

文章编号: 0529-6579 (1999) 01-0111-114

猕猴属种间及亚种间 RAPD 分析^{*}

黄 韧¹, 陈 琛¹, 马昭林², 梁兴林²

(¹广东省实验动物监测所, 广州 510260; ²华南濒危动物研究所)

摘 要: 应用 RAPD 技术分析了猕猴属 (*Macaca*) 种间和亚种间 6 个分类群之间的遗传多态性, 共筛选出 16 个随机引物每个分类群平均获得 77 个遗传标记, 根据遗传距离构建了系统发育进化树, 结果显示从 RAPD 数据分析得到的 6 个分类群的相互关系与形态、同功酶、mt-DNA 的研究结果基本一致, 表明 RAPD 技术适用于猕猴属中近缘种间和亚种间的分类分析。

关键词: 猕猴属 (*Macaca*), RAPD 分析, 遗传多态性

分类号: Q 959.848, Q 7 **文献标识码:** A

猕猴属 (*Macaca*) 隶属灵长目猴科, 生长于非洲及亚洲东南亚地区的大陆与岛屿, 有广泛的地理分布亚种, 曾应用 RAPD 方法对原猴目种间进行亲缘鉴定^[1]。有关猕猴属种间的亲缘关系, 在形态水平、蛋白质和同功酶及线粒体 DNA 水平上均有报道。Delson^[2] 和 Fooden^[3] 根据形态学、解剖学以及地理学资料, 将猕猴属至少分为 3 个组, 即 Fascicularis 组 (包括食蟹猴, 恒河猴), Silenus 组 (包括平顶猴) 和 Sinica 组 (包括短尾猴)。同功酶和 mt-DNA 研究结果与形态分类的争议主要在于 Fascicularis 组内部各种间的关系^[4]。血液生化研究表明猕猴属中遗传距离仅为 0.138 5^[5], 亦难以进行有效分类, 迄今为止对猕猴属的系统关系的研究未见有关 RAPD 的报道。本文采用 RAPD 技术检测了猕猴属中 6 个分类群基因组 DNA 的遗传多态性, 并构建了系统发育树状图。

1 材料和方法

1.1 材 料

食蟹猴 2 个亚种: 越南食蟹猴 (*Macaca fascicularis* (Vietn.)) 和菲律宾食蟹猴 (*M. fascicularis* (Phil.))。恒河猴 2 个亚种: 海南猕猴 (*Macaca mulatta brevicaudus*) 和指名猕猴 (*M. m. mulatta*); 平顶猴 (*M. nemestrina*), 短尾猴 (*M. arctoides*) 各分类群的静脉血均取自华南濒危动物养殖场, 其采样个数和性别见表 1。

1.2 方 法

1.2.1 血样 DNA 的制备 静脉抽取全血 5 mL, 加少量肝素抗凝, 4 °C 静置 24 h 使之分层, 取红细胞上层的白细胞至 1.5 mL 离心管, 加入 $V(\text{样品}) : V(\text{MLB}) = 2 : 1$, $3 \times \text{MLB}$ (30

* 收稿日期: 1998-10-15 第一作者简介: 黄韧, 男, 39 岁, 副研究员; 陈琛现在深圳康泰生物制品有限公司工作

表 1 用于 RAPD 分析的分类群

Tah 1 Taxa used in RAPD analysis

编号	种名	拉丁名	个体数
1	越南食蟹猴 <i>Macaca fascicularis</i> (Vietn)	6	3 雄 3 雌
2	菲律宾食蟹猴 <i>M. fascicularis</i> (Phil)	4	1 雌
3	海南猕猴 <i>M. mulatta brevicaudus</i>	2	1 雄 1 雌
4	指名猕猴 <i>M. mulatta mulatta</i>	4	1 雌
5	平顶猴 <i>M. nemestrina</i>	4	1 雄 3 雌
6	短尾猴 <i>M. arctoides</i>	1	1 雌

mmol/L Tris-HCl, pH 8.0; 30 mmol/L EDTA, pH 8.0; 0.3 mol/L NaCl; $\rho=6\%$ SDS; 60 mg/mL 蛋白酶 K; 1.8 mg/mL DTT) 混匀, 于 55℃保温 5 min, 然后加入等体积 Tris 饱和酚抽提, 5 000 r/min 离心 5 min, 水相再用 V (苯酚) / V (氯仿) = 1/1 抽提 1 次, 无水乙醇沉淀 DNA, 适量 TE 溶解, -20℃保存备用.

1.2.2 DNA 的纯化 采用原平公司生产的“Glass-milk Kit”纯化 DNA.

1.2.3 随机引物 用于本实验的随机引物为 Operon 公司生产的 Q、R 和 S 3 组共 60 个寡核苷酸引物, 其中筛选出可用于 RAPD 分析的引物为 16 个 (表 2). 引物编号及序列参照 Operon 公司的引物 Kit.

表 2 引物序列

Tah 2 Primers sequence

引物名称	序列(5'-3')	引物名称	序列(5'-3')	引物名称	序列(5'-3')	引物名称	序列(5'-3')
Q-04	AGTGGCTGA	Q-11	TCTCCGCAAC	R-10	CCATTCCCA	S-06	GATACCTCGG
Q-05	CCGCTCTTG	Q-14	GGACGCTTCA	R-12	ACAGGTGCGT	S-07	TCCGATGCTG
Q-06	GAGCGCCTTG	Q-17	GAAGCCCTTG	R-16	CTCTGCGCGT	S-11	AGTCGGGTGG
Q-07	CCCCGATGGT	R-09	TGAGCACGAG	R-18	GGCTTTGCCA	S-13	GTCGTTCTGT

1.2.4 RAPD-PCR 扩增 20 mL 反应液中包含: 10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.3, 5 mmol/L KCl, 5 ng 基因组 DNA, 8 ng 随机引物, 200 mmol/L dNTP (A. C. G. T), 16.67×10^{-9} mol/s Tag DNA 聚合酶 (华美生物工程公司生产). 扩增用 DNA 样品: 各分类群基因组 DNA 为同一分类群的不同个体, 等量 DNA 样品混合.

PCR 扩增采用英国 TECHNE 公司生产的 GEN02VOC-E 型扩增仪. 具体程序为: 94℃变性 2 min 之后, 94℃变性 1 min, 35℃退火 1 min, 72℃延伸 2 min 45 个循环, 最后 72℃延伸 10 min, 反应前 94℃热启动 3 min, 然后加入 Taq DNA 聚合酶, 每次反应均设不含模板 DNA 的空白对照. 扩增产物在 $\rho=1.4\%$ 琼脂糖凝胶上电泳分离, 稳压电泳 10 V/cm 约 3 h, 紫外光下观察拍照.

1.2.5 数据处理 根据扩增结果计算分类群间的遗传距离. 任意 2 个分类群间遗传距离 (P) 根据 2 个分类群共享 RAPD 标记来计算^[6]: $P=1-F$, $F=2N_{xy}/(N_x+N_y)$. 其中, N_x 和 N_y 分别为第 x 和第 y 分类群拥有的 RAPD 标记数, N_{xy} 是 x 、 y 2 个分类群共享的 RAPD 数. 根据遗传距离分别用单联法和 UPGMA 法进行聚类分析, 构建关系图^[7].

2 结果和讨论

实验共采用 60 个引物对猕猴属 4 个种, 4 个亚种共 6 个分类群进行 RAPD 扩增, 其中 16 个引物在所有样品中得到了良好的结果. 扩增产物中只有那些电泳后清晰且可重复的带才选作进一步分析, 用 16 个引物扩增每个分类群平均约获得 77 条带, 图 1 列举了 OPQ-14, OPR-12 和 OPS-06 共 3 种引物扩增产物的电泳带型.

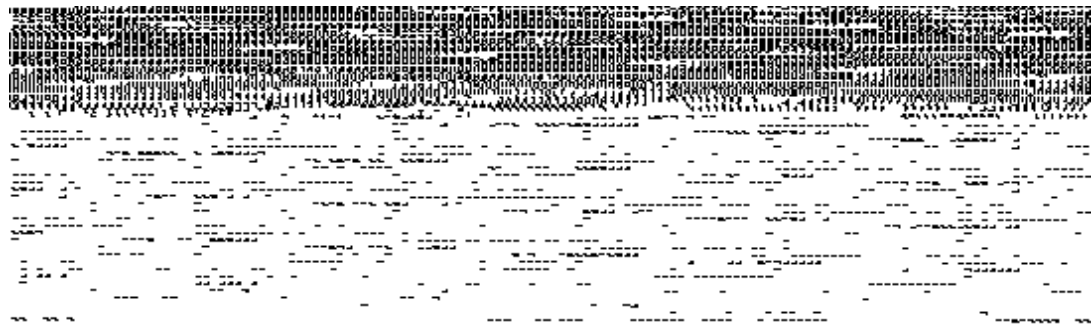
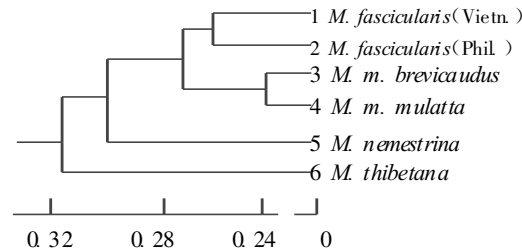


图 1 引物 OPQ-14 OPR-12, OPS-06 随机扩增猕猴属 6 个分类群基因组 DNA 产生的电泳图谱
Fig. 1 Electrophoresis patterns of random amplified genomes DNA 6 taxa from Macaques with OPQ-14 OPR-12 OPS-06
M 2 kb marker; 1 *M. fascicularis* (Vietn.); 2 *M. fascicularis* (Phil.);
3 *M. mulatta brevicaudus*; 4 *M. m. mulatta*; 5 *M. nemestrina*; 6 *M. arctoides*

根据公式计算得到 6 个分类群间的相似性系数 (F) 和遗传距离 P 距阵见表 3. 分别利用单联法和 UPGMA 法进行聚类分析得到 2 个系统关系树 (图 2).

(a) 单联法聚类



(b) UPGMA 法聚类

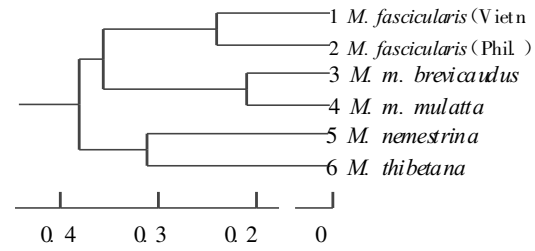


图 2 猕猴属 6 个分类群聚类图
Fig. 2 Dendrogram of 6 taxa of *Macaca*

表 3 猕猴属 6 个分类群间的距离系数
Tab. 3 Matrix of $1 - F$ values between 6 taxa of *Macaca*

	1	2	3	4	5	6
1	0					
2	0.262	0				
3	0.301	0.456	0			
4	0.270	0.412	0.248	0		
5	0.316	0.448	0.401	0.319	0	
6	0.383	0.466	0.403	0.307	0.320	0

猕猴属动物具有相同的染色体数目和形态, 大多数种甚至在染色体带型上差异也不大, 还有文献报道, 猕猴属动物种间杂交可产生后代, 表明它们的亲缘关系相当密切. 遗传距离 P 是目前分析 RAPD 标记杂合度的一个重要参数. 本实验用 RAPD 数据检测的猕猴属种间的遗传距离在 0.270 ~ 0.466 之间, 属于近缘种的范围, 这与猕猴属细胞遗传学分类的结果一致.

本文 RAPD 数据构建的系统发育树表明, 亚种间的遗传距离小于种间的遗传距离. 食蟹猴与恒河猴之间的关系比它们与平顶猴和短尾猴之间的亲缘关系近, 属于同一个组, 这与根据形态解剖资料^[4]、蛋白质和同功酶资料^[5]所得到的分类结果是相同的. 用线粒体 DNA RFLP 数据构建的系统树^[8]也与本实验得到的结论相吻合. 另外, 本文的数据虽未涉及从 DNA 的变化速率来推及猕猴种间分离时间, 但从聚类顺序的先后也可说明短尾猴的分离时间早, 平顶猴稍后, 然后才是恒河猴和食蟹猴.

单联法聚类图(图 2a)中, 与短尾猴相比, Fascicularis 组(包括食蟹猴, 恒河猴)与平顶猴之间的关系更近; 而 UPGMA 的聚类结果(图 2b)无法看出它们之间关系的远近. 由此可见, 不同的数据分析方法得到的结果具有差异. 目前在分子系统分类中采用的数据分析方法有多种, 且由于不同方法建立的前提条件不同, 因而分析得到的结果有些差异, 这是可以理解的, 但在一些情况下, 同一数据用不同方法分析的结果差别可能是非常明显的(待发表), 因此采用不同方法对数据进行比较分析时, 需要谨慎.

本文部分工作在中山大学生物工程中心进行, 得到屈良鹄教授的指导, 特此致谢

参考文献:

- [1] NEVEU H, MOTAGNON D, RUMPLER Y. Paternity discrimination in four prosimian species by the random amplified polymorphic DNA method. *Folia primatol*, 1996, 67: 157~162
- [2] DELSON E. Fossil macaques: phyletic relationships and a scenario of development. In: LINDBURG D G ed. *The macaques: studies in ecology, behavior and evolution*. New York: Van Nostrand Reinhold, 1980. 31~51
- [3] FOOD J, LANUON S M. Blood protein allele frequencies and phylogenetic relationships in macaca: a review. *American J Primatology*, 1989, 17: 209~241
- [4] JOHN E F A, DODALD G, LINDBURG D G. In *evolution and ecology of Macaques societies*. New York: Cambridge University Press, 1996. 3~19
- [5] NOZAWA K, SHOTAKE T, OHKURA Y, et al. Genetic variation within and between species of Asian macaques. *Japan J Genetics*, 1977, 52 (1): 15~30
- [6] NEI M, LI W H. Mathematical model for studying genetic distance in terms of restriction endonuclease. *Proceeding of the National Academy of Science*, 1979, 76: 5269~5273
- [7] 钟扬, 陈家宽, 黄德世. 数量分类的方法与程序. 武汉: 武汉大学出版社, 1990
- [8] 张亚平, 施立明. 猕猴属五个种 mtDNA 多态性研究. *遗传学报*, 1990, 17 (1): 23~33

RAPD Analysis of Macaques Among Species and Subspecies

*
HUANG Ren, CHEN Cheng, MA Zhaolin, LIANG Xinlin

Abstract: Genetic polymorphism of 6 taxa from Macaques (*Macaca*) is analysed by RAPD. Each taxon average gains 77 bands with 16 random primers. Dendrograms are constructed by single linkage clustering and UPGMA, respectively. The results showed that the relationship among 6 taxa generally conforms to those conclusion from morphology, isozyme, proteins and mt-DNA, which revealed that RAPD technique was applied to analysis within Macaques.

Keywords: Macaques (*Macaca*), RAPD analysis, genetic polymorphism