

臺北市立動物園 104 年度動物認養計畫成果報告

臺灣穿山甲主要組織相容性基因多態性分析與應用

計畫編號：104 保研 9

計畫項目： 動物福利 保育研究 環境教育

計畫主辦人：國立臺灣大學王佩華教授

參與人員：賴芳裕、劉晉廷、吳宇軒

執行期間：104 年 03 月 04 日至 104 年 12 月 31 日

經費核定數：430,000 元

經費執行數：430,000 元

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國內外公出或研習心得報告 0 種
- 出席國際（學術）會議心得報告及發表之論文 0 種
- 國際合作研究計畫國外研究報告書 0 種

中 華 民 國 105 年 2 月 29 日

臺北市立動物園 104 年度動物認養保育計畫成果報告

日期：105 年 2 月 29 日

中文摘要：

主要組織相容性複合體 (the major histocompatibility complex, MHC) 是一群廣泛存在於脊椎動物基因組中，且在免疫反應上扮演重要角色的基因，也是族群對病原反應的一個重要的指標。臺灣穿山甲 (Formosan pangolin, *Manis pentadactyla pentadactyla*) 為臺灣特有的保育類動物，但其 MHC 相關研究資料極少，因此開發新的臺灣穿山甲 MHC 基因檢測平台成為一個重要工作。另外，本試驗也對微衛星標幟進行分析，期望結合編碼區以及非編碼區的遺傳資訊，得到更完整的臺灣穿山甲族群遺傳多態性。

本試驗利用 54 隻臺灣穿山甲樣本，進行 MHC 基因多態性檢測。試驗顯示，在所檢測的樣本中，將 MHC class I $\alpha 1$ domain 和 MHC class II *DQA* exon2 DNA 序列分析結果，與親緣關係較近之家犬序列比對，相似度分別為 78.31 及 79.12%，但兩基因型在所試驗之族群中皆呈現單型性。另在 MHC class II *DRB* exon2 與家犬序列比較其相似度為 83.12%，且可檢測出三種單套型 (haplotype)，其相對頻率分別為 62、37 和 1%。三個單套型間共有 7 個核苷酸多態性位點，在胺基酸序列上則有 5 個胺基酸變異點。進一步分析單套型多樣性指數 (h) 為 0.482，核苷酸多樣性指數 (π) 則為 0.00963，顯示族群遺傳多樣性可能偏低。觀測異質度 (H_O) 為 0.426，而期望異質度 (H_E) 則為 0.482，萊特氏固定指數 (F_{IS}) 為 0.1179，可能有近親交配之傾向。此外，在三個單套型間非同義鹼基置換率 (K_a) 為 0.0245；而同義鹼基置換率 (K_s) 為 0.0170，此顯示 *DRB* exon2 在演化上，可能受到正向選汰壓力 ($K_a/K_s > 1$)。

此 15 組微衛星標幟，檢測 54 隻臺灣穿山甲之遺傳變異，結果顯示此 15 組微衛星標幟的交替基因數 (N_a) 與有效交替基因數 (number of effective alleles, N_e) 之平均值各為 5.6 ± 2.8 與 3.0 ± 1.8 ；觀測異質度 (H_O) 與期望異質度 (H_E) 之平均值分別為 0.550 ± 0.139 及 0.608 ± 0.131 ；多態性訊息含量 (polymorphic information content, PIC) 之平均值為 0.547 ± 0.149 。 F_{IS} 的平均值為 0.010 ± 0.245 ，代表此 54 隻臺灣穿山甲僅有些微的近親程度。以 15 組微衛星標幟分析臺灣穿山甲族群遺傳結構結果顯示，可以分成北部與中南部兩個群集。

綜合上述試驗結果顯示，目前所開發的 MHC 基因檢測平台，未來應可有效應用於臺灣穿山甲族群 MHC 基因檢測。此外，結合 MHC 基因與微衛星標幟，可

以對臺灣穿山甲的族群遺傳結構，進行更全面的分析。

Abstract :

The major histocompatibility complex (MHC) is a gene family found in vertebrate genome and plays crucial role in the immune reaction. Therefore, it becomes an important target to evaluate immune responses of a population toward pathogens. However, there is scarce researches for MHC of Formosan pangolin (*Manis pentadactyla pentadactyla*), an endemic species of Taiwan, thus, it become important to develop a new MHC genotyping platform for it. On the other hand, microsatellite markers were also used as molecular genetic marker. Through combining informations of genetic diversity obtained from coding and non-coding region, the more complete genetic structure of Formosan pangolins would be revealed.

In this study, 54 samples of Formosan pangolin were used for MHC genotyping. The alignment of pangolin MHC class I $\alpha 1$ domain to dog DNA sequence showed that there were 78.31% identity. The same analysis was conducted in MHC class II *DQA* exon2 and *DRB* exon2, of which identity were 79.12% and 83.12%, respectively. The $\alpha 1$ domain and *DQA* exon2 both showed monomorphic in this experiment. In addition, three haplotypes were detected in *DRB* exon2 and their relative frequency were 67%, 40% and 1% with seven polymorphic sites in the nucleotide sequence and five variable points in the amino acid sequence. In *DRB* exon2, the haplotype diversity (h) was 0.482 and nucleotide diversity (π) was 0.00963 showed that the genetic diversity among the animals may be limited. The observed heterozygosity (H_O) and expected heterozygosity (H_E) were 0.426 and 0.482. Wright's fixation index (F_{IS}) was 0.222 which indicated that the population might have a inbreeding tendency. Moreover, the synonymous substitution rate (K_a) and non-synonymous substitution rate were 0.0245 and 0.0170 showed that this locus might under positive selection ($K_a/K_s > 1$).

The 15 sets microsatellite markers were combined to analyze the genetic variability of 54 Formosan pangolins. The results showed that the average number of alleles (N_a) and

the average number of effective alleles (N_e) were 5.6 ± 2.8 and 3.0 ± 1.8 , respectively. The average observed heterozygosity (H_o) and average expected heterozygosity (H_e) were 0.550 ± 0.139 and 0.608 ± 0.131 , respectively. The average polymorphic information content (PIC) was 0.547 ± 0.149 . The average F_{IS} was 0.010 ± 0.245 , indicating the low inbreeding level. The results of using these 15 sets of microsatellite markers to analyze genetic structure of Formosan pangolins indicated that there were two group.

Our results indicated that the new MHC genotyping platform for Formosan pangolin is suitable for further MHC diversity analysis. Moreover, MHC genotyping platform and the 15 sets of microsatellite markers are appropriate tools to monitor the genetic structure of Formosan pangolins.

關鍵詞：臺灣穿山甲、主要組織相容性複合體、微衛星標幟、族群遺傳

Keywords : Formosan pangolin (*Manis pentadactyla pentadactyla*), The major histocompatibility complex (MHC), Microsatellite markers, Population genetics.



臺北市立動物園動物認養保育計畫成果報告自評表

計畫編號：104 保研 9

計畫名稱：臺灣穿山甲主要組織相容性基因多態性分析與應用

計畫主持人：國立臺灣大學王佩華教授

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標 (請說明，以 100 字為限)

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文： 已發表 未發表之文稿 撰寫中 無

專利： 已獲得 申請中 無

技轉： 已技轉 洽談中 無

其他：已發表於國內之學術研討會 (中國畜牧學會年會) 之論文摘要

1. 吳宇軒、賴芳裕、林恩仲、劉晉廷、曹先紹、金仕謙、王佩華。2015。利用新微衛星組探討圈養於臺北市立動物園穿山甲族群之遺傳結構。中畜會誌 44 (增刊): 122。
2. 劉晉廷、賴芳裕、林恩仲、吳宇軒、曹先紹、金仕謙、王佩華。2015。臺灣穿山甲主要組織相容性複合體基因多態性檢測平台之開發。中畜會誌 44 (增刊): 79。

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值 (簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性) (以 500 字為限)

(1) 本試驗結果顯示，雖然穿山甲 (鱗甲目) 和食肉目分屬兩個不同的目，但是利用親緣關係較相近的物種，以在跨物種間具有高保留性的序列區域，仍舊能夠設計出可用於穿山甲基因組的 MHC 基因引子。並且在有觀測到的基因座上，鱗甲目和食肉目的 MHC 基因相似性，可能高達 70% 以上。

(2) 試驗結果顯示，以目前所開發的 $\alpha 1$ domain、DQA exon 2 和 DRB exon 2 三組引子對，能夠有效作為臺灣穿山甲 MHC 基因檢測平台，未來應可有效應用於臺灣穿山甲族群 MHC 基因檢測。

(3) 本計畫研續之前所新開發微衛星標幟檢測試驗族群，結果顯示試驗族群僅有些微的近親交配傾向 ($F_{IS} > 0$)。試驗結果指出試驗之臺灣穿山甲族群在微衛星標識上，仍然保有多態性，並且本試驗所使用的 15 組微衛星標幟，可以有效

應用於臺灣穿山甲族群分析。

(4) 試驗族群在微衛星片段上，仍然保有一定程度的多態性，但在 MHC 基因的檢測結果則顯示，臺灣穿山甲在 MHC 基因上可能有較低的遺傳多樣性，這個現象在許多瀕危物種中都有被觀察到。顯示保育臺灣穿山甲在 MHC 基因上的遺傳多樣性，已經是刻不容緩的議題。另在域外保育方面，雖然臺北市立動物園中用於本試驗的 14 隻在養個體，在單套型多樣性指數 (h)、核苷酸多樣性指數 (π)、觀測異質度 (H_0) 和期望異質度 (H_E) 等指標上，都比整體試驗族群略佳。本研究仍舊能作為園內族群管理的參考，避免在配種時遺失域外保育族群的 MHC 基因多態性。並且相關研究也可作為，未來是否要將帶有低度相對頻率 MHC 基因的野外個體，納入域外保育族群管理的參考依據。

綜合上述，本研究為第一個針對臺灣穿山甲 MHC 基因的研究，且發現該基因可能存在有低度多態性的情形。結合微衛星標幟，可以進行臺灣穿山甲族群遺傳基因條碼(genetic barcode)資料庫的建立，其結果在將來除了可以作為走私未知檢體的分析，也可以運用於域外保育族群的管理，更可以作為我國保育策略規劃時的參考。

