

基于微卫星技术的东北马鹿粪便样品的个体识别

刘艳华, 郑平平, 霍继尧, 黄玉兰, 王嘉霖, 李家贺

(东北林业大学野生动物与自然保护地学院, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要: 本研究采用QIA-GEN公司生产的粪便DNA提取试剂盒(QIAamp DNA Stool Mini Kit)进行马鹿粪便样品的提取, 检测27对马鹿近缘种鹿科动物微卫星座位的多态性分布, 评估其遗传多样性, 并探讨其用于个体识别的可行性。结果表明: 11个微卫星位点的平均杂合度在0.513-0.715之间变动, 基因杂合度最小位点是T507, 基因杂合度最大的位点有2个, 分别是BM848和T530, 平均为0.614。多态性信息含量值(PIC)在0.264-0.764之间变动, 最小的为BM848, 最大的是T501, 平均值为0.595, 其中CSSM19、T123、T156、N、BM203、OCAM、T507、T530、T501和C143平均PIC在0.5以上, 为高度多态位点; BM848位点的PIC值在0.25~0.5之间, 为中度多态位点。11个位点无偏随机识别概率P(ID)为 1.408×10^3 , 累计个体鉴别力为99.99%。因此, 这11个位点完全能够满足马鹿个体识别分析的要求。

关键词: 个体识别; 马鹿; 粪便; 微卫星

中图分类号: Q953

文献标识码: A

文章编号: 2096-2177(2025)01-128-09

在分子生态学的研究中, 对珍稀濒危动物的取样不能采用传统的取样方式, 即通过逮捕动物获得动物的血液、毛发、羽毛等分析样品, 更不能为了获得新鲜的组织样品而采取杀害濒危动物的行为, 为了更好地对珍稀濒危野生动物的研究, 本文采用新的取样方式——非损伤性取样(Noninvasive sampling)。不直接或间接接触动物, 在没有对动物造成危害的前提下, 通过人工收集动物掉落的毛发或羽毛, 排出的尿液、粪便, 以及脱落的角, 利用PCR技术, 将收集到的样本DNA进行扩增, 对获得的结果进行生物个体遗传信息的分析。在所有非损伤性采样中, 粪便是最简单而且对野生动物影响最小的一种取样方法, 并且粪便中含有大量活的肠道脱落粘膜细胞能够满足遗传学研究等特点, 现已成为许多研究者倍受青睐的研究材料, 从而使粪便DNA分析技术在守护与管控那些隐蔽性突出、濒危程度高的物种时, 有着不容小觑的潜在应用价值。

以粪便为研究材料对野生动物进行种群遗传信息研究时, 在确保粪便样品来源的前提下, 这些样品是否属于同一个个体是十分重要的。对于一个种群来说, 单倍型数量随着样品量的增加而增加,

如果在—组样品中存在多份同一个体的样品, 那么这个种群的单倍型数量增加的同时将使单倍型多样性随之增加, 这将影响到对整个种群遗传结构的评估。同时, 采用非损伤性方法收集的样品经常面临着DNA降解的问题, 这样将使PCR扩增出的片段较短; 而利用PCR扩增获得的微卫星DNA多态片断大多为十几个或几十个bp, 对模板DNA的要求相对较低。目前, 在分子遗传学领域所出现的众多分子标记中, 微卫星因其多态性丰富、稳定性和重复性均较好^[1-2], 且在个体间呈现高度的多态性并符合孟德尔遗传; 加之结合荧光标记PCR分析技术, 操作简单、数据准确可靠等特点, 使其在个体识别中得到研究者们广泛的应用^[3]。为了确定样品数量, 本试验将多态性高的微卫星引物筛选出来, 利用荧光标记技术对获取的马鹿粪便样品进行基因分析进行个体识别。

1 材料与方法

1.1 样品采集和DNA提取

东北马鹿因为个体较大, 并且警惕性较高, 不能采用传统的取样方式, 以免对马鹿造成伤害, 所以采取非损伤性取样方法进行本次试验, 采集其粪

收稿日期: 2024-12-13

基金项目: 世界自然基金会项目(10000766); 东北林业大学校级大学生创新训练项目资助(202410225584)

作者简介: 刘艳华(1977-), 女, 汉族, 内蒙古赤峰人, 高级工程师, 博士研究生, 研究方向: 野生动物保护。

便作为试验材料。落雪后在东北马鹿经常出现的区域内，进行随机布设样线，对马鹿的足迹走向进行跟踪，收集沿路的马鹿粪便。在粪便样品采集地点进行GPS定位，记录足迹链数量、粪便新鲜程度、卧迹数量、尿液位置以及周围的生境类型等。在人工采集粪便样品时，应当佩戴一次性手套，避免对采集的粪便样品造成污染。在采集样品后，对样品进行封袋处理，避免因摩擦或其他原因对样本造成损害，保证DNA的完整性。采集样品后，对样品进行编号处理，并记录好每一份样品采集的地点、方位以及采集时间和生境食物组成。采集后的样品进行封装后第一时间放入 -20°C 的保温箱中进行冷冻保存。待采集过程结束后，返回实验室，将样品立刻从保温箱转移到 -20°C 以下冰箱内进行保存，为了避免混染，确保采集样品和冰箱内的其他样品分开存放。

本研究采用试剂盒（QIAamp DNA Stool Mini

Kit）进行粪便DNA提取。为了提高DNA的获取量，在提取前进行如下预处理：将冰块放到一次性手套上，用镊子夹取少量粪便样本放置到冰上，时刻观察粪便样本变化，若出现融化，用解剖刀刮取样本外皮表面的粘膜，并将其放入置于冰上的2 mL离心管中。在试验过程中，注意以下几点：（1）每次更换粪便样品时，使用新的一次性手套和解剖刀以及镊子；（2）冷冻样品用解剖刀刮下外皮粘膜放入管中均在冰块上进行，以免解冻；（3）其他步骤均可在室温下进行。

1.2 微卫星引物的筛选

本研究在马鹿微卫星位点筛选时，首先从已发表的文献中选取27对马鹿近缘种鹿科动物微卫星引物^[4-7]（见表1），对于粪便样品提出的DNA检测，是通过2只马鹿肌肉样品（来源于狩猎者）提取出的DNA进行试验取成功扩增的位点进行的，实验最终选取具有多态性的引物，进行马鹿的个体识别。

表 1 微卫星引物序列

Tab. 1 Microsatellite primer sequences

Locus	Forward primer sequence (5' ~3')	Reverse primer sequence (5' ~3')
T107	ACATCCGTTTCAGGTGTGA	CCAGAGGTAAGATAAATGGTGA
T115	AATGTCTGACTCTAGGTGAGTG	TTTGTATCTGAGCCACTAG
T123	GTTTCCTTGGCACATCTCT	CTGTCGTTGTTGTCTGTTG
T156	TCTTCTGACCTGTGTCTTG	GATGAATACCCAGTCTTGCTCTG
T172	AGCATCTCCCTTTCAACA	CTTCCCAACCCAAGTATCG
T193	AGTCCAAGCTGCTAAATAA	CTGCTGTTGTCATCATTACC
T268	ATTCCCTTCTCCAGTGATG	GATGATAACAGCTCAACAGATC
T108	CATGTGGAGATAGGTAGACAGA	CCATTCTGAGTAGCTGATTCA
T26	GTTCCAATAGACACGCTCAT	TGCCATAGTTTTTCTACCTT
T501	CTCCTCATTATTACCCTGTGAA	ACATGCTTTGACCAAGACC
T507	AGGCAGATGCTTCACCATC	TGTGGAGCACCTCACACAT
T530	GTCCTCACAGCAGCTCTATG	GCAATCTTTAGAACTCCAACTG
C01	TGAGGGTGTGAGATGGGA	GGAGAGAGACCTGGGAGAAA
C143	AAGGAGTCTTTCAGTTTTGAGA	GGTTCTGTCTTTGCTTGTTG
C180	GGTGGGCATTCAGTAGA	AGGCAGAGAAGGCATTG
C229	CCCTGTGGTCTAGCAAA	ATAGGCACATGCTCATAAG
C273	AGGGAAACCTCTGTTCAGGA	ACCAAGCAAAATGCCTTACA
C217	GCAGGAAGGAGGAGACAGTA	GCTGGTTCGTTATCATTAGC
IOBT965	GGGGTTGTGGGTAAGCGGAGTT	GATCTAGCGCCAGACAGACGTGTCAT
CSSM16	AGAGCCACTTGTTACACCCCAAAG	GATGCAGTCTCCACTTGATTCAA
MM12	CAAGACAGGTGTTTCAATCT	ATCGACTCTGGGGATGATGT
CSSM22	TCTCTCTAATGGAGTTGGTTTTTG	ATATCCCACTGAGGATAAGAATTC
CSSM19	TTGTCAGCAACTTCTTGTAICTTT	TGTTTTAAGCCACCCAATTATTG
N	TCCAGAGAAGCAACCAATAG	GTGTGCCTTAAACAACCTGT
BM203	GGGTGTGACATTTTGTTC	CTGCTCGCCACTAGTCCTTC
BM848	TGGTTGGAAGGAAAACCTGG	CCTCTGCTCCTCAAGACAC
OCAM	CCTGACTATAATGTACAGATCCCTC	GCAGAATGACTAGGAAGGATGGCA

1.3 微卫星引物分型

为进一步提升等位基因判定的精准度,本研究审慎筛选,仅选用了PCR产物条带清晰无杂带,一般进行2次以上PCR反应的稳定PCR引物进行分型测定。将扩增产物按照扩增片段的变化范围及荧光标记不同,对研究中的11个位点混合成3组进行基因分型(见表2)。由于第一组的位点CSSM19和BM848基因大小相差很大,第二组的位点N和T507等位基因大小相差很大;故将第一组的位点CSSM19和BM848标记同一颜色TAMARA,第二组的位点N和T507标记同一颜色FAM。本研究构建的PCR反应体系具体成分如下:选用宝生物(大连)有限公司出品的Hotstar Taq DNA polymerase(酶活性为 $5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$),取用 $0.3 \mu\text{L}$; dNTPs(浓度达 2.5 mM),用量为 $5 \mu\text{L}$;牛血清白蛋白BSA(浓度 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$),量取 $5 \mu\text{L}$; $10 \times$ Buffer,加入 $5 \mu\text{L}$;另

外,2种引物L-Pro、H-Phe(浓度均为 20 mM)各取 $0.5 \mu\text{L}$;再加入DNA模板 100 ng ,最后用灭菌的超纯水补足体系,使其总体积达 $50 \mu\text{L}$ 。

相应的PCR反应条件设定为:先在 $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 环境下进行 10 min 预变性处理,目的在于让双链DNA解链,为后续循环反应做准备;接着进入循环阶段,每个循环里, $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 30 s ,促使DNA双链解开;退火温度控制在 $54 \sim 57 \text{ }^\circ\text{C}$,时长 40 s ,利于引物与模板精准配对结合; $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 60 s ,以便Taq酶以引物为起始点,沿模板链合成新生DNA链;如此循环往复,共计40个循环;完成循环后, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 再延伸 10 min ,保证产物完整合成;反应结束后,于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 低温保存,维持产物稳定性。待扩增产物完成混合后,采用ABI 3730基因分析仪,搭配6%的PAGE胶电泳技术予以分离后进行基因分型。采用ILS-600作为分子量内标。

表2 11对微卫星引物序列

Tab.2 Primer sequences of 11 microsatellite

Group	Loci	Primer	Fluorescent label and primer sequence	Allele length (bp)	Tm ($^\circ\text{C}$)
1	CSSM19	CSSM19-F	TAMARA -5' -ttgtcagcaactctgtatcttt-3'	133-169	56
		CSSM19-R	5' -tgtttaagccaaccaattatttg-3'		
	BM848	BM848-F	TAMARA -5' -tggttgaaggaaacttg-3'	351-363	56
		BM848-R	5' -cctctgctcctcaagacac-3'		
	T123	T123-F	FAM -5' -gtttccttgccacatctct-3'	150-174	55
T123-R		5' -ctgtcgttgtgttctctgtt-3'			
T156	T156-F	HEX -5' -tctcctgacctgtgtctt-3'	145-197	57	
	T156-R	5' -gatgaatacccagctctgtct-3'			
2	N	N-F	FAM -5' -tccagagaagcaaccaatag-3'	281-289	56
		N-R	5' -gtgtgccttaacaacctgt-3'		
	BM203	BM203-F	TAMARA -5' -gggtgtgacattttgttccc-3'	218-242	56
		BM203-R	5' -ctgctgccactagctctc-3'		
	OCAM	OCAM-F	HEX -5' -cctgactataatgtacagatccctc-3'	183-197	56
OCAM-R		5' -gcagaatgactagggaaggatggca-3'			
T507	T507-F	FAM -5' -aggcagatgcttcaccatc-3'	146-184	57	
	T507-R	5' -tgttgagcaccctcacacat-3'			
3	T530	T530-F	TAMARA -5' -gtcctcacagcagctctatg-3'	254-296	56
		T530-R	5' -gcattcttagaactcaactg-3'		
	T501	T501-F	HEX -5' -ctctcattattaccctgtgaa-3'	240-264	55
		T501-R	5' -acatgctttgaccaagacc-3'		
	C143	C143-F	FAM -5' -aaggagtcttctcagtttgaga-3'	159-167	54
	C143-R	5' -ggttctgtcttctgtt-3'			

1.4 数据分析

PCR在ABI3130测序仪上分型分析,而基因分型的标准为:粪便DNA重复扩增3次后,仅出现1个等位基因的,认为是纯合位点;总是出现2个不同的等位基因时判定为杂合位点。重复扩增3次后,若只能判定出1个等位基因确实存在时(即每次扩增都能得到这个等位基因,但是另一个等位基因不是每次都出现时),则再增加1次扩增之后根据待

确定的那个等位基因出现的频次来判定,若待确定的等位基因出现2次以上则判定为杂合子;若待确定的等位基因只出现1次则判定为纯合子^[8]。利用软件Excel Microsatellite Tool kit^[9],寻找数据中相匹配的基因型。把所有位点上的基因型都相同或者只有一个位点上的一个等位基因存在差异的判为同一个个体^[10]。对于所有位点的个体识别概率 P_{ID} 用GIMLET1.3.3进行计算^[11]。

在遗传学研究领域，精准判定各个微卫星位点是否契合Hardy-Weinberg平衡状态，是确保种群遗传结构与进化动态的关键步骤。为此，本研究借助专业的群体遗传学分析软件GENEPOP（具体版本为3.4）开展系统计算。同时计算等位基因数（*A*）、期望杂合度（*He*）观察杂合度（*Ho*）和多态信息含量（*PI*C）、有效等位基因数（*Ne*）。

2 结果

2.1 微卫星引物的初步筛选

27对微卫星引物针对马鹿肌肉样品中的DNA所开展扩增实验，结果显示：有10对引物（T107、T115、T268、T108、T26、C273、C217、CSSM16、MM12、CSSM22）没有扩增产物，有17对（T123、T156、T172、T193、T501、T507、T530、C01、C143、C180、C229、IOBT965、CSSM19、N、BM203、BM848、OCAM）引物能够成功扩增，扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图（见图1）。

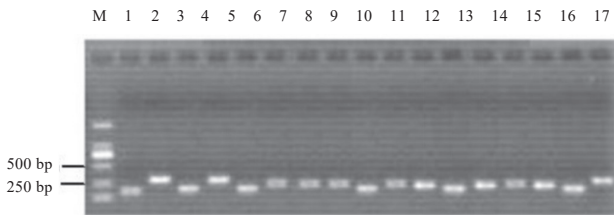


图1 微卫星引物扩增结果

Fig.1 Amplification results of 17 microsatellite primers

- 1.T123 2.T156 3.T172 4.T193 5.T501
- 6.T507 7.T530 8.C01 9.C143 10.C180 11.C229
- 12.IOBT965 13.CSSM19 14.N 15.BM203
- 16.BM848 17.OCAM

2.2 多态性高的微卫星引物筛选

17对微卫星引物针对马鹿粪便样品里的DNA所开展的扩增实验，结果显示：有6对引物（T172、T193、C01、C180、C229、IOBT965）没有扩增产物，有11对引物能够成功扩增。通过精心开展PCR反应条件的优化实验，最终收获了令人满意的结果——得到了清晰且有效的微卫星谱带。图2、3分别为位点CSSM19和BM848的扩增结果部分片断。

2.3 微卫星引物的荧光标记

凝胶图片上各位点等位基因的片段大小使用Quantity One软件计算。为了使试验结果更加准确，

避免在进行聚丙烯酰胺凝胶电泳检测微卫星基因型时，因为操作步骤繁琐，而对试验结果造成影响，并且该软件对于读取基因型准确性较低。所以对所有样品使用引物荧光标记全自动检测技术进一步分析。采用荧光标记的T15611和CSSM19微卫星引物毛细管电泳图（见图4、5）。

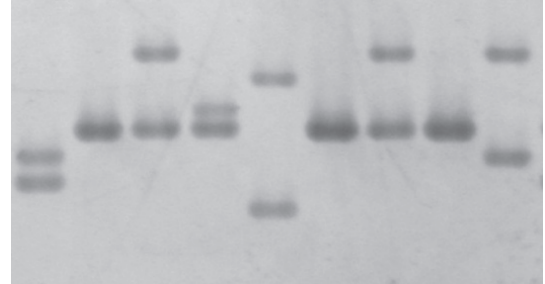


图2 引物CSSM19扩增结果

Fig.2 Amplification results of CSSM19

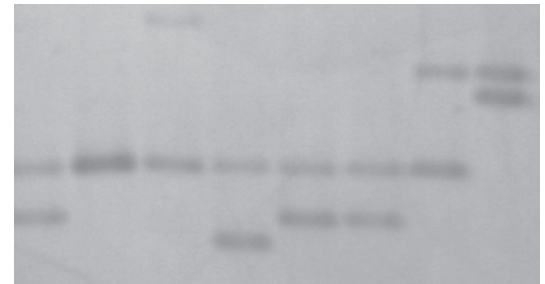


图3 引物BM848扩增结果

Fig.3 Amplification results of BM848

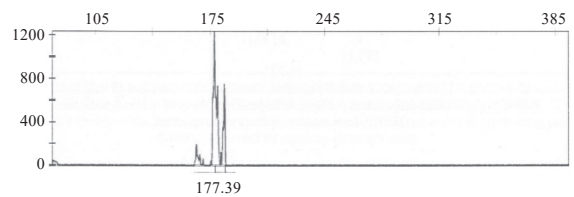


图4 位点T156电泳图

Fig.4 PCR product of locus T156 isolated by capillary electrophoresis

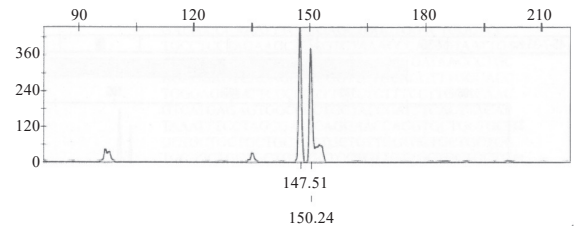


图5 位点CSSM19电泳图

Fig.5 PCR product of locus CSSM19 isolated by capillary electrophoresis

2.4 微卫星位点遗传多样性和个体识别

在对马鹿种群展开的微卫星位点研究中发现,

其中11个微卫星位点呈现出了不同程度的多态性特征,各位点等位基因的频率详情可参照表3。

表3 11个微卫星位点遗传信息

Tab.3 The genetic information of eleven microsatellite loci in red deer populations

Loci	A	Ne	Ho	He	P-val	Fis	PIC	PID	Psib
CSSM19	10	3.502	0.534	0.624	0.121 4	0.094 5	0.517	0.068	0.370
BM848	8	4.765	0.715	0.614	0.310 4	0.124 7	0.264	0.064	0.366
T123	9	4.315	0.624	0.718	0.045 9*	0.034 7	0.519	0.070	0.458
T156	9	2.648	0.584	0.761	0.265 7	0.026 4	0.617	0.081	0.324
N	7	3.781	0.617	0.617	0.125 7	-0.006 4	0.607	0.076	0.509
BM203	10	5.624	0.614	0.815	0.001 4**	0.324 7	0.716	0.109	0.501
OCAM	5	4.915	0.654	0.864	0.003 1**	0.041 6	0.518	0.094	0.451
T507	6	5.459	0.513	0.614	0.083 1	0.046 1	0.614	0.261	0.376
T530	7	3.647	0.715	0.715	0.000 7**	0.051 7	0.719	0.101	0.423
T501	5	4.516	0.614	0.815	0.096 7	-0.301 4	0.764	0.074	0.491
C143	12	4.158	0.571	0.764	0.071 5	0.235 4	0.694	0.096	0.402
Mean	8	4.385	0.614	0.720	0.129 7	0.089 4	0.595	--	--

A: Number of alleles. Ne: effective number of alleles. Ho: Apparent heterozygosity. He: Expected heterozygosity. P-val: Site of Hardy-Weinberg balance test probability value. Fis: Inbreeding coefficient in groups. PIC: Polymorphism information content. PID: No related idotype similar probability. Psib: The twins are similar genotype probability.** $P < 0.01$. * $0.05 > P > 0.01$ 。

通过对表3的细致分析能够清晰看出,这11个微卫星位点的平均杂合度处于0.513~0.715这一区间变动。具体而言,位点BM848和T530展现出了最大的基因杂合度,而位点T507的基因杂合度则是最小的,整体平均杂合度为0.614。

再来看多态性信息含量值(PIC)方面,其数值范围介于0.264~0.764,其中T501位点对应的PIC值最大,BM848位点的PIC值最小,平均多态性信息含量值为0.595。进一步细分来看,CSSM19、T123、T156、N、BM203、OCAM、T507、T530、T501和C143这些位点的平均PIC值在0.5及以上,依据相关评判标准,它们属于高度多态位点;而BM848位点的PIC值落在0.25~0.5这一区间,因而被判定为中度多态位点。

在进行Hardy-Weinberg平衡检验时,得出了这样的结果:除了T123、BM203、OCAM和T530这几个位点偏离了Hardy-Weinberg平衡(对应的P值小于0.05或者小于0.01)之外,其余的7个位点均未出现偏离情况。

另外,就11个位点的无偏随机识别概率P(ID)而言,其数值为 1.408×10^{-3} ,累计个体鉴别力达到了99%。综合上述各项位点相关的关键指标来看,这11个位点所具备的多态性、杂合度以及个体鉴别能力等特征,完全能够契合马鹿个体识别分析工作的要求,为后续精准开展马鹿个体识别等遗传

学研究提供了有力的数据支撑。

在本次研究中,借助精心筛选出的11对微卫星引物,针对68份马鹿粪便样品展开了基因型分型分析工作。经过一系列严谨的试验操作与数据分析流程,最终从中成功获取到了56个不同的基因型。

从遗传学概率角度来讲,2个不同个体的基因型完全一致的概率极低,仅为 10^{-14} 。在法医鉴定领域,有着这样一条既定的判定标准:对于非同卵双生的2个样品,如果它们的基因型呈现出完全一致的情况,那么就会被认定为属于同一个体或者是同卵双生个体^[12]。

随后,运用专业的CERVUS2.0软件对试验数据进行深入分析,分析结果表明,这些微卫星座位的联合区分率相当高。即便在出现同卵双生这种特殊情况时,经过精准测算,其判断错误的概率Psib也仅仅只有0.12%,这一极低的错误概率充分彰显了此次所选微卫星引物以及相应分析方法的可靠性。

综合考虑法医鉴定领域的相关标准,并紧密结合本次实验所获得的实际数据分析结果,可以明确地做出判定:只要样品的基因型存在差异,那么就能够将其判定为不同个体。

3 讨论

3.1 微卫星引物的获取

在利用微卫星标记技术展开个体识别工作时,

获取微卫星引物堪称关键的第一步，后续研究的顺利开展与之紧密相连。当下，筛选微卫星位点主要有3条可行途径，各有特点与局限，研究者得依研究实际情况权衡选用。

第一条途径是查找现成的微卫星引物。专业上讲，锁定合适微卫星位点后，科研人员能按实验规划，把它灵活用作探针来初步探测，或是制成引物用于后续关键环节。拿到目标位点，接着便能启动微卫星 DNA 多态性分析，这对精准掌握目标物种、种群的遗传情况极为重要。要是能在庞大微卫星数据库里恰好找到适配引物，后续PCR扩增、测序以及凝胶电泳这些常规实验操作，就能依次有序开展。不过，该方法有明显短板，它依赖已知基因序列，研究范围就被限制在既定片段内，没办法全方位呈现整个基因组的复杂全貌，一些关键遗传信息也就容易遗漏。

第二条途径是投身微卫星DNA文库筛选工作。操作原理是凭借对既有DNA数据库里序列的深度检索、细致比对，从中定位出合用的微卫星位点。可这方法像是在有前提条件限制下“跳舞”，得有充足完备的既有 DNA 序列资源作支撑，要是储备不足、覆盖不全，筛选工作立马就会陷入僵局、难以推进。还有另一种做法，即自主搭建 DNA 文库，好处是能收获较多且适配特定物种的微卫星位点，给后续实验备好专属遗传素材；弊端也不少，操作流程繁杂琐碎，要投入大量人力，还得耗费巨额资金，非常考验科研团队的实操与资源调配能力。

第三条途径则是巧妙借用亲缘关系近的物种的微卫星位点。从分子遗传学特性看，微卫星DNA的核心序列突变活跃，侧翼区却保守稳定。正因如此，研究特定物种、种群时，合理参考其近缘物种已有的微卫星位点来当引物，是个高性价比做法。相较前两条途径，它就像一条“便捷通道”，操作简便，避开诸多复杂流程，能大幅减少工作量；关键是还能显著缩短研究周期，利于科研成果更快产出，契合当下高效科研的需求。

目前，在鹿类动物中发现约有200多个微卫星位点^[13]，除了极少数位点是直接从DNA文库中筛选的以外，绝大多数都是将近缘种微卫星位点借用到鹿类。对于马鹿微卫星引物的借用可以通过其他近缘种中所使用的微卫星位点来实现^[14]，本研究对27

对分别来自加拿大马鹿、黑尾鹿和巴伐利亚地区马鹿的引物进行筛选，反复优化PCR扩增体系和扩增条件，最后得到清晰有效的微卫星电泳条带的有17对引物，借用成功率为62.9%，其中11对具有高多态性。

3.2 基因型的检测方法

国内外研究通常采用两种方法对微卫星基因型进行检测分别为：荧光标记全自动检测技术和聚丙烯酰胺凝胶平板电泳结合银染检测技术。聚丙烯酰胺胶联链在1959年被Raymond和Weintraub两位科学家当作电泳支持介质。利用此方法检测微卫星基因型时，利用银染的方法对电泳后的凝胶检测进行处理。聚丙烯酰胺凝胶平板电泳结合银染检测技术检测方法优点是分辨率高，费用较低，但缺点明显，首先此试验过程长，试验过程中的试验步骤相当繁琐，且对实验人员的操作技术要求十分高，对检测结果造成影响的因素十分众多，并且应用软件在读取基因型时准确性受电泳效果的影响。

随着科学技术的发展，引物荧光标记全自动检测技术已经逐渐替代聚丙烯酰胺凝胶平板电泳结合银染检测技术成为微卫星检测首选。应用荧光技术与GeneScanner ABI系列软件检测等位基因的方法最先是1992年由Sullivan等人^[15]开发的，经数代改进后现该仪器可一机多用，即可进行DNA碱基序列测定，又可进行DNA片段长度的定质定量。荧光全自动检测相比于聚丙烯酰胺凝胶电泳，具有以下优点：无污染、使用方便、技术成熟等。鉴于上述诸多优势，荧光全自动检测在实际应用中愈发受到人们的青睐。在利用荧光标记检测微卫星时，主要存在以下两种常用的方法：

其一，荧光标记dNTP法。具体操作流程为，在反应混合液里添加事先已通过荧光化学物质进行标记的dNTP。随后，在PCR反应进程中，这些带有荧光标记的dNTP会依据碱基互补配对原则，不断地被整合到正在合成的PCR产物之中。待PCR反应结束后，由于产物中可能混有一些杂质成分，为保证检测的准确性，往往需要对其进行纯化处理，之后再纯化后的产物与Loading Buffer按照一定比例混合，进而进行点样检测。然而，这种方法存在一定的局限性，其较为突出的缺点就是在PCR反应完成后，产物通常都要经历纯化这一额外步骤，这无疑

增加了操作的复杂性以及整体的实验时长，并且纯化过程若把控不当，还可能影响最终的检测效果。

其二，荧光标记引物法。该方法是把特定的荧光化学物质连接到每对PCR引物中的其中一条上。当进行PCR扩增时，以带有荧光标记的引物为起始，引导Taq酶合成新的DNA链，扩增结束后所得到的产物，可直接与Loading Buffer混合，然后就能进行点样检测。相较于荧光标记dNTP的方法，荧光标记引物法在操作上显得更为简便、灵活，能够在一定程度上简化实验流程，节省时间成本。其缺点在于每一对参与反应的引物都需要进行荧光标记操作，这就要求在实验准备阶段投入更多的精力和资源来确保引物标记的准确性，若标记出现差错，同样会对后续的检测工作产生不利影响。

本研究中将11对引物的上游引物5'端均作荧光标记，分别采用蓝(FAM)、绿(HEX)、黄(TAMR)3种不同颜色的荧光染料；并将11对引物分为3组，其中分别在第1、2组中对于扩增产物长度差别较大的引物标为同色，这样可同时多个位点进行片段分析，以便提高工作效率。

3.3 适合粪便个体识别的分子标记

由于野外采集的粪便样品难以通过直观方式分辨其所属个体，所以对其开展个体识别工作显得极为必要。基于个体基因型差异来进行识别相对简便，产生的误差也更易于量化，且识别结果的精确程度较高。本研究中所采用的DNA材料源自动物粪便，存在一定程度的降解。鉴于微卫星DNA的扩增片段长度通常在400 bp以下，对于中、高度降解的DNA材料而言，运用微卫星进行检测较为适宜。此外，微卫星具有高水平的遗传变异以及可快速实施PCR扩增的优点，这使其成为个体识别中首选的分子标记。

在利用微卫星DNA实施个体识别时，挑选一套有效且具高度多态性的微卫星位点至关重要。所选取的微卫星位点数量决定着个体识别的准确性，若位点过少，则无法满足个体鉴定的要求；而若位点过多，不仅会导致实验成本增加，还会使实验误差增大。当前，研究者一般借助PI值（即种群内不同个体具有相同基因型的概率）来确定某一具体研究项目所需的微卫星座位数。在本研究中，所使用的11个微卫星位点的无关个体基因型相似概率为 1.408×10^{-3} ，累计个体鉴别力高达0.9999998。由于

2个非同卵双生个体的基因型完全一致的概率为 10^{-14} ，在法医鉴定中，会将基因型完全相同的2个非同卵双生样品认定为同一个体或同卵双生个体。本研究结果表明，微卫星座位的联合区分率很高，即便出现同卵双生的情况，判断错误的概率 P_{sib} 也仅为0.12%，这意味着此11个微卫星位点的鉴定体系完全能够胜任马鹿的个体鉴定工作。

研究方法以粪便作为研究材料，不但将对马鹿的干扰和伤害降至最低，而且在收集样品时所需成本也最低，从而推动了马鹿保护遗传学的研究进程，并为今后开展马鹿种群大小估计、种群长期动态监测、种群迁徙路线分析以及社群结构分析等工作提供了实验基础，对于野生马鹿种群的管理、监督以及保护工作的开展具有一定意义。

参考文献

- [1] Red K H. Microsatellite Variation in Scandinavian Cervidae Using Primers Derived from Bovidae[J]. *Hereditas*, 1998, 129 (1): 19-25.
- [2] R. O. Polziehn, J. Hamr, F. F. Mallory, and C. Strobeck. Microsatellite analysis of North American wapiti (*Cervus elaphus*) populations[J]. *Molecular Ecology*, 2000, 9: 1 561-1 576.
- [3] H. G. Broders, S. P. Mahoney, W. A. Montevecchi, and W. S. Davidson. Population genetic structure and the effect of founder events on the genetic variability of moose, *Alces alces*, in Canada[J]. *Molecular Ecology*, 1999, 8: 1 309-1 315.
- [4] Meredith E P, Rodzen J A, Levine K F. Characterization of an additional 14 microsatellite loci in California Elk (*Cervus elaphus*) for use in forensic and population applications[J]. *Conservation Genetics*, 2005 (6): 151-153.
- [5] Jones K C, Levine K F, Banks J D. Characterization of 11 polymorphic tetranucleotide microsatellites for forensic applications in California Elk (*Cervus elaphus canadensis*) [J]. *Molecular Ecology Notes*, 2002, 2: 425-427.
- [6] Kuehn R, Schroeder W, Pirchner F, et al. Genetic diversity, gene flow and drift in Bavarian red deer populations (*Cervus elaphus*) [J]. *Conservation Genetics*, 2003, 4: 157-166.
- [7] Pierson C A, Ede A J, Crawford A M. Ovine microsatellites at the OarHH30, OarHH51, OarVH54, OarCP88, OarCP93, OarCP134 loci[J]. *Animal Genetics*, 1994, 25:

- 294-295.
- [8] Bellemain E, Swenson J E, Tallmon D, et al. Estimating population size of elusive animals with DNA from hunter-collected feces: four methods for brown bears[J]. *Conservation Biology*, 2005, 19 (1) : 150-161.
- [9] Park S D E. Trypanotolerance in west african cattle and the population genetic effects of selection[D]. Ph. D. thesis: University of Dublin, 2001.
- [10] Zhan X J. Using non-invasive sampling genetic study of the giant panda population and spread[D]. Doctoral Dissertation: Institute of zoology, Chinese academy of sciences, 2006.
- [11] Y. Y. Hong. SSR is the current individual identification and the application of the molecular conservation genetics[D]. Master's thesis: Agricultural University Of Hunan. 2004.
- [12] H. B. Ernest, M. C. T. Penedo, B. P. May, M. Syvanen, W. M. Boyce. Molecular tracking of mountain lions in the Yosemite Valley region in California: genetic analysis using microsatellites and faecal DNA[J]. *Molecular Ecology*, 2000, 9, 433-441.
- [13] Xu Y C, Pan Z C, Xu Z R. Status of microsatellites as genetic markers in cervids[J]. *Journal of Forestry Research*, 2001, 12 (1) : 55-58.
- [14] Slate J, Coltman D W, Goodman S J, et al. Bovine microsatellite loci are highly conserved in red deer, sika deer and Soay shee [J]. *Animal Genetics*, 1998, 29 (4) : 307-315.
- [15] Sullivan K M, Pope S, Gill P. Automated DNA profiling by fluorescent labeling of PCR products[J]. *PCR Methods App*, 1992, 2: 34-40.

Microsatellite Techniques-based Analysis of Feces Samples for Individual Identification of Northeastern Red Deer

LIU Yanhua, ZHENG Pingting, HUO Jiyao, HUANG Yulan, WANG Jialin, LI Jiahe

(College of Wildlife and Nature Reserves, Northeast Forestry University, Harbin Heilongjiang 150040, China)

Abstract: This study used the fecal DNA extraction kit (QIAamp DNA Stool Mini Kit) produced by QIA-GEN Company to extract fecal samples of red deer. The polymorphism distribution of 27 microsatellite loci of deer species closely related to red deer was detected, their genetic diversity was evaluated, and the feasibility of using them for individual identification was explored. The results showed that the average heterozygosity of 11 microsatellite loci varied between 0.513 and 0.715. The locus with the lowest gene heterozygosity was T507, and there were two loci with the highest gene heterozygosity, namely BM848 and T530, with an average of 0.614. The polymorphism information content (PIC) values varied between 0.264 and 0.764. The smallest was BM848, and the largest was T501, with an average value of 0.595. Among them, the average PIC values of CSSM19, T123, T156, N, BM203, OCAM, T507, T530, T501 and C143 were above 0.5, which were highly polymorphic loci. The PIC value of the BM848 locus was between 0.25 and 0.5, which was a moderately polymorphic locus. The unbiased random identification probability $P (ID)$ of the 11 loci was 1.408×10^{-3} , and the cumulative individual discrimination power was 99.99%. Therefore, these 11 loci can fully meet the requirements for individual identification analysis of red deer.

Keywords: individual identification, red deer, feces, microsatellite

Fund projects: World Wide Fund for Nature Project (10000766) ; Innovation Training Project of Northeast Forestry University (202410225584)

Correspondence author: LIU Yanhua (1977-) , female, Han nationality, from Chifeng, Inner Mongolia, senior engineer, doctoral candidate, research direction: wildlife protection.