

# Application of Molecular Scatology in Tree Shrews, *Tupaia belangeri*

Yi Yan<sup>1</sup>, Jinlong Chen<sup>1\*</sup>, Yinzhong He<sup>1</sup>, Juan Wang<sup>2</sup>, Jiahao Fu<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Haikou Forest Farm of Kunming, Kunming Yunnan

<sup>2</sup>The College of Arts and Sciences, Yunnan Normal University, Kunming Yunnan

<sup>3</sup>School of Life Science, Yunnan Normal University, Kunming Yunnan

Email: \*2314302454@qq.com

Received: Aug. 20<sup>th</sup>, 2016; accepted: Sep. 13<sup>th</sup>, 2016; published: Sep. 16<sup>th</sup>, 2016

Copyright © 2016 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## Abstract

Tree shrew (*Tupaia belangeri*) as the small mammals in oriental endemic, mainly in Hengduan Mountains region, has been proved to be close affinity with the primates, and gradually became an experimental animal. But the study of the wild is very little. This paper, based on molecular scatology, expounds the possibility of molecular scatology being employed in the study of *Tupaia belangeri* in wild area in these aspects of molecular marker, sex determination and home range confirmation. It lays a foundation for the further study in *Tupaia belangeri*, making it become the standard experimental animals and an appropriate experimental animal disease model provides a theoretical basis.

## Keywords

Molecular Scatology, Non Invasive Sampling, *Tupaia belangeri*

# 分子粪便学在中缅树鼩中的应用可能性

严毅<sup>1</sup>, 陈金龙<sup>1\*</sup>, 何银忠<sup>1</sup>, 王娟<sup>2</sup>, 付家豪<sup>3</sup>

<sup>1</sup>昆明市海口林场, 云南 昆明

<sup>2</sup>云南师范大学文理学院, 云南 昆明

<sup>3</sup>云南师范大学生命科学学院, 云南 昆明

\*通讯作者。

Email: \*2314302454@qq.com

收稿日期: 2016年8月20日; 录用日期: 2016年9月13日; 发布日期: 2016年9月16日

## 摘要

中缅树鼩(*Tupaia belangeri*)作为东洋界特有的小型哺乳动物, 主要处于横断山脉地区, 其已被证实与灵长目亲缘性较近, 并逐渐在医学上被应用为实验动物, 但是对于其野外的研究甚少。本文以分子粪便学为基础从分子标记、性别鉴定以及巢域确定等方面阐述了其应用在野外中缅树鼩研究中的可能性, 为进一步研究中缅树鼩及其成为标准实验动物与合适的实验动物疾病模型提供了理论依据。

## 关键词

分子粪便学, 非损伤性取样, 中缅树鼩

## 1. 引言

中缅树鼩(*Tupaia belangeri*)属于攀鼩目(Scandentia)树鼩科(Tupaiidae), 是一类分布于南亚和东南亚、东洋界特有的小型哺乳动物, 其主要分布于我国云南、广西、贵州、四川及海南岛等地, 并且我国的云南、四川西南部和贵州很可能是树鼩分布的北限[1]。树鼩由于具与灵长目亲缘性较近, 并且可以感染一些其他实验动物无法感染的疾病, 如抑郁症, 相较于啮齿类试验动物来讲, 树鼩具有很强的社会属性, 特别是雄性具有很强的领地意识。其对应激极度敏感和雄性好斗的特点, 很好地模仿了社会中人类社会竞争失败导致的低自尊心现象, 因此特别适用于应激相关的抑郁症模型建立、机理研究与新药开发, 故其逐渐在医学生物学上成为一种实验化动物。

近年来, 随着国内外对生态环境的越来越多的重视, 生态学已然成为全世界范围内的一项重要学科, 其所包含的环境生态学、景观生态学、种群生态学、分子生态学等分支学科也日益成为研究的热点。而通过分子生态学技术对野外种群进行数量估计以及巢域划分已经成为一项重要的手段。然而由于人类生活的高度发展, 城镇化现象的日益严重, 导致野生动物的种群数量急剧下滑, 对于一些濒危的野生动物和小型难以直接观察并取样的动物而言, 为了更好的保护其遗传多样性以及生态圈的生物多样性, 迫切需要我们对其进行遗传性分析。由于此类动物的特殊性, 传统性的取样方法例如取血液、内脏器官等方法已然不能运用于野外实验操作中, 这时就需要非损伤性取样(Noninvasive sampling)来获得我们所需的实验样本, 这种方法可以做到在对动物的“零伤害”的同时获得其毛发、粪便、尿液等不同形式的样本从中提取 DNA, 从而进行遗传性分析。

## 2. 粪便 DNA 的研究方法

### 2.1. 分子粪便学

其中粪便 DNA 以其易于收集并含有大量遗传信息的特点逐渐在 20 世纪 90 年代初期建立分子粪便学(Molecular scatology)这一学科。其所收集的粪便中包含动物所食用的食物的残渣, 以及食物所经过肠道时所附粘的肠道上皮细胞。现如今, 随着 PCR 技术的日益成熟, 已能从少量的 DNA 片段中扩增出目的片段, 这样就意味着可以通过对粪便提取 DNA 来进行遗传分析的方法可靠, 例如可以通过线粒体 DNA、微卫星以及多位点小卫星标记来对野外动物种群进行遗传性分析。

## 2.2. 粪便的收集

由于粪便于野外采集, 易受到外界环境的影响形成交叉污染, 造成 DNA 降解, 对日后的实验造成很大的影响, 所以采用合适的粪便保存方法对 DNA 提取有重大意义。现如今, 在国内外较为常用的保存方法有低温处理、干燥保存以及乙醇保存, 其目的都是降低核酸内切酶的活性[2]。目前, 较常用的保存方法见表 1 所示。

早在十几年前, 就有学者在澳大利亚研究两种食草动物和 3 种食肉动物的粪便保存中发现干燥保存对于日后的 DNA 提取有着更好的效果[3], 而 Frantzen (1998)和 Murphy (2002)则分别认为乙醇与冷冻干燥更合适[4]。由此可见, 不同的保存方法对于 DNA 活性有着显著的变化, 这可能是由于对于不同的动物, 其食性不同, 因此不同的动物的粪便中包含的多种物质不相同, 造成了对于不同的动物应当采用合适的粪便保存方法。

## 2.3. 粪便 DNA 的提取方法

由于粪便 DNA 的组成成分是由其生产者的肠道上皮细胞 DNA 以及其未消化的食物 DNA 组成, 所以其杂合 DNA 中含有大量的 DNA 抑制剂, 如何除去这些抑制剂关系到 DNA 的提取是否成功。目前国内外报道所示, DNA 的提取方法主要有十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法、酚/氯仿法、异硫氰酸胍裂解法、试剂盒法。传统的 DNA 提取方法又有着这样那样的优缺点, Reed 等[5]利用异硫氰酸胍裂解法对海洋动物的粪便进行了 DNA 提取, 其结果得到了纯化的 DNA。而钟华、赖旭龙等运用酚/氯仿法对大熊猫的粪便 DNA 进行了提取, 也得到了预期的结果[6]。相比于传统的 DNA 提取方法, 试剂盒法具有简便、

**Table 1.** Perseveration methods used in some research (Li Qinyu, 2010)

**表 1.** 常用的粪便 DNA 保存方法(李秦豫, 2010)

保存方法 Perseveration method	保存时间 Perseveration time	研究对象 Study object	研究者 Researcher
1. 冷冻法			
	4 个月	大熊猫( <i>Ailuropda melanleuca</i> )	钟华(2002)
	5 个月	狒狒( <i>Papio cynocephalus ursinus</i> )	Frantzen (1998)
	6 个月	马来熊( <i>Helarctors malayanus</i> )	Wasser (1997)
2. 干燥法			
①冷冻干燥	5 个月	狒狒( <i>Papio cynocephalus ursinus</i> )	Frantzen (1998)
②硅胶干燥	6 个月	马来熊( <i>Helarctors malayanus</i> )	Wasser (1997)
	2~18 个月	黑猩猩( <i>Pan troglodytes verys</i> )	Morin PA (2001)
③SiO <sub>2</sub>	5 个月	黑猩猩( <i>Pan troglodytes verys</i> )	Marchant
④微波干燥	5 个月	猕猴( <i>Macaca sylvanus</i> )	Lathuilliere
⑤烘箱干燥	5 个月	棕熊( <i>Ursus arctos</i> )	Murphy
3. 乙醇保存			
①水乙醇	6 个月	马来熊( <i>Helarctors malayanus</i> )	Wasser (1997)
	24 个月	野生叶猴( <i>Presbytis entellus</i> )	Launhard
	54 个月	短尾猴( <i>Macaca thibetaba</i> )	赵建元(2005)
②70% 乙醇	5 个月	狒狒( <i>Papio cynocephalus ursinus</i> )	Frantzen (1998)

快速、高效的优点,但此类粪便 DNA 提取试剂盒多由外国厂商生产,如德国 Qiagen 生产的试剂盒 QIAamp DNAStool Kit,其价格昂贵,大概一个样 50 元左右,并不适于大量样本 DNA 的提取。

### 3. 粪便 DNA 的研究前景

#### 3.1. 粪便 DNA 中的遗传标记

##### 3.1.1. 线粒体 DNA(mtDNA)

线粒体 DNA 作为共价闭合 DNA,存在于细胞质中,而在受精过程中仅精子的细胞核与卵子融合,产生的合子从卵子的细胞质中得到线粒体及 mtDNA,系母系遗传(maternal inheritance)。其基因组都位于一个单一的环状 DNA 分子上,缺乏那么多的非编码区域(内含子),没有重复序列,因此这些特点使 mtDNA 在分子遗传学上占有重要角色。而相较于核 DNA,线粒体 DNA 更容易提取扩增出来。早在 1994 年,Avise JC 等(1994)就指出几乎没有任何一种分子途径能比拟 mtDNA [7]。

##### 3.1.2. 微卫星标记(microsatellite)

微卫星标记(microsatellite),又称为短串联重复序列(short tandem repeats, STRs)或简单重复序列(simple sequence repeats),是均匀分布于真核生物基因组中的简单重复序列,由 2~6 个核苷酸的串联重复片段构成,由于重复单位的重复次数在同一物种中的不同基因型间存在很大的差异,于是这一技术很快发展成为一种分子标记[8]。

##### 3.1.3. 多位点小卫星

动物 DNA 基因组中存在着高变区(HVR),因此具有高度遗传性,通过以 DNA 的多态性为基础,可以产生具有高度个体特异性的 DNA 指纹图谱,由于其具有高度的变异性和稳定的遗传性,且仍按简单的孟德尔方式遗传,并兼有高度特异性、稳定的遗传性和体细胞稳定性使成为目前最具吸引力的遗传标记。方胜国等人利用 DNA 指纹技术对大熊猫进行了种群数量调查、遗传多样性方面的研究[8] [9]。

##### 3.1.4. 性别鉴定

由于野外实验条件随机性较大,用传统方法对于某一物种的某个种群进行性别鉴定的可靠性较低,就中缅树鼯而言,其体型小、难观测,不易捕捉的特点,使其某一种群中雄雌比例不清楚,于是可以通过对粪便 DNA 的提取筛选出 SRY 基因,借助 Y 染色体上的特异位点进行性别鉴定。早前英国学者 Sinclair 等人(1990)通过研究发现,哺乳动物的 Y 染色体上有一段 35 kb 区域具有性别决定的作用(Sex Determining Region of the Y),也就是 SRY 基因[10]。其操作是通过相应的引物从 DNA 中筛选出 SRY 基因,进行 PCR 扩增,从而对研究种群的性别比例进行鉴定。依靠这种方法,王加连等(2005)成功从鲸肌肉组织 DNA 提取出 SRY 基因,并对性别未知个体进行了性别鉴定[11]。由此可见,利用分子学技术来鉴定动物性别依然成为研究热点。

#### 3.2. 种群数量估计

对于某一地区中缅树鼯种群数量的估计,并不能做到对所有个体进行识别,因此可以通过这个地区收集到的粪便中的分子标记进行遗传分析,进行个体识别,从而得到其种群数量大小。Reed 在 1997 年用分子标记技术成功的从 82 个海豹粪便中得到了 67 个个体的粪便[12]。

#### 3.3. 亲缘关系鉴定

对于野生濒危动物而言,为了保护其遗传多样性,生物多样性,常通过提取其粪便 DNA 中的线粒体片段控制区,确定与其亲缘关系相近的物种,从而引种来恢复其种群数量。Kohn (1995)通过扩增并测定

粪便线粒体 DNA 控制区的基因片段, 确定了欧州棕熊各种群之间的亲缘关系, 并建议从与 *Brcnta* 亲缘关系最近的 Slovenia 引种来恢复 Brenta 地区的棕熊种群[13]。

### 3.4. 食性分析

相比于粪便镜鉴分析法而言, 通过粪便 DNA 中特异序列的提取, 并设计相应的引物进行 PCR 扩增, 可清楚判断野生动物在野外的食性情况, 这对于研究那些无法直接观察到其取食行为的动物来言, 进行分子粪便学分析可能是研究动物食性的唯一途径[14]。

### 3.5. 巢域范围

可以通过对中缅树鼩粪便中的线粒体 DNA 进行分析, 并结合地理信息系统(GIS)对野外动物种群进行确定, 确定种群间的杂交带及其巢域分布, 这对于研究中缅树鼩这种小型不能使用无线电跟踪的动物是一个有效的替代方法。

## 4. 问题与展望

通过研究发现, 不同的粪便保存方法与粪便 DNA 提取方法对 DNA 的提取量影响较大, 而同一粪便保存方法与粪便 DNA 提取方法在不同的动物间也不尽然适用, 这可能是由于不同的粪便 DNA 的保存与提取在不同动物间存在物种差异性。其原因应当归结于动物的食性差异, 食草动物、食肉动物与杂食性动物因所食用的食物不同, 所以所含的 DNA 抑制剂不同, 导致粪便 DNA 的保存方法与提取方法出现差异。除此之外, 在保存过程中难免会受到辐射、氧化、去氧基和脱嘌呤等物理, 化学作用, 这些因素进一步加大了提取和扩增的难度[15]。而中缅树鼩作为一种分布在东洋界特有的小型哺乳动物, 其在野外的食物来源主要由植物果实及昆虫组成, 并且食性为杂食性的特点使得中缅树鼩粪便 DNA 的保存方法及提取方法的择取存在一定难度。但如若粪便样本新鲜, 保存方法得当, 采用分子粪便学方法对野生中缅树鼩进行非损伤性取样分析具有可行性, 这对动物保护方面来讲也具有积极影响。

## 参考文献 (References)

- [1] 王应祥, 李崇云, 马世来. 树鼩的分类与生态. 树鼩生物学[M]. 昆明: 云南科技出版社, 1991: 21-70.
- [2] Frantzen, M.A.J., Silk, J.B., Ferguson, J.W.H., *et al.* (1998) Empirical Evaluation of Preservation Methods for Faecal DNA. *Molecular Ecology*, **7**, 1423-1428. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-294x.1998.00449.x>
- [3] Piggott, M.P. and Taylor, A.C. (2003) Extensive Evaluation of Faecal Preservation and DNA Extraction Methods in Australian Native and Introduced Species. *Australian Journal of Zoology*, **51**, 341-355. <http://dx.doi.org/10.1071/ZO03012>
- [4] Flagstad, R.K., Stacy, J.E., *et al.* (1999) Reliable Noninvasive Genotyping Based on Excremental PCR of Nuclear DNA Purified with a Magnetic Bead Protocol. *Molecular Ecology*, **8**, 879-883. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-294X.1999.00623.x>
- [5] Reed, J.Z., Tollit, D.J., Thompson, P.M. and Amos, W. (1997) Molecular Scatology: The Use of Molecular Genetic Analysis to Assign Species, Sex and Individual Identity to Seal Faeces. *Molecular Ecology*, **6**, 225-234. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-294X.1997.00175.x>
- [6] 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[J]. 四川动物, 2003(49): 670-674.
- [7] Avise, J.C., Nesson, W.S. and Sibley, C.G. (1994) DNA Sequence Support for Class Phylogenetic Relationships between Some Storks and New World Vultures. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, **91**, 5173-5177. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.91.11.5173>
- [8] Nakamura, Y., *et al.* (1987) Variable Number of Tandem Repeat (VNTR) Markers for Human Gene Mapping. *Science*, **235**, 1616-1622. <http://dx.doi.org/10.1126/science.3029872>
- [9] 方盛国, 陈冠群, 冯文和, 张安居, 李绍昌, 何光听, 魏辅文, 郭键. 大熊猫 DNA 指纹在野生种群数量调查中的应用[J]. 兽类学报, 1996(4): 246-249.

- [10] 方盛国, 冯文和, 张安居, 余健秋, 李学兵, 黄祥明, 费立松, 陈红卫, 张志和, 张坚, 雍严格. 佛坪三官庙地区大熊猫种群数量的 DNA 指纹分析[J]. 四川大学学报, 1997, 34(专辑): 104-107.
- [11] Sinclair, A.H., *et al.* (1990) A Gene from the Human Sex-Determining Region Encodes a Protein with Homology to a Conserved DNA-Binding Motif. *Nature*, **346**, 240-245. <http://dx.doi.org/10.1038/346240a0>
- [12] 王加连, 杨光, 周开亚, 魏辅文, 严洁. PCR 扩增 Sry 基因进行鲸类动物性别的鉴定[J]. 兽类学报, 2005, 25(1): 20-23.
- [13] Reed, J.Z., Tollit, D.J., Thompson, P.M., *et al.* (1997) Molecular Scatology: The Use of Molecular Genetic Analysis to Assign Species, Sex and Individual Identity to Seal Faeces. *Molecular Ecology*, **6**, 225-234. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-294X.1997.00175.x>
- [14] Kohn, M., Knauer, F., Stoffella, A., Schröder, W. and Pääbo, S. (1995) Conservation Genetics of the European Brown Bear—A Study Using Excremental PCR of Nuclear and Mitochondrial Sequences. *Molecular Ecology*, **4**, 95-103. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-294X.1995.tb00196.x>
- [15] Kohn, M.H. and Wayne, R.K. (1997) Facts from Feces Revisited. *Trends in Ecology & Evolution*, **12**, 223-227. [http://dx.doi.org/10.1016/S0169-5347\(97\)01050-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0169-5347(97)01050-1)

**期刊投稿者将享受如下服务:**

1. 投稿前咨询服务 (QQ、微信、邮箱皆可)
2. 为您匹配最合适的期刊
3. 24 小时以内解答您的所有疑问
4. 友好的在线投稿界面
5. 专业的同行评审
6. 知网检索
7. 全网络覆盖式推广您的研究

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>