

中国大鲵非损害性 DNA 取样及提取方法的比较研究

王金秀^{①②} 兰香英^{①②} 罗庆华^{①②}
邓克国^① 梁志强^③ 蒋万胜^{①②*}

① 吉首大学大鲵资源保护与综合利用湖南省工程实验室, 林产化工工程湖南省重点实验室 张家界 427000;

② 吉首大学生物资源与环境科学学院 吉首 416000; ③ 湖南省水产科学研究所 长沙 410153

摘要: 基于 DNA 分子的研究方法在物种分类及系统学、生态遗传学、保护生物学等领域被广泛运用, 但针对动物 DNA 取样方法的比较研究整体上较为缺乏。动物 DNA 取样要在对实验对象造成最小化影响和获得满足研究需要的 DNA 之间保持平衡, 这需要不断探索取样方法的优缺点和适用性。本研究以人工繁育的水生有尾两栖动物中国大鲵 (*Andrias davidianus*) 为研究对象, 比较口腔拭子、皮肤拭子、皮肤脱落物和尾静脉采血 4 种取样方式对 DNA 质量的影响。另外, 基于其中皮肤拭子样品, 进一步比较试剂盒法、高盐法、苯酚氯仿法和磁珠法对 DNA 提取效果的影响。结果表明, 4 种非损害性取样方法均能获得目标物种的 DNA, 且均未对取样对象的行为或适合度产生明显影响, 但在 DNA 质量和浓度方面存在一定差异, 其中, 相对最好的为尾静脉采血, 其次是口腔拭子和皮肤拭子, 最差的为皮肤脱落物样品。而基于皮肤拭子样品采用 4 种不同 DNA 提取方法所获得的 DNA 效果整体差异不大。本研究通过以中国大鲵作为水生和非皮毛类动物的代表类群, 研究并总结了不同 DNA 取样方法和提取方式的优缺点及注意事项, 可为未来中国大鲵或其他珍稀濒危动物的非损害性取样方法及相关分子生态学研究提供借鉴。

关键词: 非损害性取样; 非损伤性取样; DNA 提取方法; 中国大鲵; 水生动物

中图分类号: Q958 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2022) 05-641-12

Comparative Study on the Methods of Non-Disruptive DNA Sampling and Extraction in Chinese Giant Salamander (*Andrias davidianus*)

WANG Jin-Xiu^{①②} LAN Xiang-Ying^{①②} LUO Qing-Hua^{①②}
DENG Ke-Guo^① LIANG Zhi-Qiang^③ JIANG Wan-Sheng^{①②*}

① *Hunan Engineering Laboratory for Chinese Giant Salamander's Resource Protection and Comprehensive Utilization, and Key Laboratory of Hunan Forest Products and Chemical Industry Engineering, Jishou University, Zhangjiajie 427000;*

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 32060128, 32060238), 湖南省创新平台与人才计划项目 (2020RC3057), 质兰基金会项目 (No. 2020040371B), 吉首大学生态学双一流学科建设经费及研究生校级课题 (No. Jdy20086, DNGC2012, DNGC2021);

* 通讯作者, E-mail: jiangwschina@163.com;

第一作者介绍 王金秀, 女, 硕士研究生; 研究方向: 动物生物学; E-mail: 18508761014@163.com.

收稿日期: 2022-04-07, 修回日期: 2022-07-25 DOI: 10.13859/j.cjz.202205001

② *College of Biology and Environmental Sciences, Jishou University, Jishou 416000;*

③ *Fisheries Research Institute of Hunan Province, Changsha 410153, China*

Abstract: [Objectives] DNA-based research methods have been widely applied in the study of species taxonomy and phylogeny, ecological genetics, and conservation biology, however, the comparative studies on DNA samplings are generally scarce. In this study, we aimed to compare the performance and applicability of different DNA sampling and extraction methods by using the captive-bred Chinese giant salamander (*Andrias davidianus*) as study objects. [Methods] DNA samples were obtained by four sampling methods including buccal swabbing, skin swabbing, shed skin sampling and tail venous blood sampling (Fig. 2). DNA was extracted by four different methods including Kit method, high salt method, phenol-chloroform method and magnetic bead method based on the most accessible skin swabbing samples. All the DNA qualities and concentrations were detected by gel electrophoresis and nucleic acid protein analyzer, and each of the sampling DNA was identified by PCR and sequencing of the mitochondrial *COI* fragments. In addition, the daily and feeding behaviors of the experimental animals were observed after samplings. [Results] Our results showed that the daily and feeding behaviors of *A. davidianus* didn't change visibly, thus the four sampling methods could belong to the category of non-disruptive DNA sampling that has minimal impact on the fitness, behavior or welfare of the experimental animals. Among the four different sampling methods, the tail venous blood sampling performs optimally, followed by buccal, skin swabbing, and then shed skin sampling in terms of DNA quality and concentration (Fig. 3a, b). However, the DNA obtained by four different extraction methods based on skin swabbing samples were generally similar (Fig. 3c, d). Although different sampling methods performed differences in obtaining DNA, all the extracted DNA could be amplified of the target *COI* gene fragments (Fig. 3e, f). [Conclusion] By summarizing the advantages, disadvantages and precautions of different DNA sampling and extraction methods (Table 1), we suggest that the most appropriate sampling method should be selected according to the experimental purposes and specific conditions. In terms of extraction methods, however, considering the toxicity of reagents, the complexity of operation, time and economic costs, the kit method is what we recommended. This study could provide some guidance for non-disruptive sampling and relevant molecular ecology studies of *A. davidianus* and other rare and endangered animals in the future.

Key words: Non-disruptive sampling; Non-invasive sampling; DNA extraction method; *Andrias davidianus*; Aquatic animals

基于 DNA 分子的研究方法在动物多样性及保护、分子生态学与系统学等相关领域中被广泛运用 (Maddock et al. 2014), 其基本前提是进行有效的动物样本采集。动物 DNA 取样需考虑方法的可靠性和适用性, 同时要尽量减少对动物生存和福利的影响。Taberlet 等 (1999) 最早提出非损伤性取样 (noninvasive sampling) 的概念, 即在不抓捕或干扰动物的情况下收集

动物遗留 DNA 样品的一种取样方法, 如捡拾动物的排泄物或脱落的毛发。由于该取样理念能在很大程度上减小对取样对象的影响, 因此备受生态保护学家的青睐 (李明等 2001, Waits et al. 2005, 王李玲等 2021), 并得到了广泛的实践 (李军林等 2001, 王琰等 2014, Zemanova 2021, 武芳婷等 2022)。

然而, Taberlet 等 (1999) 定义的非损伤

性取样（狭义），明确了取样过程是在不抓捕、不触及，或在未亲眼见到动物的情况下发生的，收集的样品类型包括粪便、尿液、毛囊、脱落羽毛和动物食团等。这对陆生皮毛动物（如哺乳类和鸟类）具有一定的可行性，但是针对水生动物如鱼类或非皮毛动物如两栖类等，这种非接触式采样则具有较大的局限性（Balázs et al. 2020）。因此，现实研究中这一取样概念被有意或无意地放大，逐渐对应在医学上无创（noninvasive procedure）的范畴（O'Toole 2005），即不需要穿刺皮肤侵入到采样对象体内。这样便形成了广义的非损伤性取样，即包含无创但有接触的采样方式如皮肤拭子、口腔拭子、泄殖腔拭子采样等（Pidancier et al. 2003, Miller 2006, Lefort et al. 2022）。但也有许多研究并未考虑词义上的定义，而笼统地将其认为对动物伤害性较小的取样方式归为非损伤性取样，如对动物体表造成明显创口的剪鳍、剪趾或剪肉等（Janse et al. 2013, Baillon et al. 2016, 周江等 2021）。

非损伤性取样强调采样时是否接触（狭义）或侵入（广义）到取样对象，但很少关注对研究对象的适合度或生态完整性有无影响。比如，对于用排泄物标记领域的动物，捡拾粪便可能会改变其领地行为（Brzeziński et al. 2006）；而采用人为投食诱捕动物采样，则可能对其采食主动性或味道判别造成影响（Cohen et al. 2013）。鉴于此，Lefort 等（2022）提出了另外一种取样理念，即非损害性 DNA 取样（non-disruptive DNA sampling），具体是指取样本身不会损害取样对象的适合度，也不会对其行为或福利方面产生影响。或称微损害性 DNA 取样（minimally disruptive DNA sampling），即最小程度地影响动物的适合度、行为和福利。尽管非损害性 DNA 取样是偏功能性的词义，而非损伤性取样是偏方法性的词义（Lefort et al. 2022），但两者在实践中仍有很程度的重叠（图 1）。本质上而言，任何取样方法都需要在对研究对象造成最小化影响和获得满足需要

的 DNA 之间保持一种妥协和平衡（Lefort et al. 2022），这也要求在实际的研究中，不断探索更加有效的方法（Balázs et al. 2020）或逐步总结不同方法的优缺点（王李玲等 2021），从而增加非损伤性或非损害性取样方法的使用范围（Zemanova 2019），继而从整体上减少因为取样本身对动物的影响。

中国大鲵（*Andrias davidianus*，后简称大鲵）是全球现生最大的两栖类旗舰物种，亦是我国特有且重要的动物种质资源（蒋万胜等 2022）。但近 30 年来，其野外种群数量下降严重，1988 年起被列为国家 II 级重点保护野生动物，2004 年被 IUCN 列为极度濒危级物种（Liang et al. 2004）。以 DNA 为基础的遗传多样性研究是制定大鲵合理保护策略的重要前提，因此受到广泛关注。早期研究主要通过处死动物，解剖获得其肝、肌肉、心和血液等样品（Murphy et al. 2000）；后期研究则主要通过剪取少量活体的肌肉样本（杨丽萍等 2011, 周江等 2021）；而近期研究也报道了非损伤性取样方法与传统方法的配合使用，如通过口腔拭子或皮肤脱落物取样（Yan et al. 2018, Liang et al. 2019）。但到目前为止，不同取样方法以及获得 DNA 效果方面缺乏比较研究，而探索和总结取样方法的适用性将为大鲵日后更加广泛的研究提供重要参考。

本研究以人工繁育的子二代大鲵为研究对象，通过口腔拭子、皮肤拭子、皮肤脱落物和尾静脉采血 4 种方式来比较取样方法对 DNA 质量的影响；另外针对皮肤拭子样品，再进一步采用试剂盒法、高盐法、苯酚氯仿法和磁珠法来比较 DNA 提取方法对结果的影响；结合两个方面的内容全面探讨不同 DNA 取样和提取方法的优缺点及适用性，为未来大鲵或其他珍稀濒危两栖类的取样方法和相关分子生态学研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料及来源

实验所用大鲵为仿生态人工繁殖子二代，

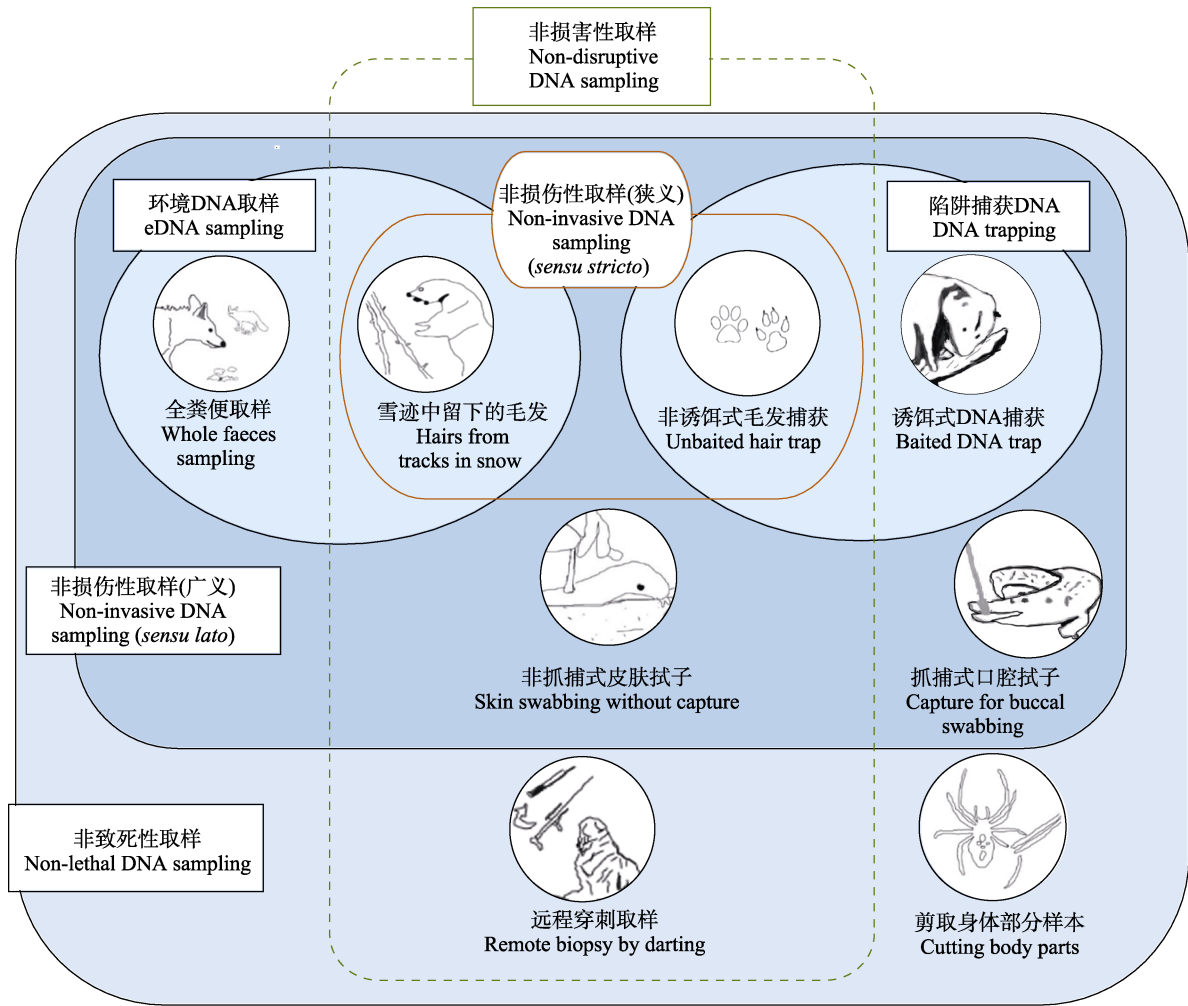


图 1 非损害性取样、非损伤性取样和非致死性取样方法的关系示意图 (仿 Lefort 等 2022)

Fig. 1 The relationship between non-disruptive, non-invasive and non-lethal DNA sampling methods (from Lefort et al. 2022)

非损害性取样为虚线框, 示意其方法范畴可能随着取样对象的生态特性不同而有所不同。

The category of non-disruptive sampling is marked in dotted box, which means it would alter according to the ecological features of the different experimental animals.

来自张家界竹园大鲵生物科技有限公司生态繁育标准化基地 (29°28' N, 110°22' E, 海拔 471 m), 基地位于湖南省张家界市桑植县空壳树乡境内。2021 年 10 月 12 日, 选取体型大小均匀的 2+龄个体 15 尾, 体长 (29.73 ± 2.71) cm, 体重 (0.495 ± 0.046) kg, 转移到实验室后每尾大鲵单独饲养, 3 d 投喂一次, 饵料为剪成小块的新鲜鱼块。在实验室正常饲养两周后,

开展实验。

1.2 DNA 取样方法比较实验

随机选取 12 尾大鲵, 分为 4 组, 每组 3 尾, 分别通过口腔拭子、皮肤拭子、皮肤脱落物和尾静脉采血 4 种方法获取样本 (图 2)。样品采集后将大鲵放回原养殖缸并观察一周, 查看其日常行为和进食有无影响。

口腔拭子采样, 将大鲵置于洁净白色磁盘



图 2 不同取样方法示意图

Fig. 2 Photos of different sampling methods

a. 口腔拭子取样; b. 皮肤拭子取样; c. 皮肤脱落物取样; d. 尾静脉采血取样。

a. Buccal swabbing; b. Skin swabbing; c. Shed skin sampling; d. Tail venous blood sampling.

中，轻轻抬高其前肢，用边缘圆钝的塑料勺轻轻打开大鲵口腔，将无菌棉签伸入口腔中，来回擦拭口腔壁表面 3 ~ 5 次，直至棉签完全湿润。将棉签放入含有无水乙醇的 EP 管中，- 20 °C 保存。

皮肤拭子采样，将大鲵置于白色磁盘中，用喷壶使用超纯水喷洗大鲵体背，用无菌棉签来回擦拭大鲵背部皮肤 3 ~ 5 次，直到棉签湿润。将棉签放入到含有无水乙醇的 EP 管中，置于 - 20 °C 保存。

皮肤脱落物采样，由于实验时期为秋季，天气依然较热，大鲵蜕皮仍较为频繁，直接收集大鲵单独养殖缸中的新鲜皮肤脱落物，用超纯水喷洗后，放入含有无水乙醇的 EP 管中，置于 - 20 °C 保存。

尾静脉血采样，将大鲵置于白色磁盘中，

磁盘中预先放置洁净的棉质软毛巾，用毛巾一头轻盖住大鲵前半部分（遮光减少应激性），待大鲵静息后，用 1 ml 的一次性针管从大鲵的尾部静脉处抽取少量血液。放置于 EP 管中，使用 1% Tris-HCl 和 EDTA 混合物（1 : 1）与血液以 9 : 1 体积比混合（鲁云凤等 2004），置于 - 20 °C 保存。

对以上 4 组共 12 个样品统一采用天根生物公司的血液细胞组织基因组 DNA 提取试剂盒（DP304）提取 DNA，提取步骤参照说明书进行。

1.3 DNA 提取方法比较实验

取样方法比较实验一周后，又随机选取 12 尾大鲵分为 4 组，每组 3 尾，通过皮肤拭子取样获取 12 个样品，并于 - 20 °C 无水乙醇保存。样品采集后将大鲵放回原养殖缸，继续观察一

周查看其日常行为和采食有无影响。4 组样品分别对应试剂盒法、高盐法、苯酚氯仿法和磁珠法进行 DNA 提取, 各方法简述如下。

试剂盒法采用天根生物公司的血液细胞组织基因组 DNA 提取试剂盒(DP304)进行提取, 流程参照说明书, 包括细胞裂解、DNA 与吸附柱结合、洗涤、洗脱 DNA 等环节, 最后溶解于 30 μl TE 缓冲液中。

高盐法参照如下流程。①裂解液的制备: 160 μl 1 mol/L 的 NaCl 溶液、40 μl 100 mmol/L 且 pH 为 8.0 的 Tris-HCl、2 μl 100 mmol/L 且 pH 为 8.0 的 EDTA, 常温下混匀, 然后加入 160 μl 10% 的 SDS 和 20 μl 10 g/L 的蛋白酶 K, 迅速混匀, 制成裂解细胞所需的裂解液。②裂解细胞: 向样品中加入 400 μl 裂解液, 颠倒混匀, 55 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 4~8 h。③沉淀蛋白: 加入 300 μl 6 mol/L NaCl 溶液, 震荡 20 s, 12 000 r/min 离心 15 min, 收取上清液备用。④沉淀 DNA: 向上清液中加入等体积的异丙醇, -20 $^{\circ}\text{C}$ 下放置 2~6 h, 12 000 r/min 离心 15 min, 然后收取沉淀物。⑤洗涤 DNA: 向沉淀物中加入浓度为 70% 的乙醇溶液, 洗涤沉淀物 1~3 次。⑥获取 DNA: 向洗涤后的沉淀物中加入 30 μl TE 缓冲液, 使沉淀物溶解, 于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

苯酚氯仿法参照如下流程。①裂解细胞: 加入 500 μl 的裂解液混匀, 裂解液制备同高盐法。55 $^{\circ}\text{C}$ 消化 3 h 以上, 每 30 min 轻轻摇动无菌 EP 管。②加入等体积的水饱和酚 (pH = 8.0), -20 $^{\circ}\text{C}$ 放置 4~8 h。8 000 r/min 离心 15 min, 将上清液小心转至另一干净的 1.5 ml 离心管中 (防止搅动界面上的物质)。③加入等体积的苯酚: 氯仿: 异戊醇 (25:24:1) 混合液, 缓慢混匀约 20 min 至形成乳浊液, 8 000 r/min 离心 15 min, 收集上清液。④加入等体积的氯仿: 异戊醇 (24:1), 缓慢混匀约 20 min 至形成乳浊液, 8 000 r/min 离心 15 min, 收集上清液。⑤加入等体积的异丙醇混匀, -20 $^{\circ}\text{C}$ 放置 1~2 h, 取出后 13 000 r/min 离心 5 min 收集 DNA 沉淀。⑥倒去上清, 加入 500 μl 70%

乙醇洗涤 DNA, 颠倒管子数次, 用 13 000 r/min 离心 3 min; 重复此步骤一次。倒去上清, 空气中干燥 DNA 沉淀至无乙醇残留, 将 DNA 沉淀溶解于 30 μl 的 TE 缓冲液中。

磁珠法采用美基生物 (Magen) 公司的磁珠法组织与血液 DNA 提取试剂盒 (D631502) 和说明书进行提取, 整个流程包括裂解、结合、洗涤、洗脱四步, 在短时间内即可完成, 全程需要用到磁力架, 最后将洗脱 DNA 溶解于 30 μl TE 缓冲液。

1.4 DNA 质量检测

所有实验最终提取到的 DNA 样品用 1% 的琼脂糖凝胶放置于电泳槽 (君意 JY300HE) 中进行电泳检测, 电泳条件为 80 V 40 min。在凝胶成像系统 (AXYGEN) 中透射拍照获得电泳胶图。此外, 通过核酸蛋白浓度测定仪 (Eppendorf AG 22331, Hamburg) 测定各组样品的 DNA 浓度。

1.5 PCR 扩增与检测

对不同取样方法获取的 DNA, 进行生物条形码常用基因——线粒体 *COI* 基因的 PCR 扩增, 以验证所获得 DNA 的物种特异性, 引物序列为, Chmf4: 5'-TYT CWA CWA AYC AYA AAG AYA TCG G-3', Chmr4: 5'-ACY TCR GGR TGR CCR AAR AAT CA-3', 其中, 兼并碱基 Y 为 C/T、W 为 A/T、R 为 A/G, 目标片段长 600 bp 左右 (Che et al. 2012)。PCR 扩增反应体系为 25 μl , 包括 12.5 μl 的 2 \times *Taq* Plus Master Mix, 上下游引物各 1 μl (10 $\mu\text{mol/L}$), (885.9 \pm 353.1) mg/L DNA 模板 1 μl , 补充 ddH₂O 至 25 μl 。PCR 反应条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min; 90 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s, 50 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s, 36 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 然后 4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存。PCR 产物送擎科生物公司 (长沙) 进行测序, 测序结果通过 DNA star 软件包组装拼接后在 NCBI 中使用 Nucleotide collection (nr/n) 数据库进行 BLAST 物种比对, 以相似性程度判断取样中的 DNA 是否来自目标物种大鲵。

2 结果

2.1 样品的采样后行为与采食观察

通过 4 种不同取样方法采样后, 对放回养殖缸(皮肤脱落物组本身未转移大鲵)中的大鲵进行行为观察, 并于 2 d 后恢复投喂。各组大鲵未见明显行为异常, 观察期间均静卧缸底, 所有组别 2 d 后均正常进食。同样, 在一周后再次使用皮肤拭子采样后, 大鲵日常行为和进食行为亦未见明显异常。

2.2 不同取样方法对比分析

通过对 4 种取样方法获得的大鲵样品使用试剂盒提取 DNA, 所有样品都获得了 DNA 电泳条带(图 3a), 但所获的 DNA 片段长度和完整度有明显差异。其中, 口腔拭子样品电泳条带较亮, 且主要集中在长片段的区域; 皮肤拭子样品电泳条带较弱, 具有较明显的长片段区域, 亦有一些少量弥散的短片段区域; 皮肤脱落物样品 DNA 降解最为严重, 从长片段区域弥散分布到短片段, 且有相对较亮的短片段条带; 尾静脉血样品 DNA 条带最为清晰明亮完整, 且主要集中在长片段区域(图 3a)。

通过核酸蛋白浓度测定仪测定各组样品的浓度(图 3b), 平均 DNA 浓度最高的样本为尾静脉血, 其次依次为皮肤脱落物、口腔拭子和皮肤拭子。其中, 皮肤拭子和皮肤脱落物组三个重复之间浓度差异相对较大, 而口腔拭子和尾静脉血组 3 个重复之间浓度较为相似。

2.3 DNA 提取方法比较

选择最易于操作的皮肤拭子采样, 利用试剂盒法、高盐法、苯酚氯仿法和磁珠法提取 DNA, 凝胶电泳结果表明, 所有样品均能够获得 DNA 条带。从电泳图上来看, 4 种方法所获得的电泳条带整体都较为清晰, 且主要聚集在长片段区域, 但所有条带均较暗, 个别样品有降解成小片段(图 3c)。苯酚氯仿法和磁珠法所提取 DNA 的平均浓度优于试剂盒法和高盐法(图 3d), 但试剂盒法和高盐法方法内部三个重复之间差异相对更大, 这一程度体现了

样品质量的随机性。

2.4 PCR 扩增和结果鉴定

以口腔拭子、皮肤拭子、皮肤脱落物和尾静脉采血 4 种 DNA 采样方法获得的大鲵 DNA 为模板, 对其线粒体 COI 基因进行 PCR 扩增和测序。电泳结果表明, 尽管 DNA 模板质量和浓度有一些差别, 但所有样品都能扩增出与目标基因 COI 相似长度的片段(图 3e), 这说明所有方法都能较好地满足一般的基因片段测序要求。将每种方法随机挑选 1 管 PCR 产物进行一代测序, 测序结果经 BLAST 比对, 与 NCBI 数据库中中国大鲵的 COI 序列匹配度均在 99% 以上(图 3f)。所有 4 条 COI 基因序列均已上传到 NCBI 中(GenBank 登录号 ON025797 ~ ON025800)。

3 讨论

3.1 不同 DNA 取样方法的词义范畴

尽管非损害性 DNA 取样属于较新的名词, 其与非损伤性取样(狭义或广义)实际上有很大的重叠, 但非损害性取样与非损伤性取样不同的是, 其不再强调是否接触或侵入到动物, 而更多地从功能方面关注是否对动物的适合度、行为或福利产生影响(Lefort et al. 2022)。这并非意味着在取样方法上有更大的随意性, 而是更多地强调针对采样对象的特点和研究目的, 来制定相对合理的取样方法。本研究针对狭义非损伤性取样方法(不接触)较难获得 DNA 的水生有尾动物大鲵, 采用 4 种不同的取样方法, 均没有发现对实验对象行为或进食方面产生影响。实验后半年内, 所有实验用鲵均正常存活。尽管长期的野外适合度、行为和福利研究在本实验中不适用或难以获得, 但从取样后短期人工养殖存活情况和行为观察来看, 4 种取样方法对实验对象均未产生明显的负面影响。参照 Lefort 等(2022)针对取样方法的最新词义, 本研究探索的 4 种取样方法符合非(或微)损害性 DNA 取样范畴。

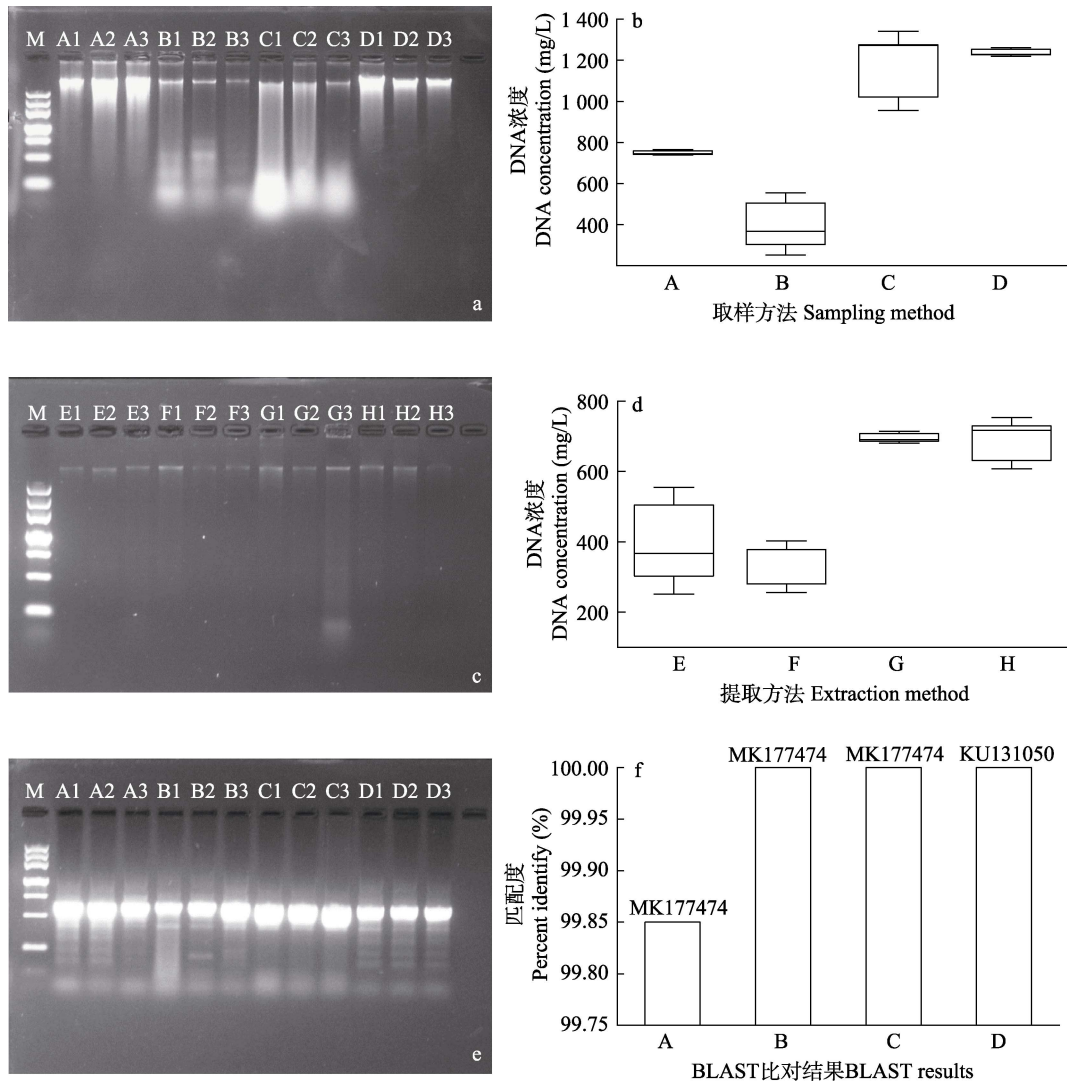


图 3 凝胶电泳检测、DNA 浓度测定和 BLAST 比对结果

Fig. 3 Results of gel electrophoresis, DNA concentration and BLAST from NCBI

a. 4 种取样方法 DNA 电泳图; b. 4 种取样方法 DNA 浓度图; c. 4 种提取方法 DNA 电泳图; d. 4 种提取方法 DNA 浓度图; e. *COI* 基因 PCR 扩增电泳图; f. *COI* 序列 BLAST 比对结果。

a. DNA electrophoretogram of four sampling methods; b. DNA concentrations of four sampling methods; c. DNA electrophoretogram of four extraction methods; d. DNA concentrations of four extraction methods; e. PCR electrophoretogram of *COI* gene; f. BLAST results of *COI* fragments.

电泳图: M. DNA 分子量标准, 从上至下分别为 4 500 bp、3 000 bp、2 000 bp、1 200 bp、800 bp、500 bp、200 bp; A. 口腔拭子; B. 皮肤拭子; C. 皮肤脱落物; D. 尾静脉采血; E. 试剂盒法; F. 高盐法; G. 苯酚氯仿法; H. 磁珠法。图 f 中的 MK177474 和 KU131050 分别为 A、B、C 和 D 采样法 DNA 序列 NCBI 比对相似度最高的序列, 均为大鲵的 *COI* 区域。

Electrophoresis diagram: M. DNA marker. The DNA markers from up to down show lengths of 4 500 bp, 3 000 bp, 2 000 bp, 1 200 bp, 800 bp, 500 bp and 200 bp, respectively. A. buccal swabbing; B. skin swabbing; C. shed skin sampling; D. tail venous blood sampling; E. kit method; F. high salt method; G. phenol-chloroform method; H. magnetic bead method. MK177474 and KU131050 in Fig. f represent the best identify records in NCBI of sampling method A, B, C and D, and all the queries hit with *COI* fragments of *Andrias davidianus*.

3.2 不同 DNA 取样方法的优缺点和适用性

尽管本研究采用的 4 种非损害性取样方法均获得了目标物种的 DNA, 并能够较好地满足一般 PCR 扩增和分子遗传学研究需求, 但不同方法的提取效果各有不同。为方便日后研究者参考, 总结了这 4 种方法的优缺点和注意事项(表 1), 并进一步探讨如下。

口腔拭子采样: 口腔拭子中主要的样品来

自新鲜的口腔粘膜细胞和上皮细胞, 因此其 DNA 质量相对较好。本研究揭示其提取的 DNA 条带亮且片段长而完整, 这与前人的研究结果较为一致 (Prunier et al. 2012)。口腔拭子取样方法较简单快速, 无创且易于现场操作, 获得的 DNA 质量也较好 (Gallardo et al. 2012)。但需要特别注意的是打开动物口腔时要避免对动物造成应激和伤害, 一般使用比较圆钝的工

表 1 不同 DNA 取样方法和提取方法的优缺点及注意事项

Table 1 Advantages, disadvantages and corresponding precautions of different DNA sampling and extraction methods

方法 Methods	优点 Advantages	缺点 Disadvantages	注意事项 Precautions
取样方法 Sampling methods			
口腔拭子 Buccal swabbing	DNA 质量高, 片段长且完整性较好, 取样简单、快速、易于操作 DNA with high quality, fragment length and integrity; sampling simple, fast and easy to carry out	动物口腔难打开, 不太适用于小型或幼体期的动物 Difficult to open the animal mouth, and not applicable for small or juvenile animals	操作轻柔, 避免造成动物口腔出血 Handle the animal gently to avoid mouth bleeding
皮肤拭子 Skin swabbing	样品来源多, 取样简单、快速、方便, 适合多数非皮毛类动物 Sample source abundant, sampling simple, fast and easy, suitable for most non-fur/feather animals	DNA 浓度较低, 存在降解, 可能产生污染 DNA with low concentrations, may degrade and contaminate	在擦拭皮肤前清洗动物体表, 降低污染 Wash the skin surface before swabbing to decrease the risk of contamination
皮肤脱落物 Shed skin sampling	样品量大, 对动物几乎无干扰, 针对蜕皮动物在家养环境下易于获得 Sample volume large, without disturbances, easy to collect in domestic conditions for skin-shedding animals	DNA 片段短, 降解较严重, 野外条件下样品不易获得 DNA fragments short with severe degradation, not available in wild environment	尽量选取最新鲜的皮肤脱落物 Collect the shedding skins as early as possible
尾静脉采血 Tail venous blood sampling	DNA 质量好, 浓度高, 可用于高通量测序等研究 DNA with good quality and high concentration, suitable for high-throughput sequencing	需专业操作, 血液样品保存时间相对较短 Operation requires professional skills, blood samples can store in relatively short periods	提高采样熟练度, 避免血液样品反复冻融 Improve sampling proficiency and avoid repetitive freeze-thawing of blood samples
提取方法 Extraction methods			
试剂盒法 Kit method	提取 DNA 质量好, 纯度稳定性较高, 成本适中 Extracted DNA with good quality, high purity and stability, moderate cost	需要较多的试剂和耗材, 操作步骤较多 Need lots of reagents and consumables, and multiple operation procedures	在用含有乙醇的漂洗液时, 注意需彻底晾干, 以免影响后续实验 Dry DNA thoroughly when using ethanol-containing rinse solution to avoid affect subsequent experiments
高盐法 High salt method	操作步骤相对最为简单快捷, 耗时短, 成本低 Extracted DNA with the most simple and fast procedures, less time-consuming and low cost	试剂具一定毒性, 提取 DNA 量少, 含杂质多 Some reagents toxic, the extracted amount of DNA less, and with some impurities	操作时避免剧烈震荡, 漂洗时注意晾干酒精 Avoid drastic shaking during operation, dry DNA to alcohol free
苯酚氯仿法 Phenol-chloroform method	所用均为常见试剂, 对实验条件要求低, 成本低 Commonly reagents and laboratory conditions required, low cost	使用的苯酚、氯仿等试剂具一定毒性, 含杂质较多 Reagents toxic such as phenol and chloroform, with some impurities	防范试剂毒性, 避免剧烈震荡, 液相分层时避免过度吸入废液层 Prevent poisoning and avoid drastic shaking, avoid excessive imbibing the waste liquid layer
磁珠法 Magnetic bead method	DNA 纯度高、浓度大, 方法灵敏便于批量化和自动化操作 Extracted DNA with high purity and concentration, the method sensitive for operating massively and automatedly	需配备磁力分离装置或自动提取仪, 试剂盒成本高 Need magnetic separation devices or automatic extractors, kits with high cost	首次使用需充分震荡以打散磁珠, 磁力架吸附磁珠的时间要准确 Separate the magnetic bead fully at the first use, and keep proper time for adsorbing in the magnetic shelf

具如塑料勺等避免口腔出血，另外大型两栖动物相对小型动物打开口腔的操作更为容易 (Pidancier et al. 2003, Ringler 2018)。

皮肤拭子采样：皮肤拭子的样品来源主要为皮肤上皮细胞，而上皮细胞中部分为死细胞，因此整体来说，皮肤拭子所获得的 DNA 量和片段长度不如口腔拭子，且存在一定程度的降解，这与前人的研究结果也较为一致 (Prunier et al. 2012)。但也有研究报道在林蛙 (*Rana temporaria*) 中，皮肤拭子与口腔拭子获得的 DNA 质量相当 (Müller et al. 2013)。皮肤拭子采样一个重要的注意事项是要避免样品受到表皮上粘附的细菌或其他来源的 DNA 污染，这需要在采样时通过纯水或生理盐水对动物体表进行清洗。

皮肤脱落物采样：两栖动物脱落的皮肤是高度角质化的真皮组织，是一类非常有用且量大的样品来源，但长期被研究者所忽视 (Xu et al. 2020)。部分原因在于皮肤脱落物在人工养殖条件下较为常见，但在野外一般不易获得，这也就限制了其使用范围。本研究表明，蜕皮样品的 DNA 降解最为严重，获取的 DNA 长度也较短。尽管如此，蜕皮组织所获得的 DNA 仍然可以进行有效的 PCR 扩增，在满足研究需要的前提下，蜕皮不失为一种干扰度最小的采样方法。

尾静脉血采样：本研究表明血液样本中蕴含的 DNA 质量整体最好，片段长且浓度高，针对红细胞中含有细胞核的动物而言非常实用。在确保对动物伤害较小的情况下，血液样本保障了一些对 DNA 质量有很高要求的研究得以进行，如长片段文库的构建等。随着采血工具的优化和采血的规范化，一般也不会造成大面积的创口和感染，对物种生存和灵活性也没有太大的影响 (Mendoza et al. 2012, Lawrence et al. 2020)。但采血对操作者有一定的技术要求，需要积累一定经验才能准确找到目标血管的位置。

3.3 不同 DNA 提取方法的优缺点和适用性

本研究基于人工养殖大鲵的皮肤拭子样品，对 4 种常用的 DNA 提取方法开展进一步的对比研究。结果显示，4 种方法均能获得片段长度相似的 DNA 条带，这表明目前常规的 DNA 提取方法均较为有效。其中，苯酚氯仿法和磁珠法获得的 DNA 浓度最高，从这一点来看其具有一定的优越性。但是，苯酚、氯仿都是有毒物质，且其提取的 DNA 有时含有较多的杂质，因此，并不建议优先采用。磁珠法是近几年才研发的 DNA 提取方法，具有较好的提取效果，但其所配套的试剂盒成本相对最高，且需要磁力架等特定设备。高盐法和试剂盒法所提取的 DNA 浓度相当，均能够满足一般的使用需求。高盐法同样含有有毒物质，且提取过程较为粗糙，所含杂质也较多；但其优点是操作快捷，实验耗时最短。试剂盒法是目前最为广泛使用的 DNA 提取方法，尽管不同生物公司推出了多种不同试剂盒产品，但其基本原理多数都是通过吸附柱高效、专一地与 DNA 片段结合，再通过洗涤液逐步去除蛋白等杂质，最后洗脱并获得较纯的 DNA。试剂盒法一般不含有毒物质，且操作简便，耗时适中，价格实惠，是本研究优先推荐的方法。然而，值得注意的是，不同动物或不同组织样品特性不同，不同方法的适用性可能存在一定偏差。如艾永斌等 (2018) 对野外采集的两栖类皮肤拭子采样的研究表明，高盐法不如试剂盒法稳定有效；但 Xu 等 (2020) 针对两种蛙类蜕皮的研究表明，其改进的高盐法提取效果优于苯酚氯仿法和试剂盒法。

鉴于目前在野生动物研究领域非损害性取样方法还相对较少被采用的现状，未来还需开展更多有关取样方法有效性和针对物种生存适合度影响的研究，以最大程度地实现减少干扰和满足需求的平衡。本文基于中国大鲵总结的口腔拭子、皮肤拭子、皮肤脱落物和尾静脉采血等 4 种取样方法，以及试剂盒法、高盐法、

苯酚氯仿法和磁珠法等 4 种 DNA 提取方法的优缺点和注意事项, 将为大鲵以及其他珍稀濒危水生动物或两栖动物的分子生态学相关研究提供借鉴。

致谢 本论文在设计、撰写过程中得到了吉首大学谭敦炎教授和刘志霄教授的大力支持; 样品的准备和实验过程得到了吉首大学朱深海副教授, 张家界竹园大鲵生物科技公司陈荣桂、桑植县唯美大鲵生物科技有限公司熊恩国等的大力支持, 在此一并致谢。

封面动物 中国大鲵, 蒋万胜 2021 年 5 月 30 日摄于湖南省张家界市桑植县澧水流域。

参 考 文 献

- Baillon L, Pierron F, Oses J, et al. 2016. Detecting the exposure to Cd and PCBs by means of a non-invasive transcriptomic approach in laboratory and wild contaminated European eels (*Anguilla Anguilla*). *Environmental Science and Pollution Research*, 23(6): 5431–5441.
- Balázs G, Vörös J, Lewarne B, et al. 2020. A new non-invasive in situ underwater DNA sampling method for estimating genetic diversity. *Evolutionary Ecology*, 34(4): 633–644.
- Brzeziński M, Romanowski J. 2006. Experiments on sprinting activity of otters (*Lutra lutra*) in the Bieszczady Mountains, southeastern Poland. *Mammalia*, 70(1/2): 58–63.
- Che J, Chen H M, Yang J X, et al. 2012. Universal COI primers for DNA barcoding amphibians. *Molecular Ecology Resources*, 12(2): 247–258.
- Cohen O, Barocas A, Geffen E. 2013. Conflicting management policies for the Arabian wolf *Canis lupus arabs* in the Negev Desert: is this justified? *Oryx*, 47(2): 228–236.
- Gallardo C E, Correa C, Morales P, et al. 2012. Validation of a cheap and simple nondestructive method for obtaining AFLPs and DNA sequences (mitochondrial and nuclear) in amphibians. *Molecular Ecology Resources*, 12(6): 1090–1096.
- Janse M, Kappe A L, van Kuijk B L M. 2013. Paternity testing using the poisonous sting in captive white spotted eagle rays *Aetobatus narinari*: a non-invasive tool for captive sustainability programmes. *Journal of Fish Biology*, 82(3): 1082–1085.
- Lawrence M J, Raby G D, Teffer A K. 2020. Best practices for non-lethal blood sampling of fish via the caudal vasculature. *Journal of Fish Biology*, 97(1): 4–15.
- Lefort M C, Cruickshank R H, Descovich K, et al. 2022. Blood, sweat and tears: a review of non-invasive DNA sampling. *Peer Community Journal*, 2(16): 2804–3871.
- Liang G, Geng B R, Zhao E M. 2004. *Andrias davidianus*. The IUCN Red List of Threatened Species. [DB/OL]. [2022-03-02]. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2004.RLTS.T1272A3375181.en>.
- Liang Z Q, Chen W T, Wang D Q, et al. 2019. Phylogeographic patterns and conservation implications of the endangered Chinese giant salamander. *Ecology and Evolution*, 9(7): 3879–3890.
- Maddock S T, Lewis C J, Wilkinson M, et al. 2014. Non-lethal DNA sampling for caecilian amphibians. *The Herpetological Journal*, 24(4): 255–260.
- Mendoza A M, García-Ramírez J C, Cardenas-Henao H. 2012. Blood puncture as a nondestructive sampling tool to obtain DNA in frogs: comparison of protocols and survival analysis. *Molecular Ecology Resources*, 12(3): 470–475.
- Miller H C. 2006. Cloacal and buccal swabs are a reliable source of DNA for microsatellite genotyping of reptiles. *Conservation Genetics*, 7(6): 1001–1003.
- Müller A S, Lenhardt P P, Theissinger K. 2013. Pros and cons of external swabbing of amphibians for genetic analyses. *European Journal of Wildlife Research*, 59(4): 609–612.
- Murphy R W, Fu J Z, Upton D E, et al. 2000. Genetic variability among endangered Chinese giant salamanders, *Andrias davidianus*. *Molecular Ecology*, 9(10): 1539–1547.
- O'Toole M T. 2005. *Miller-Keane Encyclopedia and Dictionary of Medicine, Nursing, and Allied Health*. 7th ed. Philadelphia: Saunders.
- Pidancier N, Miquel C, Miaud C. 2003. Buccal swabs as a non-destructive tissue sampling method for DNA analysis in amphibians. *The Herpetological Journal*, 13(4): 175–178.
- Prunier J, Kaufmann B, Grolet O, et al. 2012. Skin swabbing as a new efficient DNA sampling technique in amphibians, and 14 new microsatellite markers in the alpine newt (*Ichthyosaura alpestris*). *Molecular Ecology Resources*, 12(3): 524–531.

- Ringler E. 2018. Testing skin swabbing for DNA sampling in dendrobatid frogs. *Amphibia-Reptilia*, 39(2): 245–251.
- Taberlet P, Waits L P, Luikart G. 1999. Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *Trends in Ecology & Evolution*, 14(8): 323–327.
- Waits L P, Paetkau D. 2005. Noninvasive genetic sampling tools for wildlife biologists: a review of applications and recommendations for accurate data collection. *The Journal of Wildlife Management*, 69(4): 1419–1433.
- Xu Y, Guan T, Liu J, et al. 2020. An efficient and safe method for the extraction of total DNA from shed frog skin. *Conservation Genetics Resources*, 12(2): 225–229.
- Yan F, Lü J C, Zhang B L, et al. 2018. The Chinese giant salamander exemplifies the hidden extinction of cryptic species. *Current Biology*, 28(10): R590–R592.
- Zemanova M A. 2019. Poor implementation of non-invasive sampling in wildlife genetics studies. *Rethinking Ecology*, 4: 119–132.
- Zemanova M A. 2021. Noninvasive genetic assessment is an effective wildlife research tool when compared with other approaches. *Genes*, 12(11): 1672.
- 艾永斌, 杨旭升, 彭卫华, 等. 2018. 体表擦拭取样在两栖动物保护遗传学研究中的应用. *四川动物*, 37(4): 373–380.
- 蒋万胜, 兰香英, 王金秀, 等. 2022. 中国大鲵种质资源保护与利用研究进展. *水产学报*, 46(4): 683–705.
- 李军林, 舒青, 蒙世杰, 等. 2001. 非损伤性取样在朱鹮种群遗传研究中的应用. *遗传*, 23(3): 217–219.
- 李明, 魏辅文, 饶刚, 等. 2001. 非损伤性取样法在保护遗传学研究中的应用. *动物学报*, 47(3): 338–342.
- 鲁云凤, 文祯中, 原国辉, 等. 2004. 3种血液抗凝剂的抗凝效果及对 RAPD 反应影响的研究. *南阳师范学院学报: 自然科学版*, 3(12): 55–57.
- 王李玲, 胡靖扬, 匡卫民, 等. 2021. 非损伤性取样样品中富集宿主 DNA 的研究进展. *兽类学报*, 41(3): 284–295.
- 王琰, 钱晨, 丁晶晶, 等. 2014. 季节和天气因素对麋鹿非损伤性遗传取样的影响. *南京师大学报: 自然科学版*, 37(1): 123–127.
- 武芳婷, 吴弘, 赵大鹏. 2022. 东方白鹳粪便总 DNA 种取法比五种提取方法的比较. *动物学杂志*, 57(2): 300–309.
- 杨丽萍, 蒙子宁, 刘晓春, 等. 2011. 中国大鲵 5 个野生种群的 AFLP 分析. *中山大学学报: 自然科学版*, 50(2): 99–104.
- 周江, 王思维, 肖宁, 等. 2021. 中国大鲵复合体谱系多样性及贵州分布中国大鲵的分类评估. *贵州师范大学学报: 自然科学版*, 39(2): 1–14.