

DNA 指纹图谱技术在动物行为学研究上的应用

梁红雁¹, 王梦军², 钟文勤²

(1. 中国医学科学院基础医学研究所, 北京 100083; 2. 中国科学院动物研究所, 北京 100080)

摘要: DNA 指纹图谱技术于 80 年代末在国外已被广泛应用于行为学尤其是动物繁殖行为学研究中, 国内在此方面的应用尚少。综述了 DNA 指纹图谱技术在动物行为学研究中的应用, 介绍了 DNA 指纹图谱的产生、实验操作方法、应用实例及其优缺点。

关键词: DNA 指纹图谱技术; 动物繁殖行为学

Applications of DNA-fingerprinting in animal behavioral ecology

LIANG Hong-Yan¹, WANG Meng-Jun², ZHONG Wen-Qin² (1. Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100083, China; 2. Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract: DNA fingerprinting was applied extensively abroad on animal behavioral research from the late of 1980's, especially on animal reproductive behavior research. But it is rarely conducted in our country. This article reviewed the appliance of DNA fingerprinting on animal behavioral research, and introduced its method, applied examples, advantages, and disadvantages, etc.

Key words: DNA fingerprinting; animal reproductive behavior

文章编号: 1000-0933(2000)03-0524-04 中图分类号: Q149, Q958.1 文献标识码: A

在研究动物求偶、交配、繁殖、育幼等行为时, 动物学家们常常感到烦恼的是有时不能准确确定动物之间的亲缘关系, 特别是当群体中存在多种交配方式(单配、一雄多雌、一雌多雄、混交)时, 从而影响了对某些行为做出合理的解释或假说。最近几十年来, 生物化学和分子生物学技术得到了蓬勃发展, 开始应用于动物行为学研究领域, 取得了显著成绩。最初采用的是蛋白电泳技术。Birdsall 等为了搞清楚雌性拉布拉多白足鼠(*Peromyscus maniculatus*) 在动情期是否与一个以上的雄性白足鼠交配的问题, 采用了蛋白电泳技术。他们活捉孕鼠, 取血样, 然后待其生产后, 取一窝所有幼鼠的血样。血蛋白电泳图谱表明, 大约 10% 的雌白足鼠在交配期有一个以上的配偶。电泳结果验证了对白足鼠交配行为的观察记录。

同样用血蛋白电泳技术, 一些学者发现猕猴(*Macaca mulatta*) 群间存在大量的基因流动(Gene flow), 可能归因于雄猴在青春期即从出生群迁出, 加入别的群, 为这个群增加新的基因内容; 另外, 猕猴近亲交配频率非常低。这些实验结果与行为观察结果完全一致。

随着人们对自身的遗传背景的探索深入发展, 科学家们发现人基因组中的一些区域在群体中变化极大, 具有明显多态性。第一个这样的区域是由 Wyman 和 White^[1] 偶然发现的。接着在某些基因旁边, 几个不同的高可变区域也很偶然地被发现了。在这些区域, 有一种很短的末端重复的卫星 DNA (Minisatellite DNA) 片段, 重复多次, 不同的人重复次数都不同(除非同卵双生), 由此产生多样性。不同的卫星 DNA 都有一个共同的长度为 10~15 个碱基对的核心序列(Core sequence), 可能是重组信号, 保守序列^[2]。按照这个核心序列的末端重复序列制备的探针(Probe), 果然在人和许多脊椎动物如猫、狗、小鼠等中都检测到了许多高可变的 DNA 片段。这些片段散布于整个基因组中。它们的多变性是一一对一的, 就象人的指纹一样,

基金项目: 国家“九五”攻关项目(96-005-01-06)、国家基金重点项目(39730090)、国家科学基金项目(39870136)资助

收稿日期: 1999-09-24 修回日期: 1999-09-30

作者简介: 梁红雁(1970~), 博士, 助理研究员。

万方数据

人与人之间没有完全一样的,可以据此识别个体。这样就诞生了 DNA 指纹图谱(DNA fingerprinting)技术。另外,科学家们还发现任何一个个体的 DNA 片段图谱都遵循经典孟德尔遗传规律,各有一半遗传自父母。因此 DNA 指纹图谱技术可以帮助人们确定个体之间在生物系统上的关系,有非常高的准确性^[3]。

1 DNA 指纹图谱技术的操作过程

从组织中提取纯化基因组 DNA,用某种限制性内切酶切割 DNA 成许多不同长度的小片段。在电泳作用下,DNA 不同长度的片段被分离开。电泳凝胶上的 DNA 片段被转移至尼龙膜,放射性标记的探针与尼龙膜上的 DNA 片段杂交,放射自显影。胶片上每一泳道代表一个体,每一泳道上显影的片段数目、大小与其他泳道上的相比,既有相似处,又有不同处。这样一张图谱就是 DNA 指纹图谱。通过比较图谱的相似和不同以及统计学分析,就可以确定出个体之间的关系。例如,一个个体的 DNA 片段图谱与所有可能是他的父母的图谱比较,可能找到他的亲生父母。

与蛋白电泳相比,DNA 指纹图谱的准确性更高,因为 DNA 片段多样性产生的图谱数目远远大于在某一位置上的不同等位基因的数目。所以越来越多的动物学家开始采用 DNA 指纹图谱技术来核实某些假说或揭示动物某些行为之谜。实验中常用的探针来自 Jeffreys 等人^[4]构建的 M13 噬菌体亚克隆,如探针 33.15、33.5 和 33.6。这些探针虽然来自人的基因组,但也能够在其他物种的基因组中检测到 DNA 高可变区,证明了物种间的某些相似性。

2 DNA 指纹图谱技术在动物行为学研究中的应用

2.1 从 1979 年开始,Wetton^[5]的实验小组就在 Brackenhurst 农学院附近的农田中研究家麻雀(*Passer domesticus*)的行为。他们将成鸟的翅膀染色以区分个体。观察它们的交配行为以及雄鸟帮助孵化及哺育后代的亲仔行为等情况。1985 年 1986 年间,他们选择了两个家族用 DNA 指纹图谱技术帮助分析亲缘关系。第一个家庭中的雄鸟 A 1985 年期间与雌鸟 B 交配,产雏鸟 B1-B3,接下来的 1986 年它先后与雌鸟 C、D、E 交配,产雏鸟分别为 C1-C2、D1-D4、E1-E3。酶蛋白电泳分析认为亲子代之间没有发生错配的情况,也就是说每一次交配都是单交的。已知家麻雀至少有 38 对染色体,没有或者很少发生连锁。同人一样,家麻雀的卫星 DNA 表型也极具多变性。探针 33.6 杂交产生的 DNA 指纹图谱上,两个个体之间的相似百分率(Percentage similarity) $D = 2N_{AB} / (N_A + N_B)$,其中 N_A 指个体 A 拥有的片段总数, N_B 指个体 B 拥有的片段总数, N_{AB} 指两个个体共有的片段数目。 D 值范围为 0~1, $D=0$ 时,两个个体没有一条相同的片段; $D=1$ 时,两个个体完全一样。这个统计方法虽然比较粗糙,但非常适用,而且很简单。当群体杂合性很高,即很少发生连锁遗传时,第一代血亲间 D 约等于 0.5,第二代血亲间 D 约等于 0.25,依此类推。上面这个家族中雄鸟 A 与所有雏鸟的 D 值都约等于 0.5,而雌鸟只与自己所产的雏鸟之间的 D 值约等于 0.5,与其他雏鸟的 D 值都小于 0.25。亲缘关系一清二楚。第二个家庭的情况就比较复杂了。1985 年雄鸟 A 与雌鸟 B 交配产仔 C~F。第二年,A 飞走了,B 和 C(它的子代)成为配偶,B 产仔两次,第一次为 G,第二次是 H 和 I。这样,这个家庭中不仅存在乱伦现象,而且发现原始亲代 A 和 B 的图谱就比较类似,可能存在未知的早先几代的近交,使得结果很复杂。子代 C-F 与 A、B 的 D 值平均值分别为 0.616 和 0.512。B 和它的 3 个子代 G、H、I 的 D 值分别是 0.415、0.776 和 0.766。后两个数值显著高出 B 与 C~F 的 D 值范围,这个结果与乱伦交配的性质相符。另外一个数值相对较低,提示 G 可能不是乱伦的后代。G、H、I 与 C 的 D 值分别为 0.367、0.622 和 0.651,同样暗示 C 可能不是 G 的父亲。另外还发现 G 有某些片段是 C 所缺乏的。检测计算在这个家族附近的另外 8 家的雄鸟与 G 的 D 值,发现其中 7 个小于 0.25,只有雄鸟 J 与 G 的 D 值是 0.723,J 的巢紧挨着这个家族,G 的所有片段不是来自 B 就是来自 J,因此 G 是 B 和 J 之间配偶外交配产生的后代。Wetton 等人的工作证实了 DNA 指纹图谱技术对于研究野生鸟类的行为学、群体遗传学和生物统计学是一个极好的开拓性工具。

Burke 和 Bruford^[6]指出许多鸟类中存在配偶外交配,但用传统方法无法进行定量分析。自从 DNA 指纹图谱技术出现后,只要发现雏鸟的某些片段不存在于其他所谓的两个亲代中,就能得出发生配偶外交配结论。 万方数据

1989 年,Burke 等人^[7]在英国剑桥大学的植物园中,观察约 80 只林岩鹀(*Prunella modularis*)整个繁

殖期的活动。林岩鹳群体中存在多种交配方式,一窝雏鸟常常有一个以上的父亲。他们想知道雄鸟能否分辨出哪些雏鸟是自己的后代。DNA 指纹图谱结果表明,雄鸟不能准确认出自己的后代。因为它有时帮忙抚养的窝中并没有它自己的后代。那么雄鸟为了提高自己的繁殖成功率,会依据什么原则实施帮忙行为呢?观察发现,对于交配期它们接触较多的雌鸟的后代,它们会花较多的时间给予帮助。

2.2 DNA 指纹图谱技术还用于研究野生哺乳类的性选择、交配行为和数量统计学。Gilbert 的研究组^[8]认为由于个体基因组进化较快,DNA 指纹图谱不能在长时间繁衍后提供可靠信息,所以无法用于群体水平上的比较,但在地理隔离的群体中,DNA 指纹图谱的稳定性一面会超过其多变性的一面,从而可以用群体间的 DNA 指纹图谱的差异来估算遗传相关度,建立群体的进化关系。他们观察研究了 6 个海峡小岛上的加州灰狐(*Urocyon littoralis*)群体。用平均百分比差异(APD)表示狐狸群体内的 DNA 指纹图谱的可变性。DNA 指纹图谱上两个个体间不同的片段的数目占两个个体拥有的全部片段数目的比率等于个体间的差异值 D 。每个群体的 APD 等于群体内所有个体间的 D 值的平均值,群体间的 APD 等于任何两个群体个体间的 D 值的平均值。脊椎动物的远交群体的 APD 值一般是 70%~90%,而岛内的狐狸群体的 APD 值是 0.0%~25.3%,岛间群体间的 APD 值是 43.8%~84.4%。这样在小的地理隔离的群体中,利用 DNA 指纹图谱技术可以确定某个个体属于哪个群体。如果采用蛋白电泳技术,因为蛋白水平进化较慢,紧密相关的群体经常因为太相近而不能区分。哺乳动物的线粒体基因组比核基因组进化快 5~10 倍,线粒体 DNA 遗传标记能够有效地用于建立群体的种系发生历史,但是不能提供关于核基因可变性和流动范围的信息。Gilbert 等人的实验表明,DNA 指纹图谱技术是估算群体相关遗传可变性、分析群体种系发生的简易方法。

有些关于动物行为的解释以前认为是正确的,在采用 DNA 指纹图谱技术后,发现需要给予修正。如纹背曲嘴鹳(*Campylorhynchus nuchalis*),以前认为它的群体中虽然有多只成年雄鸟和雌鸟,但只有占优势地位的雄鸟和雌鸟才交配产仔,其他成年鹳处于辅助地位。Rabenold 等人^[9]的实验结果显示其实不然。处于辅助地位的雄鸟有时也会交配繁殖,而雌鸟则不。这也帮助解释了为什么雄鸟会长期安于辅助地位,而雌鸟却为争夺繁殖地位而频繁发生战斗。

2.3 另一个凭借 DNA 指纹图谱技术研究动物合作行为的实验是 Packer 等人^[10]做的关于非洲狮的调查。一个狮群一般有 2~9 只成年雌狮及其未成年子女和外来的 2~6 只成年雄狮。雌狮总是紧密相关的近亲联合,雄狮的联合或者紧密相关或者不相关,交配伴侣通常非近亲。 n 只成年雄狮占据某个狮群后,杀死或驱逐群中的幼狮,几天内雌狮就与新来的雄狮建立起性接受关系,不存在群外交配。所生子女抚养到能够独立生活,其中 2/3 的雌性会留下来,剩下的雌性将一起在附近成立一个新群,而雄性几乎全部离开,四处游荡一段时期后,加入别的狮群。雄狮一般都是近亲联合,只有在特异条件下,不相关的雄狮才会组成联合体占据某一狮群,这一联合体通常较小。大的联合全由近亲组成,其中有的雄狮是不繁殖的,帮助照料幼狮,虽然没有提高自己的繁殖成功率,但帮助保存了基因。

高地草原犬鼠(*Cynomys gunnisoni*)的社会系统随食物资源分布的变化而变化,Travis 等人^[11]试图了解犬鼠的群体密度对其社会系统和个体交配策略的影响。利用 DNA 指纹图谱技术,他们发现群体密度低时,配偶的遗传背景非常相似,也就是所谓近亲交配,群体密度高时,配偶的遗传相似性很小,证明是远交。

2.4 DNA 指纹图谱技术还用于分析鲸类(*Globicephala balaena*)、美洲黑熊(*Ursus americanus*)^[12]和黑水鸡(*Gallinula chloropus*)^[13]群体中个体之间的亲缘关系,但由于技术问题,在小哺乳动物的研究上有一定困难,例如很难做到不伤害小哺乳动物的性命而取得足够量的 DNA。Faulkes 和 Abbott^[14]发现裸鼯鼠(*Heterocephalus glaber*)的 DNA 指纹图谱可变性很小的实验就是处死裸鼯鼠取其脾脏而完成的。1991 年,Hoagland 等人^[15]采取心脏穿刺取血(100~150ml)的方法第一次成功地将 DNA 指纹图谱技术应用于活体研究小哺乳动物棕腹田鼠(*Microtus ochrogaster*),获得的 DNA 量足够分析之用。

3 结语

十多年来,分子生物学 DNA 指纹图谱技术已经成为动物学家们在行为学尤其是动物交配行为学研究领域中强有力的工具,与之相关的研究方法包括随机限制性片段长度多态性(Random restriction fragment length

polymorphisms, RFLPs)、性连锁的 Y 染色体的标记和线粒体 DNA 的分析^[6]。这 4 种方法涉及的侧重点不同,各有利弊。对于大多数生态学家来说,研究中采用 DNA 技术,费用会比较昂贵,但是 DNA 方法所获得的数据对于完善实验结果是物有所值的。世界上不存在绝对的事物,DNA 指纹图谱技术虽然可靠性和准确性程度很高,但由于生物的遗传背景非常复杂,不能完全依赖于 DNA 指纹图谱结果来下结论,还要结合行为观察和其他生态学数据的分析,才能较好地发挥 DNA 指纹图谱技术的作用。

参考文献

- [1] Wayman A and White R. A highly polymorphic locus in human DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, **77**: 6754~6758.
- [2] Jeffreys A J, Wilson V, Kelly R, *et al.* Mouse DNA 'fingerprints': analysis of Chromosome localization and germline stability of hypervariable loci in recombinant inbred strains. *Nucleic Acids Research*. 1987, **15**: 2823~2836.
- [3] Drickamer J C, Vessey S H and Meikle D. Behavior genetics and evolution. In: *Animal Behavior Mechanism Ecology Evolution* 4th Wm. C. Brown Publisher, 1996, 74~78.
- [4] Jettreys A J, Wilson V and Thein S L. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature*, 1985, **314**: 67~73.
- [5] Wetton J H, Carter R E, Parkin D T, *et al.* Demographic study of a wild house sparrow population by DNA fingerprinting. *Nature*, 1987, **327**: 147~149.
- [6] Burke T and Bruford M W. DNA fingerprinting in birds, *Nature*, 1987, **327**: 149~152.
- [7] Burke T, Davies N B, Bruford M W, *et al.* Parental care and mating behaviour of polyandrous dunnocks *Prunella modularis* related to paternity by DNA fingerprinting. *Nature*, 1989, **338**: 249~251.
- [8] Gillbert D, Lehman N, O'Brien S J, *et al.* Genetic fingerprinting reflects population differentiation in the California Channel Island Fox. *Nature*, 1990, **344**: 764~766.
- [9] Rabenold P P, Rebenold K N, Piper W H, *et al.* Shared paternity revealed by genetic analysis in cooperatively breeding tropical wrens. *Nature*, 1990, **348**: 538~540.
- [10] Packer C, Gilbert D A, Pusey A E, *et al.* Molecular genetic analysis of kinship and cooperation in African lions. *Nature*, 1991, **351**: 562~568.
- [11] Travis S E, Slobodchikoff C N and Keim P. Ecological and demographic effects on intraspecific variation in the social system of prairie dogs. *Ecology*, 1995, **76**(6): 1794~1803.
- [12] Schenk A, Kovacs K M. Multiple mating between black bears revealed by DNA fingerprinting. *Aimm. Behav.* 1995, **50**: 1483~1490.
- [13] McRae S B Burke T. Intraspecific brood parasitism in the moorhen: parentage and parasite-host relationships determined by DNA fingerprinting. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 1996, **38**: 115~129.
- [14] Faulkes C G Abbott D H. Investigation of genetic diversity in wild colonies of naked mole-rats (*Heterocephalus glaber*) by DNA fingerprinting. *J. Zool. Lond.* 1990, **221**: 87~97.
- [15] Hoagland D B, Tilakaratne N, Weaver R F, *et al.* "DNA fingerprinting" of prairie voles (*Microtus ochrogaster*). *J. Mamm.* 1991, **72**(2): 422~426.