

基于环境 DNA 的岩原鲤检测及生物量评估

闫卉果¹, 董智玲¹, 马婷婷¹, 张连博¹, 王晓艳²,
叶华¹, 姚维志¹, 何文平^{1*}

(1. 西南大学水产学院, 淡水鱼类资源与生殖发育教育部重点实验室, 重庆 400715;

2. 浙江海洋大学, 国家海洋设施养殖工程技术研究中心, 浙江 舟山 316022)

摘要: 为建立岩原鲤基于环境 DNA (eDNA) 的实时荧光定量 PCR (qPCR) 检测方法, 准确鉴别岩原鲤并探讨 eDNA 浓度与其生物量的定量关系, 实验根据岩原鲤 mtDNA 中 12S *rRNA* 基因序列设计 eDNA 引物和 TaqMan 探针, 利用 PCR 扩增出岩原鲤 12S *rRNA* 基因的序列, 克隆入 pMD19-T 载体, 构建重组质粒作为 qPCR 标准; 使用梯度稀释质粒标准品作为模板, 进行 qPCR 扩增, 制作标准曲线, 建立岩原鲤 qPCR 检测方法, 并评价其特异性、灵敏性和应用效果。结果显示, 引物和 TaqMan 探针对供试的岩原鲤样品出现荧光增长曲线, 显示阳性扩增, 而其他鱼类和空白对照均未得到扩增信号, 表现为阴性; qPCR 的阈值循环数 (C_T) 与标准品拷贝数的线性关系好, 且线性范围广, 获得的标准曲线相关系数 (R^2) 达到 0.999, 检测限 DNA 浓度为 5×10^{-6} ng/ μ L, 扩增效率为 94.7%; 检测养殖不同数量岩原鲤的水体中 eDNA 浓度, 目标 DNA 浓度和岩原鲤数量存在线性正相关性 ($R^2=0.957$), 得到岩原鲤 DNA 浓度与其个体数量的相关性曲线: $y = 131\ 546x + 77\ 623$; 去除岩原鲤后, eDNA 的拷贝数与时间负相关, 其在水体环境中的存留时间为 17 d。研究表明, 该岩原鲤 eDNA 引物和 TaqMan 探针既能应用于水体中岩原鲤的定性检测, 特异性高、时效性好; 又能定量检测出环境中岩原鲤的密度, 有利于反映岩原鲤在不同采样点的生物量及时空动态, 从而为评价岩原鲤人工放流效果和管理保护资源提供参考。

关键词: 岩原鲤; 环境 DNA; 引物; 探针; 生物量

中图分类号: S 931

文献标志码: A

岩原鲤 (*Procypris rabaudi*) 俗称黑鲤或岩鲤, 隶属于鲤形目 (Cypriniformes) 鲤科 (Cyprinidae) 原鲤属 (*Procypris*), 主要分布在长江上游和金沙江中下游。岩原鲤属于中国特有物种, 其肉质细嫩鲜美、含肉率高、无肌间刺, 是人们喜爱的名优经济鱼类。但由于捕捞过度和水域环境污染, 自 20 世纪 70 年代以来, 其野生资源急剧减少, 已被列为易危物种^[1] 和濒危鱼类^[2]。岩原鲤野生种群在 2021 年被《国家重点保护野生动物名录》列为

二级保护动物, 是我国重要的水产种质资源和遗传物种基因库。监测种群的密度和分布是濒危物种保护的一个重要组成部分^[3-4]。鱼类监测通常是基于直接捕获、电捕鱼、诱捕和视觉观察获得数据, 而岩原鲤多栖息于底质多岩石的深水底部, 难于捕获或观察, 影响鉴定准确率; 长江干流自 2020 年起禁止捕捞十年, 使得直接监测和评估岩原鲤种群愈发困难。因此应采用破坏性较小的调查方法, 改善对受保护物种的生态监测, 并评估

收稿日期: 2021-10-09 修回日期: 2021-10-24

资助项目: 国家自然科学基金 (32071651); 重庆市自然科学基金 (cstc2020jcyj-msxmX0438); 重庆市社会民生科技创新专项 (cstc2016shmszx80087); 中央高校基本科研业务费专项 (XDJK2019C025)

第一作者: 闫卉果 (照片), 从事鱼类生物学研究, E-mail: yanhuiguo1999@163.com

通信作者: 何文平, 从事鱼类生物学研究, E-mail: hewenping2008@163.com



种群现状。

环境 DNA (eDNA) 技术是基于环境样本, 如土壤、空气或水, 以确定是否有目标物种的 DNA 存在, 而不需要直接取样个体^[5]。直接从水体和沉积物样本中提取的 DNA 含有脱落细胞、卵子和幼体, 这些在常规调查中可能被忽视。因此, 这是一种非常适合罕见或濒危物种的非侵入性取样方法, 已成功应用于不同水生系统中的多个物种^[6-8]。对于鱼类群落, 有研究表明 eDNA 方法可以在湖泊或河流调查中对传统采样方法起到补充作用^[9]。此外, eDNA 分析需要更少的采样工作, 其成本可能比传统方法低 67%^[10]。eDNA 的检测可以基于标准 PCR, 在凝胶电泳上可视化, 或使用更敏感的定量 PCR 方法^[11]。水样中 eDNA 检测的 2 种最常见方法: ①通过实时荧光定量 PCR (qPCR)^[12], 使用特定特异性引物和探针进行单物种检测; ②使用针对短链线粒体 DNA 条形码区-eDNA 元编码通用引物对 eDNA 进行 PCR 扩增后, 通过高通量测序 (NGS) 进行多物种检测^[13-14]。水样 eDNA 浓度的测量既具有成本效益又是一种无破坏性的方法, 许多研究使用定量 PCR 方法 (qPCR) 来量化鱼类种群的丰度^[15-17]。截至目前, 尚未开发出对岩原鲤特异的 eDNA 引物或探针, 也没有研究报道岩原鲤 eDNA 浓度与生物量的关系。为了确定 eDNA 信号的时空尺度, 并准确估计物种在环境中的存在/缺失和丰度, 了解 eDNA 的持久性和降解过程非常重要。

实验根据岩原鲤 mtDNA 中 12S *rRNA* 基因序列, 设计引物和特异性探针, 建立岩原鲤 qPCR 检测方法, 以达到快速检测岩原鲤, 并在长江鱼类中准确区分岩原鲤的目的; 另外, 探讨了岩原鲤 eDNA 浓度与生物量的关系以及 eDNA 在水中的降解时间。

1 材料与方法

1.1 岩原鲤特异性引物及探针的设计与验证

设计引物和探针 根据岩原鲤 mtDNA 中

12S *rRNA* 基因序列 (GenBank: EU082030.1; www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank), 使用 Primer Express 3.0.1 软件设计岩原鲤引物 YYLF1/YYLR1 和探针 YYL-MGB1 (表 1), 引物和探针由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。qPCR 探针 5'用 6-FAM (荧光素) 进行标记, 3'用 MGB 进行修饰。包括引物在内的总扩增子大小为 149 bp。探针和引物序列与 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 的核苷酸数据库进行匹配, 使用 BLASTn 评估岩原鲤序列特异性 (表 2)。虽然岩原鲤和其他鱼类之间的 12S *rRNA* 普遍缺乏种间变异性, 但探针上至少有 2 个碱基不匹配。

提取鱼类肌肉 DNA 与其他鱼类进行体外试验, 以确保该试验没有扩增出其他鱼类。取岩原鲤和其他鱼类肌肉 (表 3) 放入研钵中, 加液氮研磨成粉末, 用 DNeasy[®] Blood&Tissue Kit (Qiagen 公司) 提取样品肌肉 DNA。实验用岩原鲤采自四川省农业科学院水产研究所宜宾基地, 其他鱼类取自重庆市北碚区。

实时荧光定量 PCR 检测 使用 Bio-Rad 伯乐 CFX384 Touch 荧光定量 PCR 仪, 通过 qPCR 测定以上 9 个 DNA 样品。实时荧光定量 PCR 扩增体系 20 μ L (生工生物工程股份有限公司 2 \times TaqMan Fast qPCR Master Mix): 2 \times TaqMan Fast qPCR Master Mix 10 μ L, DNA Buffer (Optional) 2 μ L, 上下游引物 YYLF1/YYLR1 (10 μ mol/L) 各 0.4 μ L, YYL-MGB1 探针 (10 μ mol/L) 0.4 μ L, DNA 模板 1.0 μ L, 超纯水补至 20 μ L。实时荧光定量 PCR 扩增在 Bio-rad CFX Connect PCR 仪上进行。打开“Bio-Rad CFX Maestro”, 设置 PCR 反应条件, 两步法扩增反应程序: 预变性 94 $^{\circ}$ C 3 min; 然后 94 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s 循环 40 次。每个平板有 3 个阴性对照, 以确保在 qPCR 平板的制备过程中没有发生污染。使用 Bio-Rad CFX Maestro 软件分析 qPCR 的结果。

1.2 岩原鲤重组质粒构建及引物与探针灵敏度测试

PCR 扩增 12S *rRNA* 基因片段 以岩原鲤

表 1 引物和探针

Tab. 1 Primer and probe

名称 name	类型 type	长度/bp length	引物/探针序列 (5'-3') primer/probe sequence (5'-3')
YYLF1	上游引物 forward primer	22	GAAGTGGGAAGAAATGGGCTAC
YYLR1	下游引物 reverse primer	18	GTGACGGGCGGTGTGTAC
YYL-MGB1	探针 probe	21	ATCATAGAACATACGAACAT

表 2 岩原鲤 TaqMan 探针与 14 种鱼类序列的比对结果

Tab. 2 *P. rabaudi* TaqMan probe with comparison to the 14 kinds of fish DNA sequences

种名 species name	探针序列 probe sequence
岩原鲤 <i>P. rabaudi</i>	734 AT--CATAGAACATCACGAA-CAT 755
鲫 <i>Carassius auratus</i>	734 A--CATAGAAATATACGAA-CAT 755
黄颡鱼 <i>Pelteobagrus fulvidraco</i>	734 TACACATAGAAATATACGAAATGA 755
泥鳅 <i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	734 TA--ATAAGAATATACGGA-CA 755
草鱼 <i>Ctenopharyngodon idella</i>	734 T--CACAGAACACTACGAA-CAT 755
鲢 <i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	734 T--CACAGAACACTACGAA-CAT 755
鳊 <i>Aristichthys nobilis</i>	734 T--CACAGAACACTACGAA-CAT 755
麦穗鱼 <i>Pseudorasbora parva</i>	734 T--TATAGAAATATACGAAATCAT 755
鲤 <i>Cyprinus carpio</i>	734 A--TATAGAAATATACGAA-CAT 755
长薄鳅 <i>Leptobotia elongata</i>	734 T--AATAGAAATAACACGAA-CA 755
齐口裂腹鱼 <i>Schizothorax prenanti</i>	734 TT--TATAGAAATATACGAA-CAT 755
青鱼 <i>Mylopharyngodon piceus</i>	734 T--CACAGAACACTACGAA-CAT 755
团头鲂 <i>Megalobrama amblycephala</i>	734 T--CACAGAACACTACGAA-CAT 755
乌原鲤 <i>Procypris mera</i>	734 G--CATAGAAATATCACGAA-CAT 755
胭脂鱼 <i>Myxocyprinus asiaticus</i>	734 C--TGTAGAAATAACACGAA-CA 755

注：不匹配通过阴影突出显示
Notes: mismatches are highlighted by shading

肌肉 DNA 为模板，PCR 扩增获得 12S *rRNA* 基因序列。扩增体系 (25 μL)：ddH₂O 9.5 μL，上下游引物各 1.0 μL，模板 1.0 μL，2× Es Taq Master Mix 12.5 μL。PCR 扩增条件为：94 °C 预变性 5 min；94 °C 变性 30 s，58 °C 退火 30 s，72 °C 延伸 30 s，35 个循环；72 °C 延伸 10 min；1.5% 琼脂糖凝胶电泳回收 DNA 产物。

重组质粒构建 将纯化后的 PCR 产物与 pMD19-T 载体相连，连接体系 (10 μL)：目的基因 4.0 μL，T 载体 1.0 μL，Solution I 5.0 μL。连接条件：16 °C 反应 30 min。

将保存于 -80 °C 的大肠杆菌 DH5α 感受态细胞置于冰盒上，融化感受态细胞 100 μL，然后加入 10 μL 连接产物，振荡混合均匀，置于冰中 30 min。42 °C 加热 45 s，冰中放置 1 min。加入 890 μL 无抗性 LB 液体培养基，37 °C、100 r/min

表 3 样品具体信息

Tab. 3 Sample specific information

DNA 样品名称 DNA sample ID	种名 species name	样品采集地 sample locality
YYL	岩原鲤 <i>P. rabaudi</i>	四川省宜宾市 Yibin, Sichuan
JY	鲫 <i>C. auratus</i>	重庆市北碚区 Beibei, Chongqing
HSY	黄颡鱼 <i>P. fulvidraco</i>	重庆市北碚区 Beibei, Chongqing
NQ	泥鳅 <i>M. anguillicaudatus</i>	重庆市北碚区 Beibei, Chongqing
HS	黄鳝 <i>Monopterus albus</i>	重庆市北碚区 Beibei, Chongqing
LY	鲢 <i>H. molitrix</i>	重庆市北碚区 Beibei, Chongqing
YY	鳊 <i>A. nobilis</i>	重庆市北碚区 Beibei, Chongqing
BDCWH	斑点叉尾鲷 <i>Ictalurus punctatus</i>	重庆市北碚区 Beibei, Chongqing
LiY	鲤 <i>C. carpio</i>	重庆市北碚区 Beibei, Chongqing

摇床振荡培养 60 min。用 100 μL 菌液涂布含有氨苄抗性的 LB 固体培养基。37 °C 倒置培养过夜 (12~16 h)。

菌液 PCR 鉴定阳性克隆 将 100 μL PCR 鉴定为阳性的菌液接种于 5 mL 含氨苄抗性的 LB 液体培养基中，37 °C、150 r/min 振荡过夜。取摇好的菌液 400 μL 与 50% 甘油管 1 : 1 混合，制两管。一管送生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序，另一管于 -20 °C 冰箱中保存。

分析公司反馈的测序结果，比对同源性。测序正确的阳性克隆菌和表达载体用高纯度质粒小提试剂盒提取质粒。采用 Nanodrop 2000c 核酸定量仪测定提取质粒的纯度与浓度。

岩原鲤特异性引物及探针的灵敏度测试 将 YYL 样品 DNA 构建的质粒进行 8 点连续稀释 (10 : 1)。连续稀释液的浓度范围为 5~5×10⁻⁷ ng/μL，编号 1~8 号，每个浓度 3 个重复，进行 qPCR 检测限测试，拟合出岩原鲤 DNA 标准曲线。反应体系和程序同 qPCR 检测，模板为 1 μL 10 倍梯度稀释的质粒 DNA。以连续稀释的质粒 DNA 为模板，测定 qPCR 检测的灵敏度。DNA 拷贝数参考文献 [18] 的方法计算。此外，为了避免污染，在一个与 qPCR 程序不同的房间里进行上述 qPCR 标准品的制备和添加^[19]。

1.3 检测水生环境中岩原鲤含量以及 eDNA 降解
水样采集 本实验在北碚实验鱼池的 500 L

养殖桶中进行。用 350 L 曝气水作为水源, 水温 7 °C 左右, 分别在 6 个桶中放入 0、1、2、4、8 和 16 尾岩原鲤, 平均体质量 46 g。期间不喂食、不换水, 共 7 d。在实验第 7 天, 从 6 个桶中分别采集 1 L 表层水样, 每次取 3 个平行样本, 用 1 L 无 DNA 蒸馏水作为阴性对照。

在 500 L 养殖桶中放入 25 尾岩原鲤, 平均体质量 46 g。养殖 7 d 结束后, 第 8 天上午 9:00 将桶中的鱼捞出, 在此后每天上午 9:00 采集 1 L 水样, 每次取 3 个平行样本, 连续采集 30 d, 1 L 无 DNA 蒸馏水作为阴性对照。

提取 eDNA 用津腾真空泵和 0.45 μm 孔径 PTFE 滤膜组合来过滤水样, 将 eDNA 富集在滤膜上。将滤膜装入 10 mL 无菌 EP 管内, -20 °C 保存。用 HiPure Water DNA Kit 水体 DNA 提取试剂盒 (Magen 美基生物) 参照说明书提取 eDNA, 设置空白在此过程中测试污染, 采用分光光度法测定 eDNA 浓度。为了降低污染风险, 采用无菌荧光设备、多手套更换和单独的专用实验室空间进行 eDNA 提取、PCR 前和 PCR 后处理。

进行 qPCR 反应 反应体系和反应程序同“实时荧光定量 PCR 检测”, 模板为 1 μL eDNA 样品。以不加模板的反应体系为阴性对照。绘制岩原鲤 DNA 拷贝数与其数量以及 eDNA 降解与时间之间的关系图, 分别计算出相关系数 R^2 。

2 结果

2.1 岩原鲤引物和荧光标记探针的选择

探针 YYL-MGB1 是一种寡核苷酸探针, 其 5' 末端连接有荧光基团, 3' 末端有淬灭剂 (图 1)。探针完整时, 报告基团发射的荧光信号被淬灭基团吸收; PCR 扩增时, 引物 YYLF1/YYLR1 与岩原鲤 mtDNA 完成高温变性、低温复性延伸的热循环, 并遵守聚合酶链式反应规律, 同时加入的探针 YYL-MGB1 与岩原鲤 mtDNA 互补, 在低温复性延伸阶段, 反应体系中 Taq 酶的 5' - 3' 外切酶活性将探针 YYL-MGB1 酶切降解, 使报告荧光基团和淬灭荧光基团分离, 从而荧光监测系统可以接收荧光信号, 即每有一条 DNA 链被扩增, 就形成一个荧光分子, 荧光信号的累积与 PCR 产物形成完全同步。

2.2 检测特异性

使用来自鱼类的基因组 DNA 评估实时荧光

```

AACCCCGTTCAACCTCACCACTTAGTACACCCAGCCTATATACCGCGTCGTAGCTTACCC
TGTGAAGGTAATAAAAGTAAGCAAATGGGCACAGCCAAAACGTGAGTTCGAGGTGTAGCGC
ATGAAGTGGGAAGAAATGGGCTACATTTTCTATCATAGAACATCAGCAACATGCACCATGAAA
YYLF1→                               ←YYL-MGB1
CAGTGCCTTAAAGGAGGATTTAGTAGTAAAAGGAATAAGAGTGTCCATTTGAACCCGGCTCTGA
GACCGGTACACACCCGCCCTCAGTCTCCCCGTGCAAAACGCATTAAAAATACTTAATACAACAG
←YYLR1
CACCGACGAGGGGAGGCAAGTCGTAACACCGGTAAGTGTACCGGAAGGTGCACCTGGATCAAA
CC
  
```

图 1 岩原鲤的 mtDNA 部分序列

加框表示引物探针序列

Fig. 1 Partial sequence of mtDNA of *P. rabaudi*

Frame is used to represent the primer and probe sequence

定量 PCR 检测的特异性。经 qPCR 扩增, 岩原鲤特异性引物 YYLF1/YYLR1 和探针 YYL-MGB1 对供试的岩原鲤样品出现荧光增长曲线, 有强荧光信号增加, 表现为阳性扩增, 2 尾岩原鲤 DNA 的扩增曲线参照图 2, 而供试的其余 8 种鱼类 (表 3) 和空白对照均未获得扩增信号, 表现为阴性, 样品扩增曲线参照图 2。结果表明, 该方法具有高度的特异性, 可用于准确检测和区分岩原鲤。

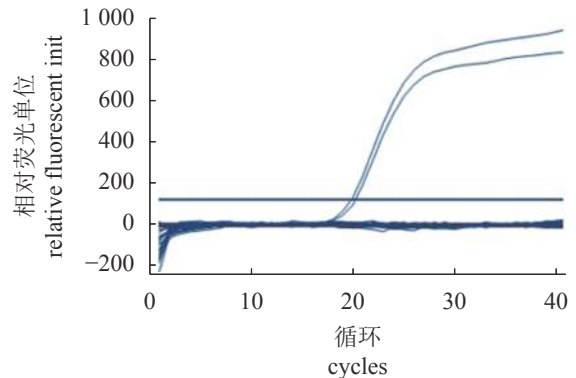


图 2 引物和探针对鱼类样品 qPCR 扩增结果示意图

Fig. 2 qPCR amplification of fish samples with primers and probes

2.3 提取 DNA 分析

从水体样本和鱼类肌肉中提取的 DNA 浓度分别为 18~21 和 56~592 ng/μL。提取的 eDNA 纯度为 1.7~2.1, 肌肉 DNA 纯度为 1.80~2.07。尽管有些 DNA 产量较低, 但总体 DNA 纯度 (A260/A280) 较高, 这表明获得的 DNA 样本质量较高。

2.4 岩原鲤引物及探针的灵敏度及标准曲线

经实时荧光定量 PCR 测定, C_t 值平均值分别为 1 号 13.49、2 号 16.30、3 号 20.16、4 号 23.56、5 号 27.08、6 号 30.34、7 号 34.07。YYL 质粒浓度 50 ng/μL。所以, 岩原鲤特异性探针 YYL-MGB1 的检测限 DNA 浓度为 50×10^{-7} ng/μL, 即 5×10^{-6} ng/μL。综上所述, 引物-探针集显示了良好的检

测极限,表明该引物-探针高度敏感。

根据 C_t 值对各稀释 DNA 初始浓度相对对数值拟合出岩原鲤 12S *rRNA* 基因 qPCR 标准曲线。标准曲线方程: $C_t = -3.455LSQ + 46.582$, 其中 LSQ 为稀释浓度相对对数值 (为一个对数值, 没有单位), C_t 值是循环阈值, 即达到设定最佳阈值时, 每个反应管中的扩增轮数。拟合优度 (R^2) = 0.999 2, 显示出良好的线性回归; 曲线斜率 (k) 为 -3.455。该检测显示 qPCR 的效率为 94.7%, 使用公式 $E(\%) = (10^{-1/k} - 1) \times 100\%$ 计算^[20-21]。

2.5 eDNA 浓度和岩原鲤生物量的关系

根据扩增曲线 C_t 值判定岩原鲤的含量, 0、1、2、4、8 和 16 尾岩原鲤养殖缸中拷贝数分别为 0、76 955.20、208 164.71、851 138.04、1 238 857.04 和 2 090 925.22 个/L, 得到岩原鲤 DNA 浓度与其个体数量的相关性曲线: $y = 131 546x + 77 623$ 。阴性对照未检测到扩增。说明在上述条件下, 从水环境中可有效提取到岩原鲤残留 DNA, 可被特异性地定量检测。而目标 DNA 浓度和岩原鲤数量有 R^2 为 0.957 的正相关性, 说明岩原鲤数量越多, 检测出的 DNA 量越多。

2.6 eDNA 降解结果

检测结果显示, 在岩原鲤去除后, 水体中 eDNA 含量与时间负相关。第 1 天 (2020 年 12 月 26 日) 检测时水体 eDNA 拷贝数为 1 102.81 拷贝/mL, 而第 17 天 (2021 年 1 月 11 日) 检测时水体 eDNA 拷贝数降解为 0.74 拷贝/mL。用幂函数拟合 eDNA 降解与时间之间的关系, 拟合方程: $y = 1 931.1x^{-2.935}$, 相关系数 R^2 为 0.941 (图 3)。

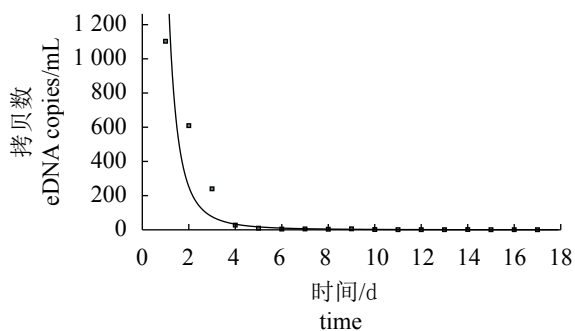


图 3 岩原鲤 eDNA 降解与时间的关系拟合

Fig. 3 Relationship fitting between degradation of eDNA and time in *P. rhabdi*

3 讨论

自 2005 年首次放流人工繁殖岩原鲤后, 人

工放流一直是岩原鲤资源保护的主要措施, 连续十余年的人工放流对岩原鲤的资源恢复效果以及目前长江上游岩原鲤种群如何分布一直没有确切的科学证据。目前鱼类资源监测常用的方法是实地采样, 然而岩原鲤样本采集困难, 主要原因可能有 2 个, 一是长江上游复杂的水文条件, 二是岩原鲤资源衰退严重, 濒临灭绝。国家计划从 2020 年起, 在长江流域干流和重要通江湖泊全面禁渔, 为期十年, 因此采集鱼类样本会更加困难。另外, 鱼类种群生物量估计通常需要对目标监测物种进行捕获, 可能对生物栖息地造成影响, 这既具有侵入性又成本昂贵^[12]。长江上游地处长江经济带, 在国家不搞大开发, 共抓大保护的战略背景下, 不破坏渔业资源和鱼类栖息地的渔业资源监测方式显得尤为重要。

环境 DNA 技术作为一种新的鱼类资源研究方法, 不需要采集鱼类样本, 只需要采集水环境样本, 与传统采样方法相比, 具有省时省力费用低、灵敏度高及环境友好, 对调查对象无伤害等优点^[15]。环境 DNA (eDNA) 为确定水生环境中物种的存在提供了一种辅助工具^[22], 并可能有助于渔业调查估计重要经济鱼类种群生物量^[23-24]。eDNA 通常在几小时至几周内降解成小片段^[25-27], 因此它被认为提供了关于物种在环境中存在的近似实时数据。

本研究结果显示, 引物和 TaqMan 探针对待试的岩原鲤样品出现荧光增长曲线, 表现为阳性扩增, 而其他鱼类和空白对照均未获得扩增信号, 表现为阴性。如果引物和数据库完备, 基于 eDNA 的生物学监测可以不依赖于研究人员的分类识别技能^[6]。对于靶向物种检测, 采用聚合酶链式反应 (PCR), 使用引物设计来特异性扩增部分目标 DNA 序列。传统的 PCR 已用于特异性 eDNA 检测。然而, 定量 qPCR 比传统的 PCR 技术具有明显的优势, 因为添加了染料 (例如 SYBRTMGreen) 或标记的报告基因探针, 可以通过 qPCR 仪器实时监测目标序列的扩增。定量根据标准曲线测量, 与已知浓度参考 DNA 样本同时运行^[28]。基于探针的 qPCR 增加了特异性和敏感性, 因为使用具有正向和反向引物的探针可以确保有 3 个序列来检查目标模板 DNA^[29]。物种特异性分子标记可以从 eDNA 中通过 PCR 扩增, 以便检测感兴趣的生物体, 如濒危物种^[30] 和入侵物种^[31]。此外, 使用物种特异性探针 (例如 MGB 探针) 来改进 eDNA 分

析, 与使用仅基于物种特异性引物或不使用 MGB 组的 TaqMan[®] 探针相比, 将进一步增加物种特异性^[32]。本实验采用 MGB 探针结合 qPCR 的方法, qPCR 的阈值循环数与标准品的拷贝数线性关系良好, 且线性范围广, 获得的标准曲线相关系数达到 0.999, 检测限 DNA 浓度为 5×10^{-6} ng/ μ L, 扩增效率为 94.7%。结果表明在 qPCR 检测中加入探针可获得更大的特异性, 对目的片段成功扩增, 对非目的片段没有扩增, 表明基于探针检测对目标物种 eDNA 样本最佳。

本实验发现目标 eDNA 浓度和岩原鲤数量具有的线性正相关性 ($R^2=0.957$), 岩原鲤 DNA 浓度 (拷贝/L) 与其个体数量的相关性曲线为: $y = 131546x + 77623$ 。本研究及其他研究已观察到 eDNA 浓度与水生物种的密度和生物量相关^[33-34], 这表明随着方法进一步细化, 可从 eDNA 中估计物种相对丰度, 为物种的保护和管理提供强有力的工具。然而鱼类密度与 eDNA 浓度之间并不总是存在一致的线性关系^[35-37]。例如, 河流系统中鲢的密度较低时, 其生物量与 eDNA 浓度和检出率呈正相关, 但在较大密度时趋于稳定^[35]。因此, 对该物种 eDNA 浓度的可靠种群估计目前仅限于鱼类密度较低的地区。最近的研究表明, 结合生理异速生长尺度可以改善预测模型, 使 eDNA 浓度可能成为鱼类丰度的可靠指标^[17]。物种的特异性检测意味着开发对岩原鲤的 eDNA 测试方法是可行的, 这将有助于为岩原鲤保护行动提供信息, 以更好地了解岩原鲤分布和丰度; 定期监测以研究岩原鲤种群随时间的变化; 以及岩原鲤种群是否受到人类活动的影响。

去除岩原鲤后, 水体中 eDNA 的拷贝数与时间呈负相关关系, 其在环境中的存留时间为 17 d 左右。研究发现, eDNA 在水中可以从几天到几周检测到^[38-39], 这取决于各种环境因素。例如高温^[40]和低 pH^[41]会加速 eDNA 降解, 而紫外线辐射的影响在各研究之间结论不一, 甚至相互矛盾^[42]。此外, 在物种生物量密度较高的环境中, eDNA 衰减率较高^[43]。这些非生物和生物因素有助于水中微生物活性和丰度的增加, 从而间接影响 eDNA 的降解^[40]。在对稀有或入侵物种监测时, 对生物体特异性 eDNA 降解的研究是至关重要的^[44]。在本研究中, 发现岩原鲤 eDNA 的持久性达 17 d 左右。eDNA 的短时间持久性为保护生物学开辟了新的视角, 它可以获取物种的存在或缺失信息。

关于 DNA 持久性的探索将极大地影响生物多样性研究和生物安全调查的规划。

对动物分布和丰度的监测是濒危物种保护工作的重要组成部分。然而, 使用传统直接诱捕的侵入性监测方法会对小种群产生负面影响; 使用非侵入性 eDNA 监测方法比传统采样方法高效^[45]。本实验提供一种 TaqMan 探针实时荧光定量 PCR 方法, 建立了岩原鲤生物量评估的环境 DNA 检测技术, 具有快速、灵敏、特异性的检测能力。该方法在实际应用中定量检测岩原鲤的附加工具, 可为今后对岩原鲤的野外调查提供重要参考。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] 曲焕韬, 杨元金, 鲁雪报, 等. 岩原鲤形态性状与体质量的相关性及通径分析[J]. 水产科学, 2018, 37(6): 769-774.
Qu H T, Yang Y J, Lu X B, et al. Correlation and path analysis of morphometric attributes on body weight in *Procypris rabaudi*[J]. Fisheries Science, 2018, 37(6): 769-774 (in Chinese).
- [2] Zhang X Y, Yue B S, Jiang W X, et al. The complete mitochondrial genome of rock carp *Procypris rabaudi* (Cypriniformes: Cyprinidae) and phylogenetic implications[J]. Molecular Biology Reports, 2009, 36(5): 981-991.
- [3] Cobos M E, Bosch R A. Breeding sites of a narrowly distributed amphibian, a key element in its conservation in the face of global change[J]. Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems, 2018, 28(5): 1089-1098.
- [4] Boon P J, Cooksley S L, Geist J, et al. Developing a standard approach for monitoring freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*) populations in European rivers[J]. Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems, 2019, 29(8): 1365-1379.
- [5] Kasai A, Takada S, Yamazaki A, et al. The effect of temperature on environmental DNA degradation of Japanese eel[J]. Fisheries Science, 2020, 86(3): 465-471.
- [6] Thomsen P F, Willerslev E. Environmental DNA – an emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity[J]. Biological Conservation, 2015, 183: 4-18.

- [7] Laramie M B, Pilliod D S, Goldberg C S. Characterizing the distribution of an endangered salmonid using environmental DNA analysis[J]. *Biological Conservation*, 2015, 183: 29-37.
- [8] Atkinson S, Carlsson J E L, Ball B, *et al.* A Quantitative PCR-based environmental DNA assay for detecting Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)[J]. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 2018, 28(5): 1238-1243.
- [9] Antognazza C M, Britton R J, Read D S, *et al.* Application of eDNA metabarcoding in a fragmented lowland river: spatial and methodological comparison of fish species composition[J]. *Environmental DNA*, 2021, 3(2): 458-471.
- [10] Evans N T, Shirey P D, Wieringa J G, *et al.* Comparative cost and effort of fish distribution detection via environmental DNA analysis and electrofishing[J]. *Fisheries*, 2017, 42(2): 90-99.
- [11] Goldberg C S, Pilliod D S, Arkle R S, *et al.* Molecular detection of vertebrates in stream water: a demonstration using rocky mountain tailed frogs and Idaho giant salamanders[J]. *PLoS One*, 2011, 6(7): e22746.
- [12] Knudsen S W, Ebert R B, Hesselsoe M, *et al.* Species-specific detection and quantification of environmental DNA from marine fishes in the Baltic sea[J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2019, 510: 31-45.
- [13] Sigsgaard E E, Nielsen I B, Bach S S, *et al.* Population characteristics of a large whale shark aggregation inferred from seawater environmental DNA[J]. *Nature Ecology & Evolution*, 2017, 1(1): 0004.
- [14] Valentini A, Taberlet P, Miaud C, *et al.* Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding[J]. *Molecular Ecology*, 2016, 25(4): 929-942.
- [15] Capo E, Spong G, Koizumi S, *et al.* Droplet digital PCR applied to environmental DNA, a promising method to estimate fish population abundance from humic-rich aquatic ecosystems[J]. *Environmental DNA*, 2021, 3(2): 343-352.
- [16] Kirtane A, Wiczorek D, Noji T, *et al.* Quantification of environmental DNA (eDNA) shedding and decay rates for three commercially harvested fish species and comparison between eDNA detection and trawl catches[J]. *Environmental DNA*, 2021, 3(6): 1142-1155.
- [17] Yates M C, Glaser D M, Post J R, *et al.* The relationship between eDNA particle concentration and organism abundance in nature is strengthened by allometric scaling[J]. *Molecular Ecology*, 2021, 30(13): 3068-3082.
- [18] Nguyen T L, Lim Y J, Kim D H, *et al.* Development of real-time PCR for detection and quantitation of *Streptococcus parauberis*[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2016, 39(1): 31-39.
- [19] Akamatsu Y, Kume G, Gotou M, *et al.* Using environmental DNA analyses to assess the occurrence and abundance of the endangered amphidromous fish *Pleco-glossus altivelis ryukyuensis*[J]. *Biodiversity Data Journal*, 2020, 8: e39679.
- [20] Yusop M H M, Mustafa S, Man Y B C, *et al.* Detection of raw pork targeting porcine-specific mitochondrial cytochrome B gene by molecular beacon probe real-time polymerase chain reaction[J]. *Food Analytical Methods*, 2012, 5(3): 422-429.
- [21] Cammà C, Di Domenico M, Monaco F. Development and validation of fast Real-Time PCR assays for species identification in raw and cooked meat mixtures[J]. *Food Control*, 2012, 23(2): 400-404.
- [22] Evans N T, Olds B P, Renshaw M A, *et al.* Quantification of mesocosm fish and amphibian species diversity via environmental DNA metabarcoding[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2016, 16(1): 29-41.
- [23] Miya M, Sato Y, Fukunaga T, *et al.* MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species[J]. *Royal Society Open Science*, 2015, 2(7): 150088.
- [24] Thomsen P F, Møller P R, Sigsgaard E E, *et al.* Environmental DNA from seawater samples correlate with trawl catches of subarctic, deepwater fishes[J]. *PLoS One*, 2016, 11(11): e0165252.
- [25] Dejean T, Valentini A, Duparc A, *et al.* Persistence of environmental DNA in freshwater ecosystems[J]. *PLoS One*, 2011, 6(8): e23398.
- [26] Pilliod D S, Goldberg C S, Arkle R S, *et al.* Factors influencing detection of eDNA from a stream-dwelling amphibian[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2014, 14(1): 109-116.
- [27] Piaggio A J, Engeman R M, Hopken M W, *et al.* Detect-

- ing an elusive invasive species: a diagnostic PCR to detect Burmese python in Florida waters and an assessment of persistence of environmental DNA[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2014, 14(2): 374-380.
- [28] Bourlat S J, Borja A, Gilbert J, *et al.* Genomics in marine monitoring: New opportunities for assessing marine health status[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2013, 74(1): 19-31.
- [29] Gargan L M, Morato T, Pham C K, *et al.* Development of a sensitive detection method to survey pelagic biodiversity using eDNA and quantitative PCR: A case study of devil ray at seamounts[J]. *Marine Biology*, 2017, 164(5): 112.
- [30] Thomsen P F, Kielgast J, Iversen L L, *et al.* Detection of a diverse marine fish fauna using environmental DNA from seawater samples[J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): e41732.
- [31] Jerde C L, Mahon A R, Chadderton W L, *et al.* "Sight-unseen" detection of rare aquatic species using environmental DNA[J]. *Conservation Letters*, 2011, 4(2): 150-157.
- [32] Kutuyavin I V, Afonina I A, Mills A, *et al.* 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures[J]. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28(2): 655-661.
- [33] Takahara T, Minamoto T, Yamanaka H, *et al.* Estimation of fish biomass using environmental DNA[J]. *PLoS One*, 2012, 7(4): e35868.
- [34] Wilcox T M, McKelvey K S, Young M K, *et al.* Understanding environmental DNA detection probabilities: a case study using a stream-dwelling char *Salvelinus fontinalis*[J]. *Biological Conservation*, 2016, 194: 209-216.
- [35] Coulter D P, Wang P, Coulter A A, *et al.* Nonlinear relationship between Silver Carp density and their eDNA concentration in a large river[J]. *PLoS One*, 2019, 14(6): e0218823.
- [36] Doi H, Inui R, Akamatsu Y, *et al.* Environmental DNA analysis for estimating the abundance and biomass of stream fish[J]. *Freshwater Biology*, 2017, 62(1): 30-39.
- [37] Ghosal R, Eichmiller J J, Witthuhn B A, *et al.* Attracting Common Carp to a bait site with food reveals strong positive relationships between fish density, feeding activity, environmental DNA, and sex pheromone release that could be used in invasive fish management[J]. *Ecology and Evolution*, 2018, 8(13): 6714-6727.
- [38] Barnes M A, Turner C R. The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics[J]. *Conservation Genetics*, 2016, 17(1): 1-17.
- [39] Collins R A, Wangensteen O S, O'Gorman E J, *et al.* Persistence of environmental DNA in marine systems[J]. *Communications Biology*, 2018, 1(1): 185.
- [40] Strickler K M, Fremier A K, Goldberg C S. Quantifying effects of UV-B, temperature, and pH on eDNA degradation in aquatic microcosms[J]. *Biological Conservation*, 2015, 183: 85-92.
- [41] Seymour M, Durance I, Cosby B J, *et al.* Acidity promotes degradation of multi-species environmental DNA in lotic mesocosms[J]. *Communications Biology*, 2018, 1(1): 4.
- [42] Mächler E, Osathanunkul M, Altermatt F. Shedding light on eDNA: Neither natural levels of UV radiation nor the presence of a filter feeder affect eDNA-based detection of aquatic organisms[J]. *PLoS One*, 2018, 13(4): e0195529.
- [43] Bylemans J, Furlan E M, Gleeson D M, *et al.* Does size matter? An experimental evaluation of the relative abundance and decay rates of aquatic environmental DNA[J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, 52(11): 6408-6416.
- [44] Wood S A, Biessy L, Latchford J L, *et al.* Release and degradation of environmental DNA and RNA in a marine system[J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 704: 135314.
- [45] Amberg J J, Bonar S A, Perez C, *et al.* The importance of sound methodology in environmental DNA sampling: Response to comment[J]. *North American Journal of Fisheries Management*, 2018, 38(3): 597-600.

Detection and biomass assessment of *Procypris rabaudi* based on environmental DNA

YAN Huiguo¹, DONG Zhiling¹, MA Tingting¹, ZHANG Lianbo¹, WANG Xiaoyan²,
YE Hua¹, YAO Weizhi¹, HE Wenping^{1*}

(1. Key Laboratory of Freshwater Fish Reproduction and Development, Ministry of Education,
College of Fisheries, Southwest University, Chongqing 400715, China;

2. National Engineering Research Center of Marine Facilities Aquaculture, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China)

Abstract: Species distribution and biomass are the basis for evaluating population dynamics and community structure in an ecosystem. Unfortunately, it is frequently full of challenges to capture the distribution of the rare species through traditional methods. *Procypris rabaudi* is a unique economic species in the upper reaches of the Yangtze River, the number of which has declined dramatically in recent years. Environmental DNA technology is a sensitive, low-cost and non-invasive new technology for species monitoring. It has great potential application in detecting endangered and invasive species. In order to establish a real-time quantitative PCR (qPCR) method for the detection of *P. rabaudi* and distinguish it from other fishes in the Yangtze River, this study designed eDNA primers and a TaqMan probe based on 12S rRNA gene sequence in mtDNA. The sequence of the 12S rRNA gene was amplified by PCR and cloned into the pMD19-T vector to construct the standard plasmid, and a qPCR method was developed for detection of *P. rabaudi* using serially diluted standard plasmid as templates. Subsequently the sensitivity, specificity and application effects of the method were evaluated. The results showed that the cycle threshold value (C_t) of qPCR assay had a great linear relationship with the copy number of the standard plasmid. Amplification specificity analysis indicated that the method could specifically detect *P. rabaudi*. Then, eDNA was detected in the water samples in aquarium tanks with different numbers of *P. rabaudi*. The target DNA concentration and the number of *P. rabaudi* had a positive correlation of R^2 was 0.957, and the correlation curve between DNA concentration and the individual number was obtained: $y = 131\ 546x + 77\ 623$. In addition, after the removal of *P. rabaudi*, the copies of eDNA were negatively correlated with time, and its retention time in the water environment was about 17 days. In this study, we found that the DNA primer and Taqman probe could be applied to the qualitative detection of *P. rabaudi* in water with high specificity, as well as estimate fish density in tanks quantitatively. These results demonstrate that eDNA analysis method is a potential tool to reflect the biomass of *P. rabaudi* in different sampling sites, which can provide a basis for assessment of artificial release effect and resource management of *P. rabaudi* in the future.

Key words: *Procypris rabaudi*; environmental DNA; primers; probe; biomass

Corresponding author: HE Wenping. E-mail: hewenping2008@163.com

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (32071651); Chongqing Municipal Natural Science Foundation (cstc2020jcyj-msxmX0438); Science and Technology Innovation of Social and People's Livelihood in Chongqing (cstc2016shmszx80087); the Fundamental Research Funds for the Central Universities (XDJK2019C025)