的出现近交, 长久下去其遗传多样性可能会由于遗传漂变、近交的作用而丧失, 最终由于难以适应环境而导致灭绝。因此一旦了解现存白鲟繁殖群体的遗传变异水平, 便可以制定科学的管理保护措施, 比如就地、迁地保护和离体保存来保护其遗传多样性。

4 参考文献

- [1] Liu CH, Zeng YJ. Notes on the Chinese Paddlefish, *Psephurus gladius*(Martens). *Copeia*, 1988, 2: 482–484.
- [2] 危起伟, 杨德国. 中国鲟鱼的保护、管理与产业化. *淡水渔业*, 2003, 33(3): 3–7.
- [3] 李安萍. 长江中的鲟鱼及其保护. *太原师范专科学校学报*, 1999, 4: 46–47.

- [4] 姚承昌. 白鲟肝脏和胰脏的组织学与形态学研究. 水生生物学报, 1987, 11(1): 67-72.
- [5] 朱成德, 余林. 长江口白鲟幼鱼的形态、生长及其食性的初步研究. 水生生物学报, 1987, 11(4): 289-298.
- [6] 卢立伍. 辽宁凌源晚侏罗世白鲟化石. 古脊椎动物学报, 1994, 32(2): 134-140.
- [7] 马骏, 邓中彝, 邓昕等. 白鲟年龄鉴定及其生长的初步研究. 水生生物学报, 1996, 20(2): 150-159.
- [8] 李云, 刁晓明, 陈林. 白鲟骨骼系统的补充修正. 西南农业大学学报, 1997, 19(1): 36-40.
- [9] 李云, 刁晓明, 刘建虎. 长江上游白鲟幼鱼形态发育和产卵场的调查研究. 西南农业大学学报, 1997, 19(5): 447-450.
- [10] 邢湘臣. 我国珍稀的中华鲟和白鲟. 生物学通报, 2003, 38(9): 10-11.
- [11] Jackson V. Studies on histone organization in the nucleosome using formaldehyde as a reversible cross-linking agent. *Cell*, 1978, 15: 945-954.
- [12] Koshiba M, Ogawa K, Hamazaki S *et al.* The effect of formalin fixation on DNA and the extraction of high molecular weight DNA from fixed and embedded tissues. *Pathology Research and Practice*, 1993, 189: 66-72.
- [13] 肖武汉, 吴春花, 宿兵等. 福尔马林固定云南鲟的DNA提取及其细胞色素b基因序列分析. 动物学研究, 1997, 18(3): 242, 252, 258, 284.
- [14] Fang SG, Wan QH, Fujihara N. Formalin removal from archival tissue by critical point drying. *Biotechniques*, 2002, 33: 604, 606, 608-610.
- [15] 徐来祥, 张知彬, 宋铭晶等. 福尔马林保存的动物标DNA的提取方法. 动物学报, 2002, 48(2): 264-269.
- [16] Heist E J H, Nicholson E H, Sipiorski J T *et al.* Microsatellite Markers for the Paddlefish (*Polyodon spathula*). *Conservation genetics*, 2002, 3: 205-207.
- [17] Shedlock A M, Haygood M G, Pietsch T W *et al.* Enhanced DNA extraction and PCR amplification of mitochondrial genes from formalin-fixed museum specimens. *Biotechniques*, 1997, 22(3): 394-396, 398, 400.
- [18] 邵昭君, 赵娜, 朱滨等. 铲鲟微卫星引物对中华鲟的适用性研究. 水生生物学报, 2002, 26(6): 577-584.
- [19] Zhu B, Zhou F, Cao H *et al.* Analysis of genetic variation in the Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis*: estimating the contribution of artificially produced larvae in a wild population. *Journal of Applied Ichthyology*, 2002, 18: 301-306.
- [20] 许黎美, 万秋红, 王丁. 福尔马林固定白暨豚标本DNA提取及其遗传多样性的初步研究. 水生生物学报, 2005, 29(3): 272-277.
- [21] Wiegand P, Domhove J, Brinkmann B. DNA degradation in formalin fixed tissues. *Pathologie*, 1996, 17: 451-454.
- [22] Savioz A, Blouin J L, Guidi S *et al.* A method for the extraction of genomic DNA from human brain tissue fixed and stored in formalin for many years. *Acta Neuropathologica*, 1997, 93: 408-413.
- [23] Banerjee S K, Makdisi W F, Weston A P *et al.* Microwave-based DNA extraction from paraff-embedded tissue for PCR amplification. *Biotechniques*, 1995, 18: 768-773.
- [24] Zane L, Bargelloni, Pataenello T. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*, 2002, 11: 1-16.