



羽翎中DNA和糖皮质激素共提取技术的研究

于梦佳^{1#}, 刘思霞^{1,2#}, 周雨¹, 张馨元¹, 任晓彤¹,
周永恒¹, 杨守庄^{1,3}, 李志刚^{1,4}, 徐艳春^{1,5}, 杨淑慧^{1*}

(1. 东北林业大学野生动物与自然保护地学院, 哈尔滨, 150040;

2. 濮阳市油田第一中学, 濮阳, 457000;

3. 秦皇岛野生动物园, 秦皇岛, 066100;

4. 唐山动物园, 唐山, 063020;

5. 国家林业和草原局野生动物保护与利用工程技术研究中心, 哈尔滨, 150040)

稿件运行过程

收稿日期: 2024-05-06

修回日期: 2024-05-11



关键词: 羽毛;

DNA;

糖皮质激素;

共提取;

非损伤性采样

Keywords: Feather;

DNA;

Corticosteroids;

Co-extraction;

Non-invasive sampling

中图分类号: Q953

文献标志码: A

文章编号:

2310-1490(2024)-04-0800-11

DOI: 10.12375/ysdwx.20240413

摘要

羽毛是鸟类研究、监测和管理中常用的非损伤性材料,可从中提取DNA和激素进行遗传和生理分析。然而,作为高度角化的组织,羽翎中的DNA和激素含量极低,提取较为困难。本研究开发一种能够从羽翎中同时提取总DNA和糖皮质激素的方法,命名为DH-CoEx。以丹顶鹤(*Grus japonensis*)、绿孔雀(*Pavo muticus*)为代表的大型鸟类廓羽、尾上覆羽和以栗鹀(*Emberiza rutila*)、小鹀(*E. pusilla*)为代表的小型鸟类飞羽、绒羽进行测试和评估。结果显示:DH-CoEx能有效从完全角化的羽翎中同时提取出总DNA及糖皮质激素(皮质醇);从5 mg样本中提取的线粒体DNA(mtDNA)拷贝数达到 10^4 量级,可支持长达1 350 bp的片段扩增;所提取的核DNA(nuDNA)质量足以进行长达200 bp的微卫星等位基因分型,成功率为98.11%~99.60%;提取的皮质醇含量达到了传统单一提取激素方法的水平,足以进行相关生理学分析。以上结果说明,DH-CoEx是一种简易、高效和适用性广泛的方法,实现了角化材料总DNA和糖皮质激素的共提取,可以支持mtDNA和微卫星等分子标记的分析和应激激素的分析,极大地提高了羽毛的利用率,具有广泛的应用潜力。

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金项目(2572020DY02)

第一作者简介: 于梦佳(1999—),女,硕士研究生;主要从事野生动物法医学研究。E-mail:maha2082@163.com

*共同第一作者: 于梦佳; 刘思霞

*通信作者: 杨淑慧, E-mail:474568251@qq.com

Development of A Method for Con-extraction of DNA and Corticosteroid from Fully Keratinized Feather Vane

YU Mengjia^{1#}, LIU Sixia^{1,2#}, ZHOU Yu¹, ZHANG Xinyuan¹, REN Xiaotong¹,
ZHOU Yongheng¹, YANG Shouzhuan^{1,3}, LI Zhigang^{1,4}, XU Yanchun^{1,5}, YANG Shuhui^{1*}

(1. College of Wildlife and Protected Area, Northeast Forestry University, Harbin, 150040, China;

2. Puyang Oilfield NO. 1 High School, Puyang, 457000, China;

3. Qinhuangdao Wildlife Park, Qinhuangdao, 066100, China;

4. Tangshan Zoo, Tangshan, 063020, China;

5. National Forestry and Grassland Administration Research Center of Engineering and Technology for Wildlife Conservation and Utilization, Harbin, 150040, China)

Abstract: Feather is a sort of commonly used noninvasive material that can provide DNA and hormones for the research, monitoring and management of birds. However, feather vane is a fully keratinized tissue with very low content of DNA and hormones that often challenges the extraction. In the study, we developed a novel method to co-extract DNA and corticosteroid from feather vane, named DH-CoEx. The extraction efficiency and usability of DH-CoEx were evaluated by using feathers from large feathers represented by the red crowned crane (*Grus japonensis*) and green peafowl (*Pavo muticus*), and small feathers represented by the chestnut bunting (*Emberiza rutila*) and little bunting (*E. pusilla*). The results showed that DH-CoEx could co-extract total DNA and corticosteroid (cortisol) from feather vanes. The copy number of mitochondrial DNA (mtDNA) extracted from 5 mg feather reached 10^4 , that could support amplification of 1, 350 bp fragments. The nuclear DNA (nuDNA) could support genotyping of microsatellites with a success rate of 98.11% – 99.60% success rate for alleles less than 200 bp. The yield of cortisol co-extracted reach the level of normal single extraction approaches and supportive for physiological analysis. These results suggest that DH-CoEx is a simple and effective method to co-extract DNA and corticosteroids from a fully keratinized feather to support analysis of genetic markers and stress hormone in a broad range of application.

羽毛作为一种非损伤性样本,可从中获得 DNA、RNA 和激素,新鲜羽毛在羽轴基部的髓质中甚至含有活细胞,因此被广泛用于物种鉴定、系统发育关系分析、性别确定、遗传多样性分析、生理状况分析以及细胞分离^[1-8],在鸟类生态和保护相关研究中发挥重要作用。羽毛由高度角化的细胞构成,细胞在角化过程中 DNA、RNA 会发生大规模降解,只有极少量的核 DNA (nuDNA) 和线粒体 DNA (mtDNA) 因被角蛋白包被而得到保留,这些残留的 mtDNA 因拷贝数多且完整性相对较好,可以通过 PCR 扩增得到线粒体基因序列^[9],而 nuDNA 则不尽如人意。nuDNA 不仅高度破碎化,拷贝数很少,其 PCR 扩增成功率往往很低,且还经常出现等位基因缺失和非特异扩增等问题^[10-13],所以,羽毛提取的 DNA 较少用于核基因

分析中,主要原因是在提取过程中 nuDNA 不能很好地裂解坚固的角化组织和充分释放 DNA,同时对微量且高度片段化的 DNA 回收效率不高。

糖皮质激素 (glucocorticoid) 是鸟类生理调节的关键激素,对适应环境、行为变化和能量管理至关重要,是生理分析的重要指标之一^[14]。血液中的激素可通过毛细血管渗透到毛囊细胞,最后扩散到羽毛中^[15]。因此,通过分析脱落羽毛中的糖皮质激素,可以无应激地监测鸟类的生理状态,提高应激相关研究实验数据的可信性^[16]。近年来,从羽毛中提取激素不断取得成功^[17]。然而,糖皮质激素的提取与 DNA 的提取是完全独立的工作,在很多研究中只能分开提取,对于稀缺的羽毛样本消耗很大。因此,需要设计一种激素-DNA 共提取方法。

提取糖皮质激素时,首先需要对羽毛组织进行充分裂解,释放糖皮质激素,然后采用异丙醇提取,而这一过程也同时释放了DNA,异丙醇能促进DNA在水溶液中沉淀,便于其分离和纯化^[18]。因此,相同的裂解液经过异丙醇处理后,可以采用分步法分别获得激素和DNA。基于此,本研究建立一种能从羽翎中同时提取总DNA和糖皮质激素的方法,命名为DNA-激素共提取法(DNA and hormone co-extraction,简称“DH-CoEx”)。该方法不仅为羽毛中DNA和激素的共同提取提供了新方法,且显著提高了羽毛样本的利用效率和信息挖掘潜力。

1 材料与方法

1.1 样本采集

共采集羽毛样本79份,其中绿孔雀(*Pavo muticus*)36份,编号GP-01~GP-36,代表大型陆禽;丹顶鹤(*Grus japonensis*)22份,编号DDH-01~DDH-22,代表大型涉禽;栗鹀(*Emberiza rutila*)和小鹀(*E. pusilla*)代表小型鸟类,其中栗鹀14份,编号LW-01~LW-14,小鹀7份,编号XW-01~XW-07。此外,还采集了4份肌肉样本,每种鸟类各1份。绿孔雀样本是从云南省玉溪市新平县和峨山县交界处的野外拾取,丹顶鹤样本是由秦皇岛野生动物园、唐山动物园和温州动物园提供,栗鹀和小鹀样本均由黑龙江省齐齐哈尔市森林公安部门提供。绿孔雀羽毛为已脱落3~4a的陈旧尾上覆羽^[19],其余羽毛皆为自然脱落的胸部或背部廓羽和绒羽,脱落后较短时间内即收集和实验。全部羽毛均在牛皮纸信封中自然干燥,常温保存。肌肉样本置于-20℃冷冻保存。

1.2 DH-CoEx的建立

1.2.1 DH-CoEx的原理

DH-CoEx通过使用Tris-NaCl-Ca²⁺缓冲液替代TNE(Tris-NaCl-EDTA)缓冲液,从而提高了角化组织裂解的热稳定性和催化效率,实现了DNA和激素的高效释放。为防止Ca²⁺影响PCR实验,消化后加入EDTA螯合Ca²⁺。同时,增加蛋白酶K和DTT用量,使消化时间缩短至3~4h,以确保角蛋白充分裂解,保持酶活性。在提取DNA和激素时,先加氯仿使角蛋白变性并通过高速离心去除蛋白组分,再用异丙醇萃取糖皮质激素并促进DNA沉淀。最后,磁珠吸

附DNA实现分离,而糖皮质激素因异丙醇的萃取作用保留在溶液中,可使用常规方法回收。

1.2.2 羽毛样本的预处理

从每个羽毛样本上撕取羽翎5~10mg放入1.5mL EP管中,用2%SDS溶液浸泡30min,然后用纯净水冲洗,在75%乙醇中浸泡5min,置于无菌培养皿中自然干燥。

1.2.3 样本的消化及DNA-激素共提取

精准称取5mg预处理过的羽翎样本移至无菌的1.5mL EP管中,依次加入350μL Tris-NaCl-Ca²⁺缓冲液、75μL蛋白酶K(20mg/mL)、75μL DTT(200mg/mL)和40μL SDS(15%)。漩涡震荡30s,在56℃水浴锅中消化3~4h。随后加入20μL EDTA溶液(0.5mol/L),再次震荡,继续水浴1h后取出提纯。具体步骤如下。

(1)取400μL氯仿加入上述1.5mL EP管中,轻轻摇匀30s,静置3min,12 000 r/min离心15min。

(2)吸取上清液于新的1.5mL EP管中,加入等体积异丙醇,颠倒混匀30s,向管中加入40μL磁珠(中科雷鸣,中国),漩涡震荡1min,室温静置3min,其间颠倒混匀2或3次。将试管置于磁力架上分离磁珠,并吸取剩余溶液至新的EP管中以提取激素。

(3)从磁力架上取下EP管,向管中加入600μL Buffer W1(AxyPrep,中国),轻轻摇匀30s,将EP管置于磁力架上进行磁力分离,吸弃废液。

(4)从磁力架上取下EP管,向管中加入600μL Buffer W2(AxyPrep,中国),轻轻摇匀30s,将EP管置于磁力架上进行磁力分离,吸弃废液。重复步骤4。

(5)为彻底去除废液,将EP管以2 000 r/min离心30s,再次置于磁力架上进行磁力分离,吸弃废液。室温开盖晾干5~10min,至乙醇完全挥发。

(6)取下EP管,加入100μL 65℃ ddH₂O,振荡混匀,56℃水浴15min,每隔2~3min轻轻混匀10s。将EP管从水浴锅中取出,5 000 r/min离心1min,置于磁力架上进行磁力分离,小心吸取上清(目的DNA溶液)至新的1.5mL EP管中,置于冰箱-20℃保存。

(7)使用固相提取(SPE)法对步骤(2)得到的溶液进行激素提取^[20-21],并在鸟皮质醇ELISA检测试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,中国)中定容。

1.3 DH-CoEx的可用性评估

1.3.1 可扩增 mtDNA 片段长度的评估

以绿孔雀和丹顶鹤 mtDNA 为模版,设计 PCR 引物用以扩增不同长度的目标片段(表1)。扩增反应在 50 μ L 体系中进行,包括 2 \times EasyTaq PCR Super-Mix(全式金生物技术有限公司,中国)25 μ L,上、下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L,DNA 模板 5 μ L,ddH₂O 18 μ L。使用 9700 型 PCR 扩增仪(GeneAmp,美国)

扩增。扩增程序:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 45 s,按照对应的退火温度退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s,35 个循环;循环结束后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。从每个扩增反应中分别取 4 μ L 扩增产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,电泳缓冲液为 1 \times TAE,95 V 下电泳 25 min。随后,使用 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒(Axygen,中国)纯化回收,并进行双向 Sanger 测序,测序序列进行 BLAST 同源性比对。

表 1 扩增 mtDNA 片段的引物序列及退火温度

Tab. 1 The primer sequences for the amplifying mtDNA fragments and their annealing temperatures

| 物种 Species | 引物名称 Primer name | 引物序列(5'→3') Primer sequence(5'→3') | 引物长度/bp Length | 退火温度/ $^{\circ}$ C Annealing temperature |
|----------------------------|-------------------------------|---|---|---|
| 绿孔雀 <i>Pavo muticus</i> | G-1 | F: GGCACCCAACATCCGAAAATC R: TGAGGAGAAGGCTAGGGATGT | 196 | 52 |
| | G-2 | F: CGAAACGTACAATACGGCTGAC R: AATCCCCCTCAGGCTCATTC | 293 | 60 |
| | G-3 | F: TCCACTAGGCATCTCATCCAAC R: AGAATTTGGGAGACTGGACGG | 351 | 60 |
| | G-4 | F: ACCTCACCTACCCCAACAAG R: AGGGCTCCAATTAGGGCCTAT | 416 | 60 |
| | GJ-1 | F: CGCTCATAACATGCCGAAACG R: ATTCTACGAGGCTTTGGCCG | 290 | 60 |
| | GJ-2 | F: TCGATCTACCCACCCCATCG R: CGTTTGCATGTAGGTTGCGG | 201 | 60 |
| | GJ-3 | F: TCCCATAACATCGGCCAAACC R: GAGGATTAGTACGGAGGCGG | 446 | 60 |
| | GJ-4 | F: CTCATACATGCCGAAACG R: GGAGGAGGAAGTGTAAAGGT | 357 | 52 |
| | GJ-5 | F: GCTCGAAAAGGCCCAAACAT R: TCTGTAAGGTCGAATGGAGCG | 509 | 60 |
| | 丹顶鹤 <i>Grus japonensis</i> | GJ-6 | F: TGGCCCTTCTCCTAGCAATC R: AATCGTGGGTAAGAAGCTCGG | 610 |
| GJ-7 | | F: TATCCACCCTATTTGCCGCC R: TTTATGGAGGTGAGGCGGTG | 772 | 60 |
| GJ-8 | | F: TTTGGGCTCCACCCATGATT R: AGCTCGATTAGGTGGGAAGC | 986 | 60 |
| GJ-9 | | F: CGAGCAGAAGCCAATACAGC R: AGGTCGATTAGGTGGGAAGC | 1 181 | 60 |
| GJ-10 | | F: CCTCCCCATTGCCTTATTCGT R: TTTATGGAGGTGAGGCGGTG | 1 350 | 60 |
| GJ-11 | | F: AGGTCGAGCAGAAGCCAATAC R: AAGTCGGCAAGCCCTTCTG | 1 227 | 60 |

1.3.2 mtDNA提取量的评估

采用 Ngatia *et al.* [22] 的方法,对 DH-CoEx 提取的 79 份羽翎样本中的 mtDNA 进行定量分析。为保证扩增的准确性和高效性,重组质粒的构建及标准曲线的绘制均使用 4 种鸟类的肌肉 DNA。用于绿孔雀 T-A 克隆和 qPCR 的引物为 G-2,扩增的 mtDNA 片段长度为 293 bp;用于丹顶鹤、栗鹀和小鹀 T-A 克隆和 qPCR 的引物为 GJ-2,扩增的 mtDNA 片段长度为 201 bp。荧光定量 PCR 反应在 10.0 μ L 体系中进行,包括 1.0 μ L DNA 提取液,5.0 μ L TB Green Premix ExTaq II (TaKaRa, 日本),上、下游引物各 0.4 μ L 及 3.2 μ L 去离子水。扩增程序:95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s;95 $^{\circ}$ C 变性 5 s,60 $^{\circ}$ C 退火 34 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,40 个循环;循环结束后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 s,反应用 BTK-96 实时荧光定量 PCR 分析仪(无锡百泰克生物技术有限公司)完成。通过计算每份样本中 mtDNA 的拷贝数来评估 DH-CoEx 在不同鸟类羽翎中的提取效果。使用独立样本 *t* 检验对不同新鲜度和不同体型鸟类的羽毛样本进行显著性差异分析,数据处理均在 IBM SPSS Statistics 25 软件中进行。

1.3.3 微卫星分型可靠性的评估

为验证 DH-CoEx 提取的羽翎 DNA 在微卫星扩增及分型中的可行性,对绿孔雀(GP-01 ~ GP-36)、丹顶鹤(DDH-01 ~ DDH-22)、栗鹀(LW-01 ~ LW-14)和小鹀(XW-01 ~ XW-07)共 79 份羽翎进行 28 个微卫星分型,其中绿孔雀和丹顶鹤各 11 个,栗鹀和小鹀共 6 个。引物序列^[23-25]、位点和退火温度见表 2。PCR 反应在 15.0 μ L 体系中进行,包括 2 \times Rapid Taq Master Mix(北京全式金生物技术有限公司,中国)5.0 μ L,上、下游引物(10 μ mol/L)各 0.4 μ L, DNA 模板(15 ng/ μ L)9.0 μ L,BSA 0.2 μ L。使用 9700 型 PCR 扩增仪(GeneAmp,美国)扩增。扩增程序:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 45 s,按照对应的退火温度退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s,35 个循环;循环结束后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增子经 2.0% 琼脂糖凝胶电泳检测后,通过 ABI3130 测序仪进行毛细管电泳分离,并用 GeneMarker 处理信号^[26],获得基因型数据。通过软件 GIMLET 估算上游等位基因扩增丢失(upper allele dropout)的比例,并使用独立样本 *t* 检验对不同新鲜度和不同体型鸟类的羽毛样本进行显著性差异分析,数据处理均在 IBM SPSS Statistics 25 软件中进行。

表 2 微卫星引物序列及退火温度

Tab. 2 Microsatellite primer sequences and annealing temperature

| 物种 Species | 位点 Locus | 引物序列(5'→3') ^[23-25] Primer sequence (5'→3') | 退火温度/ $^{\circ}$ C Annealing temperature |
|----------------------------|-------------|---|---|
| 绿孔雀 <i>Pavo muticus</i> | PC3 | F: GCTGGACAAAGGTGATTCTTC R: TTGCACTGGACTTGGTAATGA | 60 |
| | PC19 | F: CTAGGGAAAGGCCAGGGTAG R: TGGAAAGGAAAGGAGAGCAC | 55 |
| | PC25 | F: TCGTTTTTACACCTTGATTTT R: GATCTTTTGTCTGTTTTCTTT | 55 |
| | PC41 | F: GATCTGGAAGGGAGTGTGGA R: TCCTTCACCTCAACACCAAA | 60 |
| | PC46 | F: TATACCGGGCTGCTGAACAT R: GGAAGGAGAGGGCCTACAAT | 60 |
| | PC142 | F: TGGAGGTCTTTTACAACCTTGG R: CAATTTTAACATTTGTGTATGTATGTG | 60 |
| | PC148 | F: ACGGTGACTCCTAACCGTTG R: GATCCTTCGTCTGTGAGGTT | 60 |
| | PC151 | F: TTAATTGACAGCAGCAGAAAGA R: CTAGTTTTCCATTTGCCCTCG | 60 |
| | PC201 | F: TTCTCTGCTTTTGGGCAC R: AATGTCTGAGTGTGGGGGTC | 60 |
| | PC236 | F: TTTTGAAAGCTTTGGCCATT R: CATGTTGCACAGCTGGATTC | 55 |
| | PC281 | F: GCCCTGTCTGTCTTTTTGC R: CTGCATCACTTTGCATGACC | 60 |

续表 2

| 物种 Species | 位点 Locus | 引物序列(5'→3') ^[23-25] Primer sequence (5'→3') | 退火温度/°C Annealing temperature |
|---|-------------|---|----------------------------------|
| 丹顶鹤 <i>Grus japonensis</i> | GJ2298 | F: GCCTGTTGCAAGAACACAGA R: GGAGAAGTGAAGGGGAAGGT | 60 |
| | GJ1385 | F: CTGGGCACATCCCTTACTA R: CTGCCTGGTGTGAAATCCTT | 60 |
| | GJ8077 | F: GCAGGTGCACCGATTAAG R: CTTCAAGCAGGGAGAGGTG | 56 |
| | GJ4066 | F: TACATGCGGACAATGAAGA R: GGCCACGACAAGACTATCC | 60 |
| | GJ1471 | F: GAGAGGCCGTCTCCCTAAT R: CTCCACTGACCCAGAAGAG | 60 |
| | Gpa12 | F: GATCAATGCGAAGGATAGGGAGGT R: TCATCAATCTATTATTGCCCTCAGC | 60 |
| | Gpa36 | F: TTCATAGACATATGCTTACCTGTTCT R: ATCCATCCATCTATCTATCTATCTATC | 54 |
| | Gpa39 | F: TGCACAGTTTGGCCAAGAAG R: TTCCAAAGTAAATTAAGGTGTGTGG | 54 |
| | GJ1430 | F: GGTGTAGCTGCCCATTA R: AGGTGGCAAAATGAGATTG | 60 |
| | Gpa34 | F: GCACACACTGAGGAGACCACTGA R: CCTTGATGTGGGAAGACAACCTGC | 60 |
| 栗鹀、小鹀 <i>Emberiza rutila, Emberiza pusilla</i> | GJ2101 | F: TGAAGTGGCCCTAACCTGCT R: CTGGCACTCTCCTGCTCTCT | 60 |
| | Pdou3 | F: CTGTTTCATTAACCTCACAGGT R: AGTGAACTTTAATCAGTTG | 47 |
| | Pdo31 | F: GATCCACAGACGCAGACACAG R: CATGCTGAATATACTTTGTGAACCTGC | 56 |
| | M4-6-1 | F: AAGGCTGCAGGTGCTTCTG R: GGTGAAGGGGTGCTGTTAT | 58 |
| | M4-7 | F: CCAGTTAAGGACAGGCTGGG R: AGCAGCATCCATCTTCTGCT | 57 |
| | Pamo3 | F: ACCCAAACAAGAGCAGCAAT R: TCCTGAGGGATAAGAAGGAATTT | 53 |
| | ZC02 | F: TCTGATATTTCAACAGCATGCAC R: GCGCAACATTTCCATGCAC | 53 |

1.3.4 糖皮质激素提取量的测定

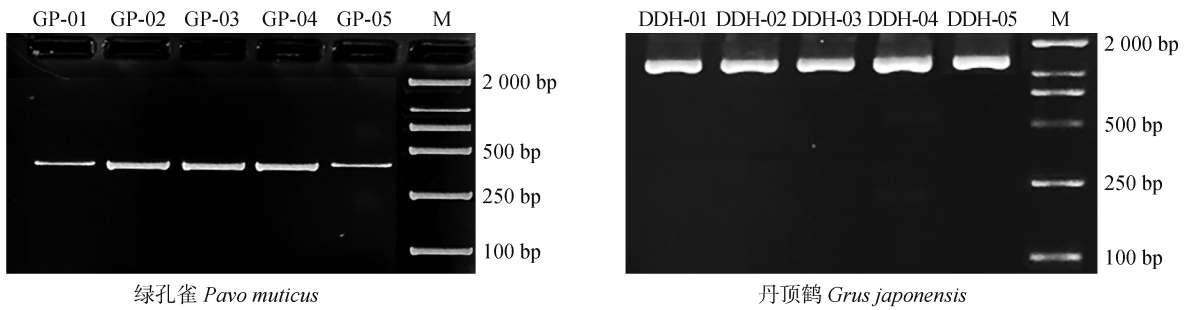
在考虑实验室条件和成本效益的基础上,采用皮质醇含量作为糖皮质激素水平的代表。通过鸟类皮质醇 ELISA 试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,中国),依照说明书步骤测定 1.2.3 节中提取的皮质醇含量。检测样本包括 GP-01 ~ GP-10、DDH-01 ~ DDH-06、LW-01 ~ LW-14 和 XW-01 ~ XW-07。为降低实验误差,每个样本进行 2 次重复,并计算平均值。使用独立样本 *t* 检验对不同新鲜度和不同体型鸟类的羽毛样本进行显著性差异分析,数据处理均在 IBM SPSS Statistics 25 软件中进行。实验所用材料包括微孔酶标板、标准品(S0 ~ S5 质量浓度依次为 0、10、20、40、80、160 ng/mL)、样本稀释液、检测抗

体-HRP、20 × 洗涤缓冲液、底物 A、底物 B、终止液及封板膜等。

2 结果

2.1 可扩增 mtDNA 片段长度

以 DH-CoEx 获取的绿孔雀和丹顶鹤羽毛 DNA 进行不同长度的 mtDNA 片段的扩增实验。结果显示:绿孔雀样本成功扩增出 196、293、351、416 bp 的片段;丹顶鹤样本扩增出 201 ~ 1 350 bp 长度的片段。在紫外线灯下,所有扩增产物均显示出单一且明亮的条带,并未因片段长度的增加而亮度降低(图 1)。扩增产物序列通过 BLAST 同源性比对,确认了其正确性。



M. DL2000 DNA marker.

图1 采用DH-CoEx提取的羽翎总DNA对不同长度mtDNA片段的扩增效果

Fig. 1 The amplification results of mtDNA fragments of different lengths extracted from feather samples using DH-CoEx

2.2 4种鸟类羽翎mtDNA提取量的比较

选取丹顶鹤作为大型鸟类的代表,栗鹀和小鹀作为小型鸟类的代表,检验鸟类体型大小和羽毛新鲜程度对DH-CoEx提取效率的影响。荧光定量PCR分析表明(图2A),从每5 mg丹顶鹤羽翎样本(DDH-01 ~ DDH-22)中提取的mtDNA平均拷贝数为 $(3.24 \times 10^4 \pm 4.87 \times 10^4)$,栗鹀(LW-01 ~ LW-14)和小鹀(XW-01 ~ XW-07)的平均拷贝数分别是 $(7.49 \times 10^4 \pm 7.68 \times 10^4)$ 和 $(5.86 \times 10^4 \pm 7.20 \times 10^4)$ 。尽管大型鸟类的提取效果略低于小型鸟类,但*t*检验未检测到

显著差异($P = 0.112$)。

绿孔雀羽毛样本脱落时间为3~4 a前,代表陈旧羽毛,丹顶鹤羽毛样本则为近期脱落,代表新鲜羽毛。荧光定量PCR分析显示,每5 mg绿孔雀羽毛样本(GP-01 ~ GP-36)中,平均提取到mtDNA拷贝数为 $(3.09 \times 10^4 \pm 5.47 \times 10^4)$;每5 mg丹顶鹤(DDH-01 ~ DDH-22)羽毛样本中,平均提取到mtDNA拷贝数为 $(3.24 \times 10^4 \pm 4.87 \times 10^4)$ 。两组数据之间无显著差异($P = 0.442$,图2B),表明羽毛的新鲜程度对DH-CoEx的DNA提取效果影响甚微。

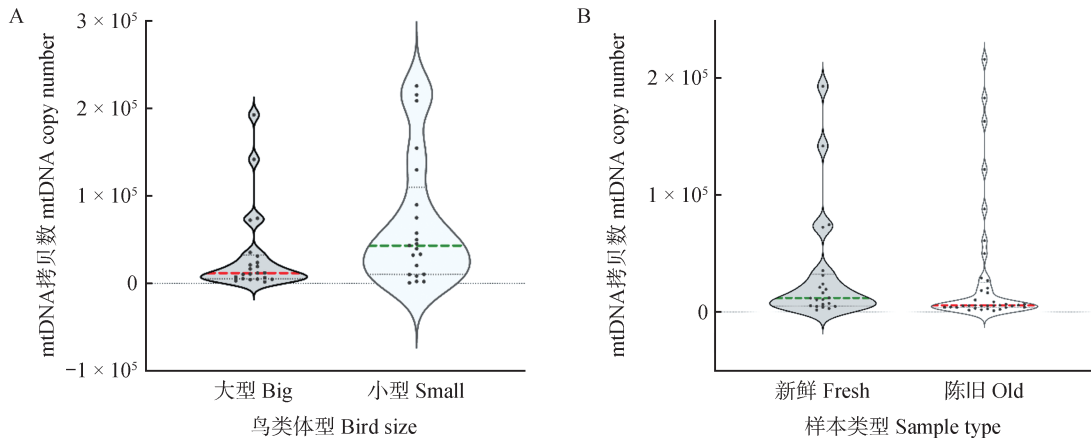


图2 DH-CoEx在不同羽翎样本中的mtDNA提取量

Fig. 2 The comparison of mtDNA copies in different feather samples using DH-CoEx

2.3 微卫星分型

对4种鸟类79份羽毛样本DNA进行28个微卫星位点分型,其中绿孔雀11个,丹顶鹤11个,栗鹀和小鹀共6个。结果显示:绿孔雀羽翎DNA(GP-01 ~ GP-36)的分型成功率为 $(98.23 \pm 3.65)\%$ (90.91% ~ 100.00%);丹顶鹤(DDH-01 ~ DDH-22)的分型成功率为 $(96.69 \pm 9.11)\%$ (63.64% ~ 100.00%);栗鹀(LW-01 ~ LW-14)的分型成功率为 $(98.81 \pm 4.46)\%$ (83.33% ~ 100.00%);小鹀(XW-01 ~ XW-07)的分

型成功率为100.00%。通过软件GIMLET估算上游等位基因扩增丢失的比例,结果显示4种鸟类均为0。将所有样本的分型数据按照<150 bp、150~<200 bp和≥200 bp进行分组,发现PCR扩增产物的长度对分型成功率具有显著影响(表3)。当片段长度≥200 bp时,分型成功率最低,为 $(97.50 \pm 2.15)\%$;当长度在150~<200 bp时,分型成功率提高到 $(98.11 \pm 2.68)\%$;而当长度<150 bp时,分型成功率达 $(99.60 \pm 0.80)\%$ 。

表3 DH-CoEx 提取的4种鸟类羽翎 DNA 对不同长度等位基因的检测成功率

Tab. 3 Detection success of feather DNA extracted from four bird species using DH-CoEx for different-sized microsatellite alleles

| 物种 Species | 检测成功率 /% Detection success | | |
|----------------------------|----------------------------|---------------|----------|
| | < 150 bp | 150 ~ <200 bp | ≥ 200 bp |
| 绿孔雀 <i>Pavo muticus</i> | 98.41 | 100.00 | 95.83 |
| 丹顶鹤 <i>Grus japonensis</i> | 100.00 | 96.21 | 95.59 |
| 小鹀 <i>Emberiza pusilla</i> | 100.00 | | 100.00 |
| 栗鹀 <i>Emberiza rutila</i> | 100.00 | | 98.57 |

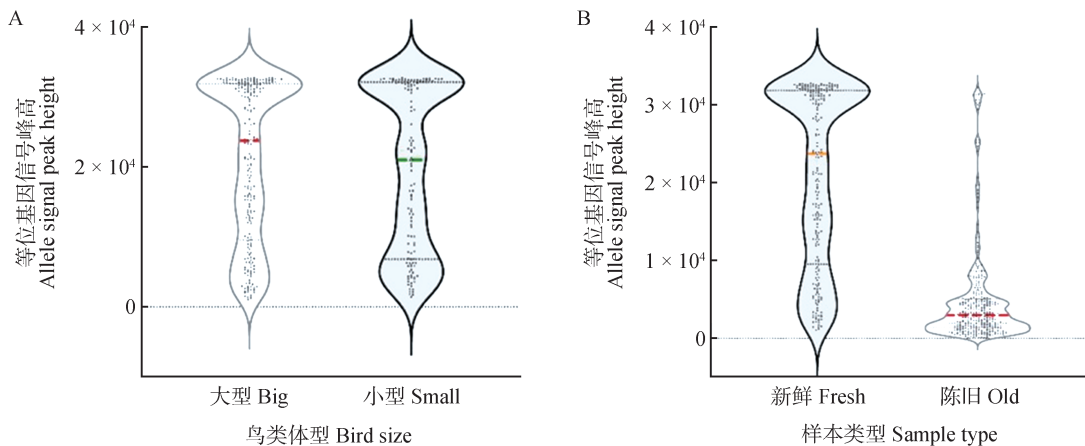


图3 DH-CoEx 在不同羽翎样本中的微卫星分型效果

Fig. 3 The comparison of microsatellite genotyping effects in different feather samples using DH-CoEx

2.4 激素的提取量

采用鸟皮质醇 ELISA 检测试剂盒测定与 DNA 共提取的皮质醇的含量。以标准品浓度为纵坐标, OD_{450} 为横坐标, 建立标准曲线方程: $y = 99.491x - 3.816$ ($R^2 = 0.9992$), 可以准确地估算皮质醇的含量。结果显示: 绿孔雀羽翎中提取的激素质量浓度为 34.645 ~ 159.506 ng/mL, 丹顶鹤为 74.690 ~ 156.272 ng/mL, 栗鹀为 41.609 ~ 167.216 ng/mL, 小鹀为 46.584 ~ 157.267 ng/mL。比较显示, 鸟类体型 ($P = 0.617$) 和羽毛新鲜程度 ($P = 0.896$) 对激素提取效果均无显著影响(图4)。

3 讨论与结论

3.1 DH-CoEx 的原理及创新

近年来, 分子生物学技术的发展为非损伤性材料的分析提供了更多途径。本研究建立的 DH-CoEx 解决了在完全角化的羽毛中同时提取 DNA 和激素

为了评估鸟类体型对微卫星分型的影响, 以 ABI3100 遗传分析仪上测得的等位基因信号的峰高为指标, 比较代表大型鸟类的丹顶鹤和代表小型鸟类的栗鹀、小鹀羽翎微卫星分型结果。t 检验结果显示, 大型鸟类的信号峰显著高于小型鸟类 ($P = 0.012$, 图 3A)。此外, 对新鲜脱落的丹顶鹤羽翎样本和脱落 3 ~ 4 a 的绿孔雀羽翎样本的分型结果进行比较, 结果显示, 新鲜羽翎样本的微卫星等位基因信号峰高极显著高于陈旧羽翎样本 ($P < 0.0001$, 图 3B)。

的问题, 在获取鸟类遗传学和生理学信息的同时, 大大降低了样本损耗, 减轻了野外鸟类研究的困难。

DH-CoEx 的设计基于两点: 一是角化组织的充分裂解, 实现 DNA 和激素的同时释放。在这一过程中, 使用 Tris-NaCl-Ca²⁺ 缓冲液替代传统的 TNE 缓冲液, Ca²⁺ 的引入提高了缓冲液的热稳定性和催化效率^[27]; 然而, Ca²⁺ 可能对后续 PCR 实验产生影响, 因此在消化结束后需加入 EDTA 来整合掉其中的 Ca²⁺; DH-CoEx 还增加了蛋白酶 K 和 DTT 用量, 从消化一般组织的 25 μ L (25 mg/mL) 和 5 μ L (1 mol/L)^[28] 分别提高了 2.4 倍和 3.0 倍, 由此将消化时间缩短至 3 ~ 4 h, 一方面确保角蛋白的充分裂解, 同时又最大限度地保持酶的活性。二是 DNA 和激素的提取互不影响。笔者首先向裂解液中加入了氯仿, 把角蛋白变性, 因为氯仿在水溶液中的溶解度极低, 不会对目的产物的提取产生影响。因此, 通过高速离心把蛋白组分去除, 然后在水相中加入异丙醇, 先对糖皮

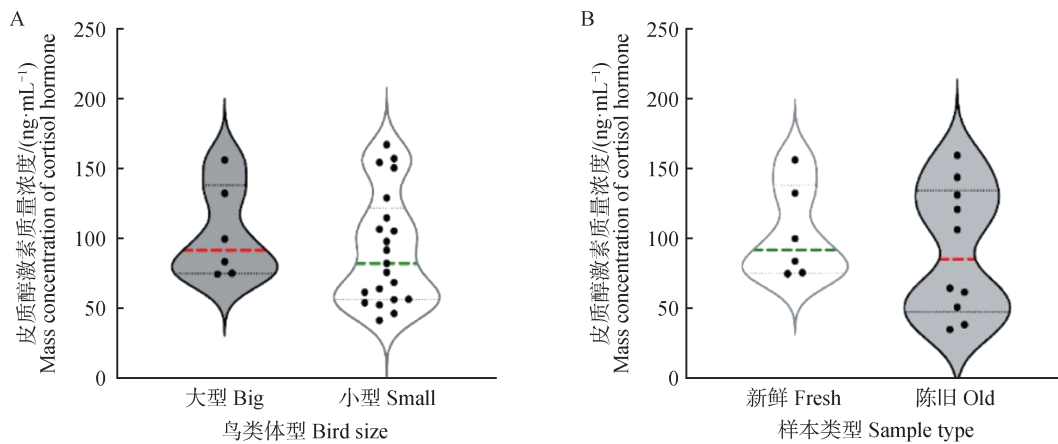


图4 DH-CoEx在不同羽翎样本中的皮质醇激素提取量

Fig. 4 The comparison of corticosterone extraction amounts in different feather samples using DH-CoEx

质激素进行萃取,使之溶于异丙醇中^[29],同时可以促进DNA从溶液中析出^[18],为二者的进一步分离奠定基础。当向溶液中加入磁珠后,DNA即被高效地吸附到其表面,从而在磁场中顺利地被分离出来,而糖皮质激素因异丙醇的萃取作用被保留在剩余的溶液中,进而通过常规方法得到分离^[20-21]。后续的DNA和激素检测均验证了这一策略的可行性。

羽毛中的DNA含量很低,在后续的PCR扩增中对外源性污染十分敏感^[30]。羽毛是多级分支的复杂结构,包括羽轴两侧着生的羽枝、羽枝两侧着生的羽小枝、羽小枝上着生的纤刺、小钩和腹齿等,且数量极多^[31],可附着大量微生物和外源性细胞等污染源。因此,在样本的预处理阶段,DH-CoEx使用2%的SDS溶液浸泡羽翎样本30 min,利用其阴离子表面活性剂的特性,有效去除羽翎上附着的污染物。当然也有其他羽毛清洗方法,如使用有机溶剂(如氯仿和甲醇混合溶液、氯仿及乙醚)、碱性溶液(如氢氧化钾、氢氧化钠)等^[32-38],笔者认为2%的SDS溶液处理30 min虽然时间稍长,但清洗效果较为理想,且操作比较简便。

3.2 DH-CoEx的实用性

在完全角化的材料中,mtDNA虽也受到严重降解,但其总拷贝数较多,因此采用PCR扩增和分析角化材料中的mtDNA片段早已是轻而易举的工作^[1,39]。用DH-CoEx从5 mg羽翎中提取的总DNA中,mtDNA的拷贝数在10⁴数量级,且并未受鸟类体型的影响($P = 0.112$,图2A),以及脱落时间的明显影响($P = 0.442$,图2B)。绿孔雀的尾上覆羽为松散的羽枝,用DH-CoEx提取DNA可以扩增196~416 bp

的片段。但笔者未对更长的片段进行尝试,因此416 bp并不是其最长度。丹顶鹤羽翎较为紧实,从中获得的DNA可以扩增1350 bp的mtDNA片段,这也只是测试的最长片段,而不是其最大限度。无论怎样,DH-CoEx从完全角化的羽毛中提取的DNA既包括短片段,也包括长片段,可用于广泛的mtDNA分析。

在羽毛的角化进程中,发生了大量的基因组降解^[9],从羽翎中获得的nuDNA高度碎片化,且产量极低。因此,角化材料的核基因分析成为生态研究的挑战。使用DH-CoEx从松散型羽翎(绿孔雀尾上覆羽)、紧致型羽翎(丹顶鹤廓羽)和小型鸟(栗鹀和小鹀)的羽毛中提取DNA,均可用于微卫星分型,但分型效果受3种因素影响:一是扩增片段的长度,当长度<150 bp时,成功率可达98.41%~100.00%,当扩增片段长度为150~<200 bp时,成功率为96.21%~100.00%,当扩增片段≥200 bp时,则为95.59%~100.00%(表3);二是受羽毛类型的影响,大型鸟类的羽毛微卫星信号峰高显著高于小型鸟类($P = 0.012$,图3A);三是受羽毛新鲜程度的影响。新鲜羽毛样本的成功率极显著高于陈旧羽毛样本($P < 0.0001$,图3B)。无论怎样,在所有79份样本的28个微卫星位点分析中,均未检测到等位基因扩增丢失,表明在200 bp以下的nuDNA扩增是完全可行的。在实践中,如果采用DH-CoEx提取DNA,选择<150 bp的微卫星标记,羽翎的利用是完全可行的。

此外,DH-CoEx从羽翎中获取的糖皮质激素(皮质醇)在绿孔雀、丹顶鹤、栗鹀和小鹀样本中分别为

20.76 ~ 95.70 ng/mg (34.645 ~ 159.506 ng/mL)、44.82 ~ 93.78 ng/mg (74.690 ~ 156.272 ng/mL)、24.96 ~ 100.32 ng/mg (41.609 ~ 167.216 ng/mL) 和 27.96 ~ 94.38 ng/mg (46.584 ~ 157.267 ng/mL), 均显著高于 Koren *et al.* [40] 采用自动固相萃取系统提取的水平 (0.004 4 ~ 0.075 5 ng/mg)。这可能得益于本研究使用了大量的蛋白酶K和高浓度DTT, 把角蛋白完全裂解, 使激素得以充分释放。同时, 先行加入异丙醇进行萃取, 也确保了在提取DNA的同时, 使激素得到有效保留。笔者发现, 鸟类体型大小、羽毛新鲜程度对激素提取无显著影响(图4), 说明DH-CoEx在羽毛激素研究中具有广泛的适用性。

然而, 受工作量限制, 本研究仅采用少数物种、少数羽毛类型和脱落时间较短的羽毛, 所做的各项检测和比较也较为简单, 但也基本涵盖不同大小、不同紧致程度和不同脱落时间等条件, 特别是以覆羽和廓羽等野外最常见的羽毛类型为主要研究对象, 具有较好的代表性。实测结果证明, DH-CoEx是一种简洁高效的技术, 能在角化材料中同时提取总DNA和糖皮质激素, 可为mtDNA、微卫星等分子标记分析以及应激激素检测提供支持, 这一方法显著提高了羽毛的研究和应用价值。毛发、角、蹄、蛇蜕、龟甲、爪和鳞甲等其他角化材料在本研究中并未涉及, 但其基本属性与羽毛一致, 也可成为DH-CoEx的潜在应用对象。

参考文献:

- [1] RUDNICK J A, KATZNER T E, BRAGIN E A, *et al.* Species identification of birds through genetic analysis of naturally shed feathers [J]. *Molecular Ecology Notes*, 2007, 7(5): 757-762.
- [2] GRIFFITHS R, TIWARI B. Sex of the last wild Spix's macaw [J]. *Nature*, 1995, 375: 454.
- [3] RUDNICK J A, KATZNER T E, BRAGIN E A, *et al.* Using naturally shed feathers for individual identification, genetic parentage analyses, and population monitoring in an endangered eastern imperial eagle (*Aquila heliaca*) population from Kazakhstan [J]. *Molecular Ecology*, 2005, 14(10): 2959-2967.
- [4] RUDNICK J A, KATZNER T E, BRAGIN E A, *et al.* A non-invasive genetic evaluation of population size, natal philopatry, and roosting behavior of non-breeding eastern imperial eagles (*Aquila heliaca*) in central Asia [J]. *Conservation Genetics*, 2008, 9(3): 667-676.
- [5] SEGELBACHER G, HÖGLUND J, STORCH I. From connectivity to isolation: genetic consequences of population fragmentation in capercaillie across Europe [J]. *Molecular Ecology*, 2003, 12(7): 1773-1780.
- [6] DE VOLO S B. Genetic studies of northern goshawks (*Accipiter gentilis*): genetic tagging and individual identification from feathers, and determining phylogeography, gene flow and population history for goshawks in north America [D]. Colorado: Colorado State University, 2008.
- [7] SEKI S I. Application of molted feathers as noninvasive samples to studies on the genetic structure of pigeons (Aves: Columbidae) [J]. *Journal of Forest Research*, 2006, 11(2): 125-129.
- [8] CHEN C F, FOLEY J, TANG P C, *et al.* Development, regeneration, and evolution of feathers [J]. *Annual Review of Animal Bio-science*, 2015, 3: 169-195.
- [9] OLSEN M E, BENGTSOON C F, BERTELSEN M F, *et al.* DNA from keratinous tissue: part II: feather [J]. *Annals of Anatomy*, 2012, 194(1): 31-35.
- [10] WHITAKER J P, COTTON E A, GILL P. A comparison of the characteristics of profiles produced with the AMPFISTR® SGM Plus™ multiplex system for both standard and low copy number (LCN) STR DNA analysis [J]. *Forensic Science International*, 2001, 123(2/3): 215-223.
- [11] 涂政, 陈松, 李万水, 等. 脱落毛发及毛干DNA的STR分型研究 [J]. *刑事技术*, 2011(5): 3-7.
TU Z, CHEN S, LI W S, *et al.* STR genotyping of tolegen hairs and hair shafts [J]. *Forensic Science and Technology*, 2011(5): 3-7.
- [12] 邓建强, 刘宝琴, 蔡继峰, 等. 两种全基因组扩增技术对单根毛发DNA检验效能的研究 [J]. *中国热带医学*, 2012, 12(4): 389-392.
DENG J Q, LIU B Q, CAI J F, *et al.* The value of two whole genome amplification protocols for single shed hair genotyping [J]. *China Tropical Medicine*, 2012, 12(4): 389-392.
- [13] 陈松, 胡兰. 低拷贝模板STR分型及其存在的问题 [J]. *中国法医学杂志*, 2003, 18(5): 314-316.
CHEN S, HU L. STR typing of low copy template and its existing problems [J]. *Chinese Journal of Forensic Medicine*, 2003, 18(5): 314-316.
- [14] DAVENPORT M D, TIEFENBACHER S, LUTZ C K, *et al.* Analysis of endogenous cortisol concentrations in the hair of rhesus macaques [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2006, 147(3): 255-261.
- [15] HENDERSON G L. Mechanisms of drug incorporation into hair [J]. *Forensic Science International*, 1993, 63(1/2/3): 19-29.
- [16] KOREN L, MOKADY O, KARASKOV T, *et al.* A novel method using hair for determining hormonal levels in wildlife [J]. *Animal Behaviour*, 2002, 63(2): 403-406.
- [17] FREEMAN N E, NEWMAN A E M. Quantifying corticosterone in feathers: validations for an emerging technique [J]. *Conservation Physiology*, 2018, 6(1): coy051.
- [18] WAGNER A, SILVA-SANTOS A R, ROSA S S, *et al.* Primary purification of plasmid DNA using differential isopropanol precipitation [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2021, 2197:

- 151-165.
- [19] 郑作新. 中国鸟类系统检索[M]. 3版. 北京: 科学出版社, 2002.
- ZHENG Z X. Systematic retrieval of birds in China [M]. 3rd ed. Beijing: Science Press, 2002.
- [20] 孙利东, 许秀丽, 袁飞, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定牛奶和鸡肉中4种激素本底值[J]. 食品科学, 2017, 38(22): 291-297.
- SUN L D, XU X L, YUAN F, *et al.* High performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of background values of 4 hormones in milk and chicken [J]. Food Science, 2017, 38(22): 291-297.
- [21] 张再永, 马俊美, 李强, 等. 通过式固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法测定猪肉和牛肉中9种类固醇激素[J]. 肉类研究, 2020, 34(7): 58-63.
- ZHANG Z Y, MA J M, LI Q, *et al.* Determination of 9 steroid hormones in pork and beef samples by filtration solid phase extraction-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Meat Research, 2020, 34(7): 58-63.
- [22] NGATIA J N, LAN T M, MA Y, *et al.* Distinguishing extant elephants ivory from mammoth ivory using a short sequence of cytochrome *b* gene [J]. Scientific Reports, 2019, 9: 18863.
- [23] 樊翠平. 中国圈养白头鹤及丹顶鹤种群遗传多样性分析[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2017.
- FAN C P. Genetic diversity of the hooded crane and the red-crowned crane in China in captivity[D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2017.
- [24] 杜焯瑜. 绿孔雀种质纯度鉴定技术研究及圈养种群遗传多样性分析[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2020.
- DU H Y. A study of genetic purity inference of green peafowl and an analysis of genetic diversity of captive population [D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2020.
- [25] 樊亚楠. 黑顶麻雀婚外配行为及其发生机制[D]. 兰州: 兰州大学, 2017.
- FAN Y N. Extra-pair copulation behavior and mechanism in the saxaul sparrow (*Passer ammodendri*) [D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2017.
- [26] LIU C S J, HULCE D, LI X, *et al.* GeneMarker[®] genotyping software: tools to increase the statistical power of DNA fragment analysis [J]. Journal of Biomolecular Techniques, 2011, 22 (Suppl. 1): S35-S36.
- [27] ABEDI E, TORABIZADEH H, ORDEN L. Enhancement of alpha-amylase's stability and catalytic efficiency after modifying enzyme structure using calcium and ultrasound [J]. Food and Bioprocess Technology, 2024, 17(6): 1546-1562.
- [28] DE VOLO S B, REYNOLDS R T, DOUGLAS M R, *et al.* An improved extraction method to increase DNA yield from molted feathers [J]. The Condor, 2008, 110(4): 762-766.
- [29] GHOLIB, NUGRAHA T P, AGIL M, *et al.* Faecal glucocorticoid measurement as indicator stress in wild crested macaques (*Macaca nigra*): the importance of validation and sample processing techniques [C]//HASAN B, ANTHONY K, SHABRI A M M, *et al.* The 4th annual international conference Syiah Kuala University (AIC-Unsyiah) 2014 in conjunction with the 9th annual international workshop and expo on sumatra tsunami disaster and recovery (AIWEST-DR), proceedings: social science. Banda Aceh: Syiah Kuala University, 2014: 167-172.
- [30] VAN OORSCHOT R A, BALLANTYNE K N, MITCHELL R J. Forensic trace DNA: a review [J]. Investigative Genetics, 2010, 1(1): 14.
- [31] 胡诗佳, 王利利, 彭建军. 鸟羽显微鉴定技术及应用的研究及展望[J]. 四川动物, 2008, 27(4): 699-702.
- HU S J, WANG L L, PENG J J. Progress in microscopical identification of bird feather [J]. Sichuan Journal of Zoology, 2008, 27(4): 699-702.
- [32] HOBSON K A, BAIRLEIN F. Isotopic fractionation and turnover in captive garden warblers (*Sylvia borin*): implications for delineating dietary and migratory associations in wild passerines [J]. Canadian Journal of Zoology, 2003, 81(9): 1630-1635.
- [33] CHEREL Y, HOBSON K A, BAILLEUL F, *et al.* Nutrition, physiology, and stable isotopes: new information from fasting and molting penguins [J]. Ecology, 2005, 86(11): 2881-2888.
- [34] NORRIS D R, MARRA P P, KYSER T K, *et al.* Tracking habitat use of a long-distance migratory bird, the American redstart *Setophaga ruticilla*, using stable-carbon isotopes in cellular blood [J]. Journal of Avian Biology, 2005, 36(2): 164-170.
- [35] WUNDER M B, KESTER C L, KNOPF F L, *et al.* A test of geographic assignment using isotope tracers in feathers of known origin [J]. Oecologia, 2005, 144(4): 607-617.
- [36] HOBSON K A, ALISAUSKAS R T, CLARK R G. Stable-nitrogen isotope enrichment in avian tissues due to fasting and nutritional stress: implications for isotopic analyses of diet [J]. The Condor, 1993, 95(2): 388-394.
- [37] NATSUMEDA T, SAKANO H, TSURUTA T, *et al.* Immigration of the common cormorant *Phalacrocorax carbo hanedae* into inland areas of the northern part of Nagano Prefecture, eastern Japan, inferred from stable isotopes of carbon, nitrogen and sulphur [J]. Fisheries Science, 2015, 81(1): 131-137.
- [38] BEARHOP S, WALDRON S, VOTIER S C, *et al.* Factors that influence assimilation rates and fractionation of nitrogen and carbon stable isotopes in avian blood and feathers [J]. Physiological and Biochemical Zoology, 2002, 75(5): 451-458.
- [39] SPELLER C F, NICHOLAS G P, YANG D Y. Feather barbs as a good source of mtDNA for bird species identification in forensic wildlife investigations [J]. Investigative Genetics, 2011, 2: 16.
- [40] KOREN L, NAKAGAWA S, BURKE T, *et al.* Non-breeding feather concentrations of testosterone, corticosterone and cortisol are associated with subsequent survival in wild house sparrows [J]. Proceedings of the Royal Society B, 2012, 279(1733): 1560-1566.