

香港瘰螈 eDNA 引物和 TaqMan 探针的设计与确认

杨泰昌^① 李嘉华^① 张颖^① 刘彦芹^② 袁智勇^{③*}

① 香港海洋公园环境实验室 香港; ② 香港浸会大学生物系 香港;

③ 西南林业大学生物多样性保护学院 昆明 650224

摘要: 环境 DNA (eDNA) 技术是近年来新兴的一种野外水生生物调查方法。本研究旨在设计一组香港瘰螈 (*Paramesotriton hongkongensis*) 特异的引物和 TaqMan 探针并确立此 eDNA 方法在水样中的实用性, 以期进一步调查其野外种群分布。测定 11 种瘰螈物种的线粒体细胞色素 *b* (Cyt *b*) 基因序列, 然后使用 Primer Express 3.0 软件设计引物和 TaqMan 探针。通过比对 NCBI 基因库及进行退火温度梯度测试, 验证引物和 TaqMan 探针的特异性。通过测试不同浓度的引物和 TaqMan 探针, 优化 qPCR 扩增效率。然后检测养殖不同数量香港瘰螈的水缸水体中 eDNA, 以评估已建立的 qPCR 方法灵敏度。同时, 测定香港瘰螈 eDNA 降解速度, 以估计其在水中的持续时间。实验结果显示, 本研究所设计的引物和探针只对香港瘰螈呈阳性扩增, 而对同属的其他 10 个物种均呈阴性。优化的 qPCR 效率为 93.9%、最低检测浓度为 10 DNA 拷贝数。已建立的 qPCR 方法能灵敏地检测出在养殖 1 只香港瘰螈 24 h 实验水缸水体的 DNA 拷贝数为 (13.56 ± 3.35) /ml 水样。另外, 降解实验发现, 采用 0.45 μm 孔径滤膜已有效检测香港瘰螈 eDNA 并能监测 15 d。本研究成功设计并建立了一种能在水环境中检测香港瘰螈是否存在的 eDNA 技术, 以期应用于野外考察。

关键词: 香港瘰螈; 环境 DNA; 线粒体细胞色素 *b* 基因; TaqMan qPCR

中图分类号: Q75, Q958 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263 (2020) 05-624-13

Design and Verification of Primers and TaqMan Probe Specific for *Paramesotriton hongkongensis* eDNA

YEUNG Tai-Cheong^① LEE Ka-Wa^① ZHANG Ying^① LAU Anthony^② YUAN Zhi-Yong^{③*}

① *Environmental Laboratory, Ocean Park Corporation, Hong Kong;* ② *Department of Biology, Hong Kong Baptist University, Hong Kong;*

③ *College of Forestry, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China*

Abstract: Environmental DNA (eDNA) detection method is considered as a new survey tool for the wildlife aquatic animals in recent years. To further investigate the Hong Kong newt (*Paramesotriton hongkongensis*) population distribution in the wild, we thus aimed to design a set of specific primers and TaqMan probe and

基金项目 香港海洋公园环境实验室营运基金项目;

* 通讯作者, E-mail: yuanzhiyongkiz@126.com;

第一作者简介 杨泰昌, 男, 香港海洋公园环境实验室助理经理; 研究方向: 动物保育、生物工程学; E-mail: leo.yeung@oceanpark.com.hk.

收稿日期: 2020-01-07, 修回日期: 2020-07-03 DOI: 10.13859/j.cjz.202005011

verify the feasibility of this eDNA method for water samples. The mitochondrial cytochrome *b* genes of 11 *Paramesotriton* species were sequenced, and then the primers and TaqMan probe were designed using Primer Express Software 3.0. The primers and TaqMan probe specificity were verified by comparing to the NCBI GenBank and testing with the annealing temperature gradient. The qPCR amplification efficiency was optimized by testing different concentrations of primers and TaqMan probe. Then, eDNA was detected in the water samples in aquarium tanks with different numbers of Hong Kong newt to assess the sensitivity of the established qPCR method. Also, the decay rate of Hong Kong newt eDNA was determined to estimate its lasting time in water. The results showed that the designed primers and TaqMan probe only amplified eDNA of Hong Kong newt but not the other 10 closely related newts (Table 3 and 4). The optimized qPCR achieved the efficiency of 93.9 % and the limit of detection down to 10 DNA copies (Fig. 2 and Table 5). The established qPCR method was sensitive enough to detect 13.56 ± 3.35 DNA copies/ml in the aquarium tank with 1 Hong Kong newt after housing for 24 h (Fig. 3). In addition, the decay rate experiment demonstrated that the use of 0.45 μm pore size filter membrane was effective to detect and monitor the Hong Kong newt eDNA in 15 d (Fig. 6). In this study, an eDNA detection method was successfully designed and established to detect the presence or absence of Hong Kong newt in water environments, which can be potentially utilized in the field inspection.

Key words: *Paramesotriton hongkongensis*; Hong Kong newt; eDNA; Mitochondrial cytochrome *b* DNA; TaqMan qPCR

物种的地理分布范围、物种丰富度和多度等生物学信息是物种有效保护的基础 (Gentry 1992, Miller 1994)。传统方法对这些基础信息的获取主要依赖于调查者的直接观察,这在很大程度上促进了物种生物学基础信息的积累。但是,受到调查人员专业背景和物种本身生物学特性的限制,部分生物类群的生物学信息获取的准确性和信息量很有限,例如有些两栖动物的习性是喜欢隐藏于水底 (Deiner et al. 2014),这使得调查人员很难察觉。香港瘰螈 (*Paramesotriton hongkongensis*)是香港分布的唯一蝾螈类物种 (Lau et al. 2004),它在国际自然保护联盟 (IUCN) 受胁物种红色名录中被列为近危级物种。受限于现在的观察和采样技术,截止目前,关于香港瘰螈的保护生物学信息相当有限,对它的研究也仅限于种群数量较大的香港地区 (Lau et al. 1999),而在大陆地区的分布范围和种群情况尚不清楚 (费梁等 2006, Jono et al. 2014)。

环境 DNA (environmental DNA, eDNA)

分析技术是近年来新兴的一种保护生物学的调查方法 (Farrington et al. 2014, Stewart et al. 2017, Parsons et al. 2018, Adams et al. 2019)。该方法是指在环境样品中检测目标物种遗留的皮肤、尿液、粪便、黏液中所包含的 DNA,从而鉴定该物种是否存在并评估其数量。与传统调查方法相比, eDNA 方法灵敏度高,而且无需捕获目标物种,可以更有效地保护这一物种种群及其生态环境。建立 eDNA 分析技术一般包括三个阶段: 第一,利用调查物种或种群的特异性基因识别片段制作该物种特异性的引物和探针; 第二,通过采集的环境样品获取 eDNA,通过 PCR-电泳-测序、定量 PCR、二代测序等方法去检测和获取目的基因片段的序列及相对浓度; 最后,根据所得数据来确定取样环境中该生物的分布和密度状况。

近年来,科学家已成功研发了数个蝾螈类物种的 eDNA 检测方法并进一步调查了它们在野外的分布 (Goldberg et al. 2011, Rees et al. 2014, Katano et al. 2017, Walker et al. 2017)。然

而, 到目前为止, 尚未开发出对香港瘰螈特异的 eDNA 方法。因此, 本研究旨在设计一组香港瘰螈特异的引物和 TaqMan 探针, 并确定和建立一套适用于香港瘰螈的 eDNA 技术, 以期能作为香港瘰螈物种考察和种群监测的有效方法。

1 材料与方 法

针对香港瘰螈设计一组特异的引物和 TaqMan 探针, 确定引物和探针的特异性, 使用室内实验水缸测试引物和探针的灵敏度。

1.1 设计特异引物和探针

考虑到本研究目标物种只有香港瘰螈, 因

此只需设计对该物种特异性高的引物。引物对目标物种的特异性越强, PCR 时产生非目标物种的扩增机会就越小。为了提高特异性, 同时设计 TaqMan 探针 (Smith et al. 2009)。为了保证设计的引物和探针不会与香港瘰螈亲缘关系较近的其他物种产生反应, 设计时基于瘰螈属的系统发育关系 (Yuan et al. 2014), 采用 10 种共 11 只近缘瘰螈物种的 DNA 作为假阳性样本, 以及 12 只香港瘰螈的 DNA (Lau et al. 2016) 作为阳性样本, 共计 23 个样本 (表 1)。香港渔农自然护理署提供许可证允许采集样本。

表 1 本研究中用于设计引物和 TaqMan 探针的瘰螈物种 DNA 样品及其 Cyt *b* 基因序列在 NCBI GenBank 的检索号

Table 1 DNA samples of *Paramesotriton* species used for primers and TaqMan probe design in this study and its Cyt *b* gene sequences newly deposited in NCBI GenBank with accession numbers

瘰螈物种 <i>Paramesotriton</i> species	DNA 样品 名称 DNA sample ID	样品采集地 Sample locality	GenBank 检索号 (Cyt <i>b</i> 基因) GenBank Accession no. (Cyt <i>b</i> gene)
1. 香港瘰螈 <i>P. hongkongensis</i>	PHK-HC	中国香港新界蚝涌 Ho Chung, New Territories, Hong Kong, China	MN641878
2. 香港瘰螈 <i>P. hongkongensis</i>	PHK-KP	中国香港新界九龙山 Kowloon Peak, New Territories, Hong Kong, China	MN641879
3. 香港瘰螈 <i>P. hongkongensis</i>	PHK-MTL	中国香港新界梅子林 Mui Tsz Lam, New Territories, Hong Kong, China	MN641880
4. 香港瘰螈 <i>P. hongkongensis</i>	PHK-SM	中国香港新界城门水塘 Shing Mun, New Territories, Hong Kong, China	MN641881
5. 香港瘰螈 <i>P. hongkongensis</i>	PHK-TPK	中国香港新界大埔滘 Tai Po Kau, New Territories, Hong Kong, China	MN641882
6. 香港瘰螈 <i>P. hongkongensis</i>	PHK-WKT	中国香港新界乌蛟腾 Wu Kau Tang, New Territories, Hong Kong, China	MN641883
7. 香港瘰螈 <i>P. hongkongensis</i>	PHK-TT	中国香港香港岛大潭 Tai Tam, Hong Kong Island, Hong Kong, China	MN641884
8. 香港瘰螈 <i>P. hongkongensis</i>	PHK-PFL	中国香港香港岛薄扶林 Pok Fu Lam, Hong Kong Island, Hong Kong, China	MN641885
9. 香港瘰螈 <i>P. hongkongensis</i>	PHK-SP	中国香港大屿山大东山 Sunset Peak, Lantau Island, Hong Kong, China	MN641886
10. 香港瘰螈 <i>P. hongkongensis</i>	PHK-OP	中国香港海洋公园 Ocean Park, Aberdeen, Hong Kong, China	MN641887
11. 香港瘰螈 <i>P. hongkongensis</i>	PHK-WTS	中国广东省深圳市梧桐山 Wutongshan, Shenzhen, Guangdong, China	MN641888
12. 香港瘰螈 <i>P. hongkongensis</i>	PHK-NKS	中国广东省惠州市南昆山 Nankunshan, Huizhou, Guangdong, China	MN641889
13. 中国瘰螈 <i>P. chinensis</i>	PCN-NB	中国浙江省宁海县宁波市 Ningbo, Ninghai, Zhejiang, China	MN641890
14. 橙脊瘰螈 <i>P. aurantius</i>	PAR-ZR	中国福建省柘荣县 Zherong, Fuding, Fujian, China	MN641891
15. 富钟瘰螈 <i>P. fuzhongensis</i>	PFZ-FC	中国广西省富川县 Fuchuan, Guangxi, China	MN641892
16. 广西瘰螈 <i>P. guangxiensis</i>	PGX-CZ1	中国广西省宁明县崇左市 Chongzuo, Ningming, Guangxi, China	MN641893
17. 广西瘰螈 <i>P. guangxiensis</i>	PGX-CZ2	中国广西省宁明县崇左市 Chongzuo, Ningming, Guangxi, China	MN641894
18. 七溪岭瘰螈 <i>P. qixilingensis</i>	PQX-QXL	中国江西省七溪岭保护区 Qixiling, Yongxin, Jiangxi, China	MN641895
19. 云雾瘰螈 <i>P. yunwuensis</i>	PYW-LD	中国广东省罗定扶合镇 Luoding, Guangdong, China	MN641896
20. 织金瘰螈 <i>P. zhijinensis</i>	PZJ-TBQ	中国贵州省田坝桥镇 Tianbaqiao, Guizhou, China	MN641897
21. 无斑瘰螈 <i>P. labiatus</i>	PLB-DYS	中国广西省大瑶山保护区 Dayashan, Jinxiu, Guangxi, China	MN641898
22. 尾斑瘰螈 <i>P. caudopunctatus</i>	PCD-LS	中国贵州省雷山县国家级自然保护区 Leishan, Guizhou, China	MN641899
23. 德氏瘰螈 <i>P. deloustali</i>	PDL-HK	中国云南省河口瑶族自治县 Hekou, Honghe, Yunnan, China	MN641900

1.1.1 DNA 提取 首先使用 DNeasy 血液和组织 DNA 提取试剂盒 (Qiagen) 从相应物种的组织样品中提取 DNA。为了确保提取的 DNA 纯度和浓度适合于 PCR 和测序, 使用 Eppendorf BioSpectrometer® basic 读取在 260 nm 的吸光度 (A) 来量度 DNA 浓度, 在 280 nm 处的吸光度量度蛋白浓度, 并且在 230 nm 处确定杂质。当 A_{260}/A_{280} 的比例在 1.6 ~ 2.0 (Lee et al. 2010) 和 A_{260}/A_{230} 在 2.0 ~ 2.2 之间时 (Desjardins et al. 2010), DNA 样品被认为是高质量的。

1.1.2 线粒体细胞色素 b 基因的 PCR 扩增和测序 选取动物细胞中 DNA 拷贝数较多的线粒体细胞色素 b (Cyt b) 基因作为目标片段 (Robin et al. 1988)。首先根据 Wu 等 (2010) 的引物和 PCR 扩增方法, 扩增 11 种瘰螈 23 只个体 (表 1) 的 Cyt b 基因序列。Cyt b 基因的 PCR 扩增体系为 50 μ l, 包括 50 ng DNA、5 μ l 10 \times PCR 缓冲液 (Fermentas)、2 mmol/L $MgCl_2$ 、0.25 mmol/L dNTP (Promega)、0.2 μ mol/L 的正向和反向引物 (表 2)、1.25 U Taq 聚合酶 (Promega)。PCR 热循环条件: 95 $^{\circ}C$ 下初始变性 2 min; 35 个循环的 95 $^{\circ}C$ 变性 30 s, 52 $^{\circ}C$ 退火 45 s, 72 $^{\circ}C$ 延伸 90 s; 最终在 72 $^{\circ}C$ 下延伸 5 min。以添加无核酸酶的水作为阴性对照以检测污染。2% 琼脂糖凝胶电泳检测 Cyt b PCR 产物扩增情况。采用 BGI Tech BioSolutions Company Limited 的 ABI 3730XL DNA 分析仪 (Thermo Fisher Scientific) 对上述 Cyt b 的 PCR 产物进行双向测序。利用软件

BioEdit 7.0.5.3 进行拼接、比对并辅以手工校对, 得到 23 个完整 Cyt b 序列, 用于进一步设计特异性引物和探针。

1.1.3 引物和 TaqMan 探针设计 基于上述得到的 Cyt b 序列, 采用 Primer Express Software 3.0 (Applied Biosystems) 设计出香港瘰螈特异引物和探针。考虑到 DNA 在野外环境中容易降解成微小片段, 因此设计引物扩增的产物长度限制在 150 bp 以内 (Deagle et al. 2006)。为了进一步防止假阳性结果, 设计的引物和探针在 NCBI GenBank 基因数据库中进行对比, 检查是否有非目标物种的结合。最后, 由 Intergrated DNA Technologies 公司合成引物和拥有亚磷酰胺荧光标记 (6-Carboxyfluorescein, 6-FAM) 及黑洞猝灭剂 (black hole quencher-1, BHQ-1) 的探针。选择 6-FAM 是因为能适用于大多数实时 PCR 仪器, 而 BHQ-1 能提供低背景信号并增加 qPCR 测定的灵敏度 (Yeung et al. 2004, Gene Link 2019)。

1.2 验证引物和探针的特异性并优化 qPCR 条件

为了验证设计的引物和探针对香港瘰螈的特异性, 对表 1 中 11 种瘰螈物种的基因样品分别用设计的引物和探针进行 qPCR 测试。此外, 瘰螈饵料 (红虫、蟋蟀、果蝇、跳虫和太平洋磷虾) 及其粪便等释放的 DNA 都可能造成假阳性, 因此, 通过 DNeasy 血液和组织提取试剂盒提取瘰螈饲料的 DNA, 也分别用设计的引物和探针进行 qPCR 测试。

表 2 香港瘰螈特异性引物和 TaqMan 探针的序列

Table 2 The sequences of the *Paramesotriton hongkongensis* specific primers and TaqMan probe

引物/探针 Primer/Probe	名称 Name	引物/探针序列 (5'-3') Primer/Probe sequence (5'-3')	PCR 产物长度 (bp) PCR product size
上游引物 Forward primer	PHK-F	CCCTTTCACCCGTA CTTTTC	
下游引物 Reverse primer	PHK-R	GTAGATTGGTRTAATRAGGGCAATTAA	94
探针 TaqMan probe	PHK-P	6-FAM AAGATTTACTGGGCTTTTTCTGGCACTCCTC BHQ-1	

下游引物中的“R”是兼并碱基, 代表“A”或“G”; 探针中的“6-FAM”和“BHQ-1”分别代表亚磷酰胺荧光标记和黑洞猝灭剂。

“R” in the reverse primer is a degenerate nucleotide representing either “A” or “G”; “6-FAM” and “BHQ-1” in the TaqMan probe represent 6-Carboxyfluorescein fluorescent dye and black hole quencher-1 dye, respectively.

1.2.1 qPCR 退火温度测试 利用香港瘰螈、近缘瘰螈和瘰螈饲料 DNA 进行新设计的引物与探针退火温度梯度 (60 ~ 65 °C) 测试。每个 DNA 样品重复做两个 qPCR。qPCR 扩增体系为 25 μ l: 50 ng DNA、12.5 μ l 2 \times Universal Probe Supermix 缓冲液 (Bio-Rad)、0.5 μ mol/L 每种引物、0.5 μ mol/L 探针、0.5 g/L BSA。qPCR 热循环条件: 在 95 °C 下初始变性 3 min; 40 个循环的 95 °C 变性 5 s, 60 ~ 65 °C 退火 5 s。添加无核酸酶的水作为阴性对照以检测污染。

1.2.2 香港瘰螈阳性对照基因合成与 DNA 拷贝数计算 确定最佳退火温度后, 利用 PHK-OP 香港瘰螈 Cyt *b* 作为阳性对照优化 qPCR 条件, 目的是使设计的引物和探针在扩增香港瘰螈基因时能达到最高的 qPCR 扩增效率 (90% ~ 100%) 和最低检测浓度。首先, 由 Tech Dragon 有限公司通过寡链核苷酸 (Oligo) 的人工拼接技术 (卢俊南等 2018) 获得一条 1 122 bp 香港瘰螈 (PHK-OP) Cyt *b* 合成 DNA, 然后使用 Eppendorf BioSpectrometer® basic 分光光学仪测量 PHK-OP Cyt *b* 合成 DNA 浓度 (μ g/L)。再利用以下公式计算拷贝数: 每微升拷贝数 = $(C \cdot N_L) / (n \cdot 10^6 \cdot m_w)$, C 是已量度的 PHK-OP Cyt *b* 合成 DNA 浓度 (μ g/L), N_L 是阿伏伽德罗常量 (6.02×10^{23}), n 是 PHK-OP Cyt *b* 合成 DNA 的长度 (1 122 bp), m_w 是碱基的平均分子量 (650 u)。将 PHK-OP Cyt *b* 合成 DNA 在无核酸酶的水中稀释至最终浓度为 10^7 拷贝数/ μ l, 储存在 -80 °C 供后期使用。

1.2.3 qPCR 条件优化 为了确定所设计引物和探针的最佳 qPCR 条件, 根据 Bustin 等 (2009) 和 BioRad bulletin 6252 rev C 进行优化。使用 PHK-OP Cyt *b* 合成 DNA 的 10 倍梯度稀释液 (范围为 $10^0 \sim 10^6$ 拷贝数), 在 CFX96 实时定量 PCR 仪 (Bio-Rad) 上进行 qPCR 反应。通过组合测试 0.4、0.5、0.6 μ mol/L 浓度梯度的引物和探针, 以确定最佳 qPCR 条件。当 qPCR 扩增曲线的指数期超过阈值水平时, 产生 DNA 稀释液的 Ct 值。然后, 通过绘制 DNA 稀释度

与 Ct 值之间的标准曲线来确定每种条件下的 qPCR 效率 (Karlen et al. 2007)。将 qPCR 效率在 90% ~ 100% 之间, 且对目标物种的最低检测浓度作为香港瘰螈 eDNA 检测的标准。

1.3 通过室内实验水缸测试引物和探针的灵敏度

1.3.1 室内实验水缸的设计 为评估设计的引物和探针对香港瘰螈 eDNA 的最低检测密度, 设计不同种群密度条件下的检测效率。共设有 8 个玻璃实验水缸, 每个缸有 26 L 淡水, 每个水缸的水溢流排出率为 0.1 L/min。每个水缸实验前先用 1% 漂白剂浸泡 24 h, 然后用淡水彻底冲洗, 以确保水缸内没有香港瘰螈的 DNA。6 个水缸作为实验组, 分别放入 1 只、3 只和 6 只香港瘰螈 (个体平均体长 13 cm, 平均体重 16 g), 每种养殖个体数量的水缸均有 2 个; 对照组共 2 个水缸, 均不放入香港瘰螈, 只有与实验组等量的淡水作为阴性对照。整个实验过程室温保持在 24 °C。

1.3.2 eDNA 提取及 qPCR 检测方法 第一步是采集和保存水样。所有水样在每个水缸的排水位置收集, 使用 250 ml 玻璃瓶 (Wheaton) 采集水样。为确保每个采样瓶不存在目标物种的 eDNA, 水样瓶用 1% 漂白剂浸泡 24 h, 用 Milli-Q 水彻底冲洗, 随后在 121 °C 高压灭菌 15 min。分别在实验用香港瘰螈个体放入水缸之前和放入后的 24、48 和 72 h 采集水样。每天从每个水缸采集 2 瓶 250 ml 水样并立即保存在 4 °C, 在 1 h 内运送至实验室继续进行以下步骤。第二步是获取 eDNA。每瓶水样用直径 47 mm 孔径 0.45 μ m 的 Advantec 硝酸纤维素膜过滤 (Hinlo et al. 2017) 后, 将上述带有 eDNA 的滤膜放入 2 ml 微管, 用无菌微量吸管尖把滤膜搅碎, 再用 DNeasy 血液和组织 DNA 提取试剂盒提供的细胞裂解液和蛋白酶 K 在 56 °C 浸泡 1 h, 最后根据试剂盒提供的实验步骤提取 100 μ l DNA。第三步是利用上述 1.2.3 节已优化后的 qPCR 方法检测 eDNA, 每个 eDNA 样品重复做两个 qPCR。当水样的 Ct 值超过最低检

测浓度的 Ct 值时, 标记为阳性, 否则为阴性。然后, 通过绘制香港瘰螈 DNA 浓度与其个体数量之间的线性关系图, 计算出相关系数 R^2 , R^2 值越高, 两个变量相关性越高。

1.4 通过室内实验水缸测试香港瘰螈 eDNA 的降解速率

为评估在野外检测得到的香港瘰螈 eDNA 产生的时间, 本研究设计以下实验来测试香港瘰螈 eDNA 的降解率。根据 Moushomi 等(2019)的研究, 发现 eDNA 颗粒越小其降解率越慢, 因此以目前可以选取的 0.20 μm 和 0.45 μm 两种孔径滤膜进行香港瘰螈 eDNA 的过滤, 并探究所得到的香港瘰螈 eDNA 颗粒降解速率。

本实验共设 4 个玻璃水缸, 并根据上述 1.3.1 节步骤进行清洗。每个缸有 26 L 淡水, 实验组的 2 个水缸分别有 1 只香港瘰螈, 对照组的 2 个水缸只有淡水作为阴性对照。24 h 把实验组的香港瘰螈取出, 再把 4 个水缸继续放置 17 d 以调查其 eDNA 的降解速率。整个实验过程室温保持在 24 $^{\circ}\text{C}$, pH 保持在 7.1。

每个水缸的水在采集之前先进行彻底搅拌, 接着在中心处收集。采样瓶和清洗方法与上述 1.3.2 节步骤相同。采样频率为实验前一次, 及在取出香港瘰螈后的第 0、1、2、3、4、5、7、9、11、13、15、17 天各一次。每次从每个水缸中采集两瓶 250 ml 水样并立即保存在 4 $^{\circ}\text{C}$, 在 1 h 内运送至实验室继续进行以下步骤。每瓶水样首先用直径 47 mm 孔径 0.45 μm 的 Advantec 硝酸纤维素膜过滤后, 把已过滤的水用直径 47 mm 孔径 0.20 μm 的 Advantec 硝酸纤维素膜再次过滤。然后根据上述 1.3.2 节步骤提取 eDNA 及 qPCR 方法检测 eDNA 浓度。

根据 Lance 等 (2017) 利用 Sigmaplot 14.0 进行数据分析和绘图, 降解速率采用单指数衰减模型拟合, 公式为 $N_t = N_0 e^{-\lambda t}$, 式中, N_t 是在 t 时间的 eDNA 拷贝浓度, N_0 是最初的 eDNA 拷贝浓度, 即第 0 天采集水样的 eDNA 拷贝浓

度, λ 是降解速率, t 是采样时间。计算后得出相关系数 R^2 和 P 值, R^2 值越高, 模型拟合原始数据的优度越高, $P < 0.05$ 即说明所采用的模式是可靠适用的 (Figueiredo Filho et al. 2013)。eDNA 半衰期 ($t_{1/2}$) 则利用公式 $t_{1/2} = (\ln 2) / \lambda$ 计算。

2 结果与讨论

2.1 香港瘰螈特异性引物和探针

23 个瘰螈属样本的 Cyt *b* 基因全部成功扩增及测序, 全部序列已上传到 NCBI GenBank 基因数据库 (表 1)。基于这些序列, 采用生物信息软件 Primer Express Software 3.0 比对及计算后, 设计出的香港瘰螈特异性引物和 TaqMan 探针与其他 10 种瘰螈 11 个 Cyt *b* 基因序列均有变异位点, 只会与本研究 12 个香港瘰螈的 Cyt *b* 基因序列完全匹配, 扩增出长度为 94 bp 的 PCR 产物并释放荧光信号 (表 2 和图 1)。此外, 将引物及探针序列在 NCBI 网站上进行比对分析, 仅与香港瘰螈有 100% 的同源性 & 100% 的序列覆盖率 (表 3), 进一步确认所设计的引物和探针并不会产生非目标物种的扩增。

2.2 检测引物和探针的特异性

尽管设计的引物和探针在序列分析上有着特异性, 但在 qPCR 反应中使用正确的退火温度才是至关重要, 因为如果退火温度太低, 容易产生非特异性扩增, 而温度太高, 则可能影响反应的效率, 导致不能扩增或非常高的 Ct 值、非常低的扩增率 (Merck 2019, PCR 技术指南)。因此, 测试 qPCR 退火温度是验证引物和探针特异性的关键。通过退火温度的梯度测试 (表 4), 只有在 63 $^{\circ}\text{C}$ 的情况下, 引物和探针可以特异性扩增所有 12 个香港瘰螈的 DNA, 而其他 10 个近缘瘰螈物种的 11 个 DNA 样本和饲料物种的 DNA 样本都不能扩增。说明本研究的香港瘰螈特异性引物和 TaqMan 探针最佳退火温度为 63 $^{\circ}\text{C}$ 。

瘰螈物种 (DNA样品名称) <i>Paramesotriton</i> species (DNA sample ID)	PHK-F上游引物 CCCTTTCACCGTACTTTCTC	PHK-P探针 AAGATTAC TGGGCTTTTTC TGGCAC TCC TC	PHK-R下游引物 AAATTACCGGART AAT RTG GTT TAG ATG
1. 香港瘰螈 <i>P. hongkongensis</i> (PHK-HC)	CCCTTTCACCGTACTTTCTC	ATA AAGATTAC TGGGCTTTTTC TGGCAC TCC TCA CCTTAA TAA TTG CCC TTA TTA CAC GAA ATC TAC	AAATTACCGGART AAT RTG GTT TAG ATG
2. 香港瘰螈 <i>P. hongkongensis</i> (PHK-KP)	CCCTTTCACCGTACTTTCTC	ATA AAGATTAC TGGGCTTTTTC TGGCAC TCC TCA CCTTAA TAA TTG CCC TTA TTA CAC GAA ATC TAC	AAATTACCGGART AAT RTG GTT TAG ATG
3. 香港瘰螈 <i>P. hongkongensis</i> (PHK-MTL)	CCCTTTCACCGTACTTTCTC	ATA AAGATTAC TGGGCTTTTTC TGGCAC TCC TCA CCTTAA TAA TTG CCC TTA TTA CAC GAA ATC TAC	AAATTACCGGART AAT RTG GTT TAG ATG
4. 香港瘰螈 <i>P. hongkongensis</i> (PHK-SM)	CCCTTTCACCGTACTTTCTC	ATA AAGATTAC TGGGCTTTTTC TGGCAC TCC TCA CCTTAA TAA TTG CCC TTA TTA CAC GAA ATC TAC	AAATTACCGGART AAT RTG GTT TAG ATG
5. 香港瘰螈 <i>P. hongkongensis</i> (PHK-TPK)	CCCTTTCACCGTACTTTCTC	ATA AAGATTAC TGGGCTTTTTC TGGCAC TCC TCA CCTTAA TAA TTG CCC TTA TTA CAC GAA ATC TAC	AAATTACCGGART AAT RTG GTT TAG ATG
6. 香港瘰螈 <i>P. hongkongensis</i> (PHK-WKT)	CCCTTTCACCGTACTTTCTC	ATA AAGATTAC TGGGCTTTTTC TGGCAC TCC TCA CCTTAA TAA TTG CCC TTA TTA CAC GAA ATC TAC	AAATTACCGGART AAT RTG GTT TAG ATG
7. 香港瘰螈 <i>P. hongkongensis</i> (PHK-TT)	CCCTTTCACCGTACTTTCTC	ATA AAGATTAC TGGGCTTTTTC TGGCAC TCC TCA CCTTAA TAA TTG CCC TTA TTA CAC GAA ATC TAC	AAATTACCGGART AAT RTG GTT TAG ATG
8. 香港瘰螈 <i>P. hongkongensis</i> (PHK-PFL)	CCCTTTCACCGTACTTTCTC	ATA AAGATTAC TGGGCTTTTTC TGGCAC TCC TCA CCTTAA TAA TTG CCC TTA TTA CAC GAA ATC TAC	AAATTACCGGART AAT RTG GTT TAG ATG
9. 香港瘰螈 <i>P. hongkongensis</i> (PHK-SP)	CCCTTTCACCGTACTTTCTC	ATA AAGATTAC TGGGCTTTTTC TGGCAC TCC TCA CCTTAA TAA TTG CCC TTA TTA CAC GAA ATC TAC	AAATTACCGGART AAT RTG GTT TAG ATG
10. 香港瘰螈 <i>P. hongkongensis</i> (PHK-OP)	CCCTTTCACCGTACTTTCTC	ATA AAGATTAC TGGGCTTTTTC TGGCAC TCC TCA CCTTAA TAA TTG CCC TTA TTA CAC GAA ATC TAC	AAATTACCGGART AAT RTG GTT TAG ATG
11. 香港瘰螈 <i>P. hongkongensis</i> (PHK-WTS)	CCCTTTCACCGTACTTTCTC	ATA AAGATTAC TGGGCTTTTTC TGGCAC TCC TCA CCTTAA TAA TTG CCC TTA TTA CAC GAA ATC TAC	AAATTACCGGART AAT RTG GTT TAG ATG
12. 香港瘰螈 <i>P. hongkongensis</i> (PHK-NKS)	CCCTTTCACCGTACTTTCTC	ATA AAGATTAC TGGGCTTTTTC TGGCAC TCC TCA CCTTAA TAA TTG CCC TTA TTA CAC GAA ATC TAC	AAATTACCGGART AAT RTG GTT TAG ATG
13. 中国瘰螈 <i>P. chinensis</i> (PCN-NB)	CTCCTTTCACCGTACTTTCTC	ATA AAGATTAC TGGGCTTTTTC TGGCAC TCC TCA CCTTAA TAA TTG CCC TTA TTA CAC GAA ATC TAC	AAATTACCGGART AAT RTG GTT TAG ATG
14. 橙脊瘰螈 <i>P. aurantius</i> (PAR-ZR)	CTCCTTTCACCGTACTTTCTC	ATA AAGATTAC TGGGCTTTTTC TGGCAC TCC TCA CCTTAA TAA TTG CCC TTA TTA CAC GAA ATC TAC	AAATTACCGGART AAT RTG GTT TAG ATG
15. 富钟瘰螈 <i>P. fuzhongensis</i> (PFZ-FC)	CTCCTTTCACCGTACTTTCTC	ATA AAGATTAC TGGGCTTTTTC TGGCAC TCC TCA CCTTAA TAA TTG CCC TTA TTA CAC GAA ATC TAC	AAATTACCGGART AAT RTG GTT TAG ATG
16. 广西瘰螈 <i>P. guangxiensis</i> (PGX-CZ1)	CTCCTTTCACCGTACTTTCTC	ATA AAGATTAC TGGGCTTTTTC TGGCAC TCC TCA CCTTAA TAA TTG CCC TTA TTA CAC GAA ATC TAC	AAATTACCGGART AAT RTG GTT TAG ATG
17. 广西瘰螈 <i>P. guangxiensis</i> (PGX-CZ2)	CTCCTTTCACCGTACTTTCTC	ATA AAGATTAC TGGGCTTTTTC TGGCAC TCC TCA CCTTAA TAA TTG CCC TTA TTA CAC GAA ATC TAC	AAATTACCGGART AAT RTG GTT TAG ATG
18. 七溪岭瘰螈 <i>P. qixilingensis</i> (PQX-QXL)	CTCCTTTCACCGTACTTTCTC	ATA AAGATTAC TGGGCTTTTTC TGGCAC TCC TCA CCTTAA TAA TTG CCC TTA TTA CAC GAA ATC TAC	AAATTACCGGART AAT RTG GTT TAG ATG
19. 云雾瘰螈 <i>P. yunwuensis</i> (PYW-LD)	CTCCTTTCACCGTACTTTCTC	ATA AAGATTAC TGGGCTTTTTC TGGCAC TCC TCA CCTTAA TAA TTG CCC TTA TTA CAC GAA ATC TAC	AAATTACCGGART AAT RTG GTT TAG ATG
20. 织金瘰螈 <i>P. zhijinensis</i> (PZJ-TBQ)	CTCCTTTCACCGTACTTTCTC	ATA AAGATTAC TGGGCTTTTTC TGGCAC TCC TCA CCTTAA TAA TTG CCC TTA TTA CAC GAA ATC TAC	AAATTACCGGART AAT RTG GTT TAG ATG
21. 无斑瘰螈 <i>P. labiatus</i> (PLB-DYS)	CTCCTTTCACCGTACTTTCTC	ATA AAGATTAC TGGGCTTTTTC TGGCAC TCC TCA CCTTAA TAA TTG CCC TTA TTA CAC GAA ATC TAC	AAATTACCGGART AAT RTG GTT TAG ATG
22. 尾斑瘰螈 <i>P. caudopunctatus</i> (PCD-LS)	CTCCTTTCACCGTACTTTCTC	ATA AAGATTAC TGGGCTTTTTC TGGCAC TCC TCA CCTTAA TAA TTG CCC TTA TTA CAC GAA ATC TAC	AAATTACCGGART AAT RTG GTT TAG ATG
23. 德氏瘰螈 <i>P. deloustali</i> (PDL-HK)	CTCCTTTCACCGTACTTTCTC	ATA AAGATTAC TGGGCTTTTTC TGGCAC TCC TCA CCTTAA TAA TTG CCC TTA TTA CAC GAA ATC TAC	AAATTACCGGART AAT RTG GTT TAG ATG

图 1 香港瘰螈特异性引物和 TaqMan 探针与 23 个瘰螈序列的比对结果

Fig. 1 The *Paramesotriton hongkongensis* specific primers and TaqMan probe with comparison to the 23 *Paramesotriton* spp. DNA sequences

黄色标注的碱基表示在近缘瘰螈序列中与香港瘰螈特异性引物和探针的变异位点。PHK-R 下游引物中的“R”是兼并碱基，代表“A”或“G”。

The nucleotides highlighted in yellow in the DNA sequences of the closely related *Paramesotriton* spp. are the mismatches to the *P. hongkongensis* specific primers and probe. The “R” in the PHK-R reverse primer is a degenerate nucleotide represent either “A” or “G”.

2.3 qPCR 条件优化

引物和探针的浓度是 qPCR 扩增体系中的关键因素之一，不同的引物和探针在同一 qPCR 反应体系中形成竞争关系。测试了不同引物和探针浓度组合（表 5），发现在每种引物 0.5 μmol/L 和探针 0.6 μmol/L 情况下能得出最佳 qPCR 效率，为 93.9%，且在 40 个循环反应内的最低检测限为 10 个拷贝数。最佳标准曲线（图 2）的相关系数 $R^2 = 0.99$ ，回归方程为 $y = -0.2876x + 11.793$ ，说明本研究在稀释的

PHK-OP Cyt b 合成 DNA 浓度范围内具有良好的线性关系，所建立的标准曲线能够正确反映出香港瘰螈 Cyt b 基因的扩增。

2.4 eDNA 灵敏度检测

首先，在实验前 4 个水缸及在实验中没有香港瘰螈的缸都没有检测得到香港瘰螈 DNA（图 3），证明在整个实验中均没有受到香港瘰螈 DNA 的污染。实验经过 24 h 后（图 3），已经能够在 1 只香港瘰螈的缸中水样检测出 DNA 浓度为 (13.56 ± 3.35) 拷贝数/ml 水样，

表 3 香港瘰螈特异性引物和 TaqMan 探针在 NCBI 网站上的比对结果

Table 3 The NCBI BLAST result for the *Paramesotriton hongkongensis* specific primers and TaqMan probe

引物/探针 Primer/Probe	NCBI 网站上比对结果 NCBI BLAST result			
	生物物种 Organism species	基因库检索号 GenBank no.	同源性 Similarity (%)	序列覆盖率 Coverage (%)
PHK-F 上游引物 Forward primer	香港瘰螈 <i>Paramesotriton hongkongensis</i>	AY458597.1	100	100
	香港瘰螈 <i>P. hongkongensis</i>	AF295678.1	100	100
	香港瘰螈 <i>P. hongkongensis</i>	AF295677.1	100	100
	香港瘰螈 <i>P. hongkongensis</i>	AY593139.1	100	100
	雷棒齿刺甲 <i>Oodescelis oblonga</i>	MG993086.1	95	100
	尾斑鳍塘鳢 <i>Ptereleotris heteroptera</i>	KM357798.1	95	100
	裘氏鳄头冰鱼 <i>Champscephalus gunnari</i>	KC907776.1	95	100
	南方冠欧螈 <i>Triturus karelinii</i>	HQ697277.1	95	100
	拟细鲫 <i>Nicholsicypris normalis</i>	MH909856.1	90	100
	三刺鱼 <i>Gasterosteus aculeatus</i>	KX910752.1	90	100
PHK-R 下游引物 Reverse primer	香港瘰螈 <i>Paramesotriton hongkongensis</i>	JX237748.1	100	100
	香港瘰螈 <i>P. hongkongensis</i>	AY458597.1	100	100
	香港瘰螈 <i>P. hongkongensis</i>	AF295678.1	100	100
	香港瘰螈 <i>P. hongkongensis</i>	AY593139.1	100	100
	香港瘰螈 <i>P. hongkongensis</i>	AF295677.1	100	100
	无斑瘰螈 <i>P. ermizhaoi</i>	AB601425.1	89	92
	黑斑肥螈 <i>Pachytriton brevipes</i>	KT152366.1	100	89
	瑶山肥螈 <i>P. inexpectatus</i>	KU375001.1	96	89
	秉志肥螈 <i>P. granulosis</i>	KU374999.1	96	89
尾斑瘰螈 <i>Paramesotriton caudopunctatus</i>	JX480879.1	82	91	
PHK-P 探针 Probe	香港瘰螈 <i>P. hongkongensis</i>	JX237748.1	100	100
	香港瘰螈 <i>P. hongkongensis</i>	AY458597.1	100	100
	香港瘰螈 <i>P. hongkongensis</i>	AF295678.1	100	100
	香港瘰螈 <i>P. hongkongensis</i>	AF295677.1	100	100
	香港瘰螈 <i>P. hongkongensis</i>	AY593139.1	100	100

说明本研究建立的香港瘰螈 eDNA 检测技术灵敏度颇高。在 3 只和 6 只香港瘰螈的缸也分别检测出水样 DNA 浓度为 (81.61 ± 13.97) 拷贝数/ml 及 (125.67 ± 21.28) 拷贝数/ml。实验经过 48 h 和 72 h 后(图 3), 每个水缸检测出 DNA 浓度亦相应递增。尤其是在 6 只香港瘰螈的缸中, DNA 浓度升幅在实验经过 48 h 后突然扩大至 $(1\ 091.07 \pm 106.90)$ 拷贝数/ml, 原因有可能是缸中香港瘰螈所产生的皮屑和黏液包含表皮细胞并释放大胞内 DNA (图 4), 使目标 DNA 浓度大幅上升。而目标 DNA 浓度和香

港瘰螈数量在这 24、48 和 72 h 分别有着 R^2 为 0.97、0.87 和 0.95 的正相关性(图 5), 证明香港瘰螈数量越多, 所检测出的 DNA 量就会越多。

2.5 eDNA 降解速率检测

两组香港瘰螈 eDNA 颗粒大小 ($> 0.45 \mu\text{m}$ 及 $0.20 \sim 0.45 \mu\text{m}$) 的实验数据都拟合单指数衰减模型 ($R^2 = 0.96$, $P < 0.0001$) (图 6), 这与前人对 eDNA 降解的研究结果相类似 (Dejean et al. 2011, Strickler et al. 2015, Lance et al. 2017)。本研究的香港瘰螈 eDNA 降解实验与

Moushomi 等 (2019) 的结果相近, 发现 eDNA 颗粒越小其降解速率越慢。本研究的香港瘰螈大于 0.45 μm 的 eDNA 降解速率为 - 0.53, 半

衰期 1.31 d, 而大小为 0.20 ~ 0.45 μm 的 eDNA 降解速率为 - 0.30, 半衰期 2.31 d。这表明香港瘰螈 eDNA 大于 0.45 μm 时, 其降解速度比

表 4 设计的引物和 TaqMan 探针在不同退火温度下对不同瘰螈物种及饲料物种的特异扩增测试

Table 4 The specificity test of the designed primers and TaqMan probe for different *Paramesotriton* spp. and feeding species under different annealing temperatures

生物物种 (DNA 样品名称) Organism species (DNA sample ID)	平均 Ct 值 Mean Ct value					
	60 °C	61 °C	62 °C	63 °C	64 °C	65 °C
瘰螈物种 <i>Paramesotriton</i> spp.						
1. 香港瘰螈 <i>P. hongkongensis</i> (PHK-HC)	26.1	26.6	28.1	31.1	—	—
2. 香港瘰螈 <i>P. hongkongensis</i> (PHK-KP)	26.1	26.2	27.6	32.3	34.1	—
3. 香港瘰螈 <i>P. hongkongensis</i> (PHK-MTL)	25.4	25.4	26.2	31.2	37.1	—
4. 香港瘰螈 <i>P. hongkongensis</i> (PHK-SM)	24.8	24.6	25.4	28.7	35.3	—
5. 香港瘰螈 <i>P. hongkongensis</i> (PHK-TPK)	27.4	27.3	27.7	33.0	—	—
6. 香港瘰螈 <i>P. hongkongensis</i> (PHK-WKT)	26.5	26.3	27.3	32.4	—	—
7. 香港瘰螈 <i>P. hongkongensis</i> (PHK-TT)	27.9	27.9	28.9	33.8	—	—
8. 香港瘰螈 <i>P. hongkongensis</i> (PHK-PFL)	24.3	24.3	25.1	29.4	38.1	—
9. 香港瘰螈 <i>P. hongkongensis</i> (PHK-SP)	29.7	30.0	31.3	34.5	—	—
10. 香港瘰螈 <i>P. hongkongensis</i> (PHK-OP)	25.0	25.3	26.0	28.0	35.8	—
11. 香港瘰螈 <i>P. hongkongensis</i> (PHK-WTS)	24.5	24.3	25.2	27.6	36.2	—
12. 香港瘰螈 <i>P. hongkongensis</i> (PHK-NKS)	24.5	24.9	25.8	27.7	33.6	—
13. 中国瘰螈 <i>P. chinensis</i> (PCN-NB)	38.8	—	—	—	—	—
14. 橙脊瘰螈 <i>P. aurantius</i> (PAR-ZR)	37.7	38.9	—	—	—	—
15. 富钟瘰螈 <i>P. fuzhongensis</i> (PFZ-FC)	32.6	35.8	38.4	—	—	—
16. 广西瘰螈 <i>P. guangxiensis</i> (PGX-CZ1)	34.9	36.9	39.1	—	—	—
17. 广西瘰螈 <i>P. guangxiensis</i> (PGX-CZ2)	—	—	—	—	—	—
18. 七溪岭瘰螈 <i>P. qixilingensis</i> (PQX-QXL)	—	—	—	—	—	—
19. 云雾瘰螈 <i>P. yunwuensis</i> (PYW-LD)	39.8	—	—	—	—	—
20. 织金瘰螈 <i>P. zhijinensis</i> (PZJ-TBQ)	36.4	37.9	39.2	—	—	—
21. 无斑瘰螈 <i>P. labiatus</i> (PLB-DYS)	—	—	—	—	—	—
22. 尾斑瘰螈 <i>P. caudopunctatus</i> (PCD-LS)	—	—	—	—	—	—
23. 德氏瘰螈 <i>P. deloustali</i> (PDL-HK)	—	—	—	—	—	—
饲料物种 Feeding species						
i 红虫 <i>Tubifex hattai</i> (Bloodworm)	—	—	—	—	—	—
ii 蟋蟀 <i>Acheta domesticus</i> (Cricket)	—	—	—	—	—	—
iii 果蝇 <i>Drosophila melanogaster</i> (Fruit fly)	—	—	—	—	—	—
iv 跳虫 <i>Hypogastrura</i> spp. (Springtail)	—	—	—	—	—	—
v 太平洋磷虾 <i>Euphausia pacifica</i> (Pacifica Krill)	—	—	—	—	—	—

—, Ct 值 > 40, 为阴性结果。—, Ct value > 40 as negative result.

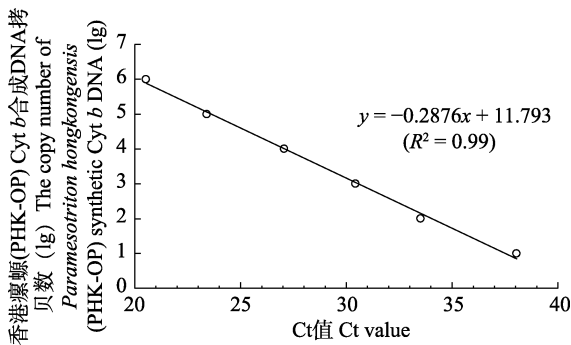
表 5 不同引物和探针浓度下的 qPCR 效率和标准曲线结果

Table 5 The qPCR efficiency and standard curve results under different concentrations of primers and probe

浓度 Concentration ($\mu\text{mol/L}$)			qPCR 效率 qPCR efficiency (%)	相关系数 (R^2) Correlation coefficient	回归方程 Linear regression equation	最低检测限 (拷贝数) Limit of detection (Copy number)
上游引物 Forward primer	下游引物 Reverse primer	探针 TaqMan Probe				
0.4	0.4	0.4	89.9	0.99	$y = -0.2785x + 11.706$	10
0.4	0.4	0.5	85.9	0.99	$y = -0.2693x + 11.431$	10
0.4	0.4	0.6	87.4	0.99	$y = -0.2727x + 11.557$	10
0.5	0.5	0.4	89.7	0.98	$y = -0.2781x + 11.595$	10
0.5	0.5	0.5	87.4	0.99	$y = -0.2728x + 11.410$	10
0.5	0.5	0.6	93.9	0.99	$y = -0.2876x + 11.793$	10
0.6	0.6	0.4	91.5	0.99	$y = -0.2821x + 11.612$	10
0.6	0.6	0.5	85.6	0.99	$y = -0.2685x + 11.256$	10
0.6	0.6	0.6	91.3	0.99	$y = -0.2817x + 11.585$	10

y 表示以 10 为底的对数之香港瘰螈 PHK-OP Cyt b 合成 DNA 拷贝数; x 表示 qPCR 扩增反应后的 Ct 值。

y represent the logarithm value with base 10 of *Paramesotriton hongkongensis* PHK-OP synthetic Cyt b DNA copy number; x represent the Ct value after qPCR amplification reaction.

图 2 香港瘰螈 Cyt b 基因的最佳 qPCR 标准曲线Fig. 2 The best qPCR standard curve of Cyt b gene for *Paramesotriton hongkongensis*

eDNA 为 0.20 ~ 0.45 μm 时的快。尽管如此, eDNA 大于 0.45 μm 在实验最初的浓度为 (186.31 ± 5.91) 拷贝数/ml, 比 0.20 ~ 0.45 μm eDNA 的含量多 $[(3.40 \pm 0.16)$ 拷贝数/ml], 显示香港瘰螈 eDNA 主要由大于 0.45 μm 的颗粒组成。此外降解结果也显示, 大于 0.45 μm 的 eDNA 要到第 15 天才完全检测不到, 而 0.2 ~ 0.45 μm 的 eDNA 在第 13 天便完全检测

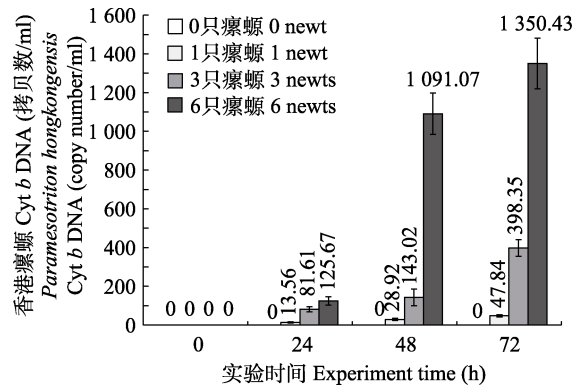


图 3 香港瘰螈实验水缸的 eDNA 灵敏度检测结果

Fig. 3 The eDNA sensitivity result for the *Paramesotriton hongkongensis* microcosm experiment

柱状上的数字为 DNA 浓度的平均数, 而误差线是标准差。

The numbers on the columns represent the mean DNA concentration while the error bars represent the standard deviation.

不到。因此, 我们认为采用 0.45 μm 孔径的滤膜就足够收集并检测大部分遗留在水中的香港瘰螈 eDNA。



图 4 香港瘰螈的皮屑和黏液

Fig. 4 The dander and mucus of *Paramesotriton hongkongensis*

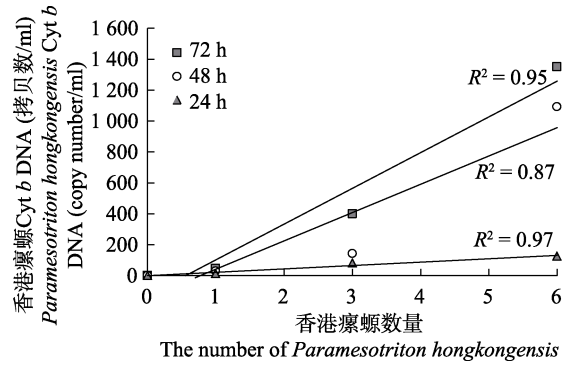


图 5 香港瘰螈 DNA 浓度与其个体数量的相关性

Fig. 5 The correlation between the DNA concentration of *Paramesotriton hongkongensis* and the number of its individuals

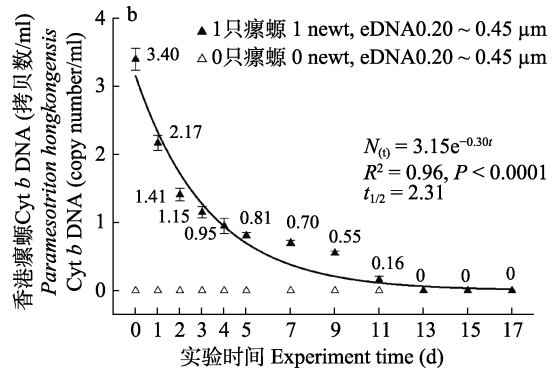
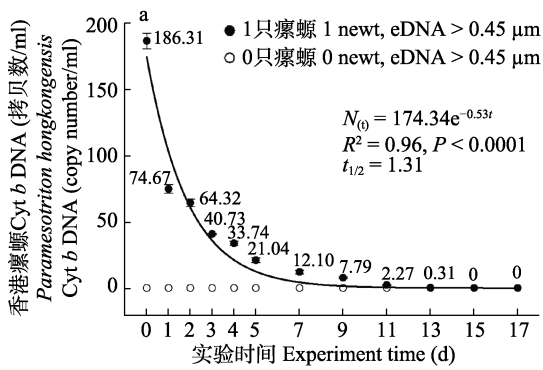


图 6 不同大小的香港瘰螈 eDNA 降解结果

Fig. 6 Different sizes of *Paramesotriton hongkongensis* eDNA decay result

a. eDNA 大小 > 0.45 μm; b. eDNA 大小介于 0.20 ~ 0.45 μm; 点上的数字为 DNA 浓度的平均数, 而误差线是标准差。
 a. eDNA size > 0.45 μm; b. eDNA size between 0.20 - 0.45 μm; The numbers on the points represent the mean DNA concentration while the error bars represent the standard deviation.

封面动物 香港瘰螈, 周行 2018 年 11 月摄于深圳大鹏。

参 考 文 献

Adams I C, Hoekstra A L, Muell R M, et al. 2019. A brief review of non-avian 483 reptile environmental DNA (eDNA), with a case study of painted turtle (*Chrysemys picta*) eDNA under field conditions. *Diversity*, 11(4): 50. DOI: 10.3390/d11040050.
 Bio-Rad Bulletin 6252 Rev. C. 2019 Reagent comparison guide for real-time PCR. [DB/OL]. [2019-08-01]. http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6252.pdf.

Bustin S A, Benes V, Garson J A, et al. 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4): 611-622.
 Deagle B E, Eveson J P, Jarman S N. 2006. Quantification of damage in DNA recovered from highly degraded samples - a case study on DNA in faeces. *Frontier in Zoology*, 3(1): 11.
 Deiner K, Altermatt F. 2014. Transport distance of invertebrate environmental DNA in a natural river. *PLoS One*, 9(2): e88786.
 Dejean T, Valentini A, Duparc A et al. 2011. Persistence of

- environmental DNA in freshwater ecosystems. *PLoS One*, 6(8): e23398.
- Desjardins P, Conklin D. 2010. NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. *Journal of Visualized Experiments*, 45(45): 2565. DOI: 10.3791/2565.
- Farrington H L, Lance R F. 2014. Development of genetic markers for environmental DNA (eDNA) monitoring of sturgeon. U. S. Army Engineer Research and Development Center. Ecosystem Management and Restoration Research Program, 1–12.
- Figueiredo Filho D B, Paranhos R, da Rocha E C, et al. 2013. When is statistical significance not significant? *Brazilian Political Science Review*, 7(1): 31–55.
- Gene Link. 2019. Gene Link Product Specifications for Oligo Synthesis. [DB/OL]. [2019-10-04]. http://www.genelink.com/newsite/products/MODPDFFILES/OMR_Quenchers.pdf.
- Gentry A H. 1992. Tropical forest biodiversity: distributional patterns and their conservational significance. *Oikos*, 63(1): 19–28.
- Goldberg C S, Pilliod D S, Arkle R S, et al. 2011. Molecular detection of vertebrates in stream water: a demonstration using rocky mountain tailed frogs and Idaho giant salamanders. *PLoS One*, 6(7): e22746.
- Hinlo R, Gleeson D, Lintermans M, et al. 2017. Methods to maximise recovery of environmental DNA from water samples. *PLoS One*, 12(6): e0179251.
- Jono T, Nishikawa K, Ding L, et al. 2014. Geographic distribution: *Paramesotriton hongkongensis*. *Herpetological Review*, 45(4): 651.
- Karlen Y, McNair A, Perseguers S, et al. 2007. Statistical significance of quantitative PCR. *BMC Bioinformatics*, 8: 131.
- Katano I, Harada K, Doi H, et al. 2017. Environmental DNA method for estimating salamander distribution in headwater streams, and a comparison of water sampling methods. *PLoS One*, 12(5): e0176541.
- Lance R F, Klymus K E, Richter C A, et al. 2017. Experimental observations on the decay of environmental DNA from bighead and silver carps. *Management of Biological Invasions*, 8(3): 343–359.
- Lau A, Karraker N E, Dudgeon D. 2016. Development of nine microsatellite markers for *Paramesotriton hongkongensis* (Hong Kong newt) through shotgun sequencing and cross-species amplification in other Asian salamandrids. *Current Herpetology*, 35(2): 122–127.
- Lau M W N, Chan B P L. 2004. *Paramesotriton hongkongensis* // IUCN. The IUCN Red List of Threatened Species 2004: e.T59460A11945539. Switzerland, Gland. [DB/OL]. [2020-06-30] <https://www.iucnredlist.org/species/59460/11945539>.
- Lau M W N, Dudgeon D. 1999. Composition and distribution of Hong Kong amphibian fauna. *Memoirs of the Hong Kong Natural History Society*, 22: 1–79.
- Lee J H, Park Y, Choi J R, et al. 2010. Comparisons of three automated systems for genomic DNA extraction in a clinical diagnostic laboratory. *Yonsei Medical Journal*, 51(1): 104–110.
- Miller R I. 1994. *Mapping the Diversity of Nature*. Dordrecht: Springer, 8–15.
- Moushomi R, Wilgar G, Carvalho G, et al. 2019. Environmental DNA size sorting and degradation experiment indicates the state of *Daphnia magna* mitochondrial and nuclear eDNA is subcellular. *Scientific Reports*, 9(1): 1–9.
- Parsons K M, Everett M, Dahlheim M, et al. 2018. Water, water everywhere: environmental DNA can unlock population structure in elusive marine species. *Royal Society Open Science*, 5(8): 180537. DOI: 10.1098/rsos.180537.
- Rees H C, Bishop K, Middleditch D J, et al. 2014. The application of eDNA for monitoring of the great crested newt in the UK. *Ecology and Evolution*, 4(21): 4023–4032.
- Robin E D, Wong R. 1988. Mitochondrial DNA molecules and virtual number of mitochondria per cell in mammalian cells. *Journal of Cellular Physiology*, 136(3): 507–513.
- Smith C J, Osborn A M. 2009. Advantages and limitations of Quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, 67(1): 6–20.
- Stewart K, Ma H, Zheng J, et al. 2017. Using environmental DNA to assess population-wide spatiotemporal reserve use. *Conservation Biology*, 31(5): 1173–1182.
- Strickler K M, Fremier A K, Goldberg C S, et al. 2015. Quantifying effects of UV-B, temperature, and pH on eDNA degradation in

- aquatic microcosms. *Biological Conservation*, 183: 85–92.
- Walker D M, Leys J E, Dunham K E, et al. 2017. Methodological considerations for detection of terrestrial small-body salamander eDNA and implications for biodiversity conservation. *Molecular Ecology Resources*, 17(6): 1223–1230.
- Wu Y, Wang Y, Jiang K, et al. 2010. Homoplastic evolution of external coloration in Asian stout newts (*Pachytriton*) inferred from molecular phylogeny. *Zoologica Scripta*, 39: 9–22.
- Yeung A T, Holloway B P, Adams P S, et al. 2004. Evaluation of dual-labeled fluorescent DNA probe purity versus performance in real-time PCR. *BioTechniques*, 36(2): 266–275.
- Yuan Z, Zhao H, Jiang K, et al. 2014. Phylogenetic relationships of the genus *Paramesotriton* (Caudata: Salamandridae) with the description of a new species from Qixiling nature reserve, Jiangxi, southeastern China and a key to the species. *Asian Herpetological Research*, 5(2): 67–79.
- 费梁, 胡淑琴, 叶昌媛, 等. 2006. 中国动物志: 两栖纲 (上卷) 总论 蚓螈目 有尾目. 北京: 科学出版社, 1–471.
- 卢俊南, 罗周卿, 姜双英, 等. 2018. DNA 的合成、组装及转移技术. *中国科学院院刊*, 33(11): 1174–1183.
- Merck. 2019. PCR 技术指南: 测定的优化和验证, 优化引物浓度和退火温度. [DB/OL]. [2019-10-02] <https://www.sigmaldrich.com/china-mainland/technical-documents/articles/biology/assay-optimization-and-validation.html>.