几种野生动物样品的 DNA 分子鉴定*

杨小军　周开亚**

(南京师范大学遗传资源研究所　南京　210097)

摘要：用 12S rDNA 通用引物 L1091 和 H1478 扩增了宜兴工商执法部门送检的 5 件野生动物样品。测定其序列后，与 GenBank 的同源序列比对，并计算测定得到的序列与相关物种序列间的 *P* 值，作为种类鉴定的依据。分子鉴定的结果：2 件样品为孟加拉巨蜥（*Varanus bengalensis*）、1 件为黑熊（*Ursus thibetanus*）、1 件为中国穿山甲（*Manis pentadactyla*）、1 件为穿山甲属未定种（*Manis* sp.）。

关键词：12S rDNA；野生动物样品；分子鉴定

中图分类号：Q812　**文献标识码**：A　**文章编号**：0250-3263(2004)01-89-04

DNA Identification of Animal Samples

YANG Xiao-Jun　ZHOU Kai-Ya

(*Institute of Genetic Resources, Nanjing Normal University, Nanjing*　210097, *China*)

Abstract: The Industry and Commerce Bureau of Yixing City sent us five animal samples for identification. Fragments of 12S rDNA were amplified from the five samples using the primer pair L1091 and H1478. Sequences obtained in the present study, and homologous sequences retrieved from GenBank were aligned by Clustal software. P-distance was assessed by MEGA software version 2.1., and was used as a criterion for identification. The results of the molecular identification indicate that two samples are *Varanus bengalensis*, one sample is *Ursus thibetanus*, one sample is *Manis pentadactyla* and the last one is an unidentified species of pangolin (*Manis* sp.).

Key words: 12S rDNA; Animal sample; Molecular identification

随着分子生物学技术的发展，DNA 分子标记技术已越来越多地用于动物种类或种群的鉴别，并应用于市场上动物和动物制品的鉴定。如本实验室用 PCR 产物直接测序技术鉴定中药材龟板是否正品药材[1]；采用位点特异性 PCR 鉴定方法，快速鉴定蛤蚧、乌梢蛇、鹿茸等中药材[2]；用 PCR/RFLP 方法准确鉴别中华绒螯蟹（*Eriochier japonica sinensis*）与合浦绒螯蟹（*E. j. hepuensis*）[3]；利用细胞色素 *b* 基因和控制区的部分序列，鉴定小布氏鲸（*Balaenoptera edeni*）[4]。饶刚等改进了从旧皮张提取 DNA 的方法[5]。2002 年 8 月 9 日宜兴市工商局送来五件查获的野生动物样品，要求鉴定。本文报道了用 DNA 分子标记技术对这些样品进行鉴定的结果。

1　材料与方法

1.1　检测的样品　共 5 件，系宜兴市工商局在当地的饭店收缴，除一件为带有头部的巨蜥，其余均为冷冻的肌肉块，已剥制干净，无法从形态学上加以准确鉴定。

1.2　形态学鉴定　YXB2 号样品是 1 只巨蜥的头部，其鼻孔为一斜裂，位置约在吻端与眼之间的中部，符合孟加拉巨蜥（*Varanus bengalensis*）的鉴别特征[6]，鉴定为孟加拉巨蜥。

1.3　DNA 序列测定

1.3.1　仪器和试剂　10 × buffer、*Taq* 酶、Mg^{2+}、dNTP (Promega)，蛋白酶 K(Merck)，DNA 纯化试剂盒（杭州维特洁），所用其它试剂均为国产分析纯级产品。PCR 反

---

* 国家自然科学基金资助项目(No.30170113)；

** 通讯作者，E-mail：kyzhounj@jlonline.com；

第一作者介绍　杨小军，男，24 岁，硕士研究生；研究方向：分子系统学。

收稿日期：2003-07-15；修回日期：2003-11-08

应在 PTC-200 型 PCR 仪(MJ Research)上进行,测序反应在 310 型遗传分析仪(Perkin Elmers)上进行。鉴定所用引物为扩增线粒体 12S rRNA 基因片段的通用引物 L1091(5' gcttcaaactgggattagataccccactat 3')和 H1478 (5' tgactgcagagggtgacgggcggtgtgt 3')[7],由上海生工生物合成。

1.3.2 DNA 提取、PCR 扩增和序列测定 每个样品取肌肉组织约 0.05 g,采用 SDS/蛋白酶 K 消化,酚-氯仿抽提和乙醇沉淀法提取总 DNA[8]。扩增线粒体 12S rRNA 基因片段的 PCR 反应总体积 30 μl,含 10 × PCR buffer 3.0 μl,引物 H1478 和 L1091 (10 mmol/L)各 1.0 μl,dNTP Mix (2 mmol/L) 2.0 μl,Mg^{2+} (25 mmol/L) 2.0 μl,*Taq* 酶 1U,模板 DNA 约 50 ng,双蒸水 20 μl。每个反应包含 30 个循环,循环参数为:95℃变性 40 s、54℃退火 30 s、72℃延伸 35 s,首次循环前 95℃预变性 5 min,最后一次循环后 72℃再延伸 10 min。扩增得到的 DNA 片段经纯化后,取适量纯化产物用 ABI Prism 310 型遗传分析仪自动测序。为避免污染,所有提取和 PCR 扩增的操作都设阴性对照。

1.4 BLAST 搜索 将测定的 12S rDNA 序列在 GenBank 中进行 BLAST,搜索并取得其同源序列。将本研究测定的样品序列与其同源序列合在一起,用 Clustal X 软件进行比对。比对结果输入 MEGA 软件 2.1 版本[9],计算所测定序列与相关物种序列之间的 *P* 值(P-distance),作为物种鉴定的依据。

2 结 果

2.1 序列测定结果 YXA2 和 YXB2 号样品的 12S rDNA 序列见图 1,YXA3 的见图 2,YXA1 和 YXB1 的见图 3。

```
V. bengalensis GTACCAGGAC AAGCTAGAAA CTCAAAAGAC TTGACGGTGC TCTACCCTAC CTAGAGGAGC
YXA2           A......C.. .......... .......... .......... .......... ..........
YXB2           A......C.. .......... .......... .......... .......... ..........

V. bengalensis CTGTCCTATA ATCGATACCC CACGATCTAC CCAACCCCTA CTAGCACATC AGCCTATATA
YXA2           .......... .......... .......... .......... .......... ..........
YXB2           .......... .......... .......... .......... .......... ..........

V. bengalensis CCGCCGTCGA AAGTATATCC TGCAAAGGAT CCACAATTAT CTCAATAGCC CACCACTAAA
YXA2           .......... .......... .......... .......... .C........ ..........
YXB2           .......... .......... .......... .......... .C........ ..........

V. bengalensis ACGTCAGGNC AAGGGATAGG TATTGTTGAG GGAGAGATGG GCTACATTTT CTNNATGCAG
YXA2           ........C. ....C....C ..A...A... .C........ .......... ..GA......
YXB2           ........C. ....C....C ..A...A... .C........ .......... ..GA......

V. bengalensis AACAAACGAA AAATNACATG AA-TNTTGNC ATTNNAAGGC GGNTTTA
YXA2           .......... ....A..... ..A.A...TT ..CTG..... ..A....
YXB2           .......... ....A..... ..A.A...TT ..CTG..... ..A....
```

图 1 孟加拉巨蜥 *Varanus bengalensis* (AF004481)和 YXA2、YXB2 号样品的 12S rRNA 基因部分序列

2.2 从 GenBank 取得的同源序列 巨蜥属(*Varanus*) 21 个物种的 12S rRNA 基因片段的序列:*Varanus komodoensis* (AF004496)、*V. salvadorii* (AF004510)、*V. varius* (AF004518)、*V. mitchelli* (AF004500)、*V. pilbarensis* (AF004506)、*V. tristis* (AF004516)、*V. timorensis* (AF004514)、*V. acanthurus* (AF004478)、*V. brevicauda* (AF004484)、*V. eremius* (AF004488)、*V. giganteus* (AF004490)、*V. mertensi* (AF004498)、*V. gouldii* (AF004492)、*V. prasinus* (AF004508)、*V. indicus* (AF004494)、*V. olivaceus* (AF004504)、*V. albigularis* (AF004480)、*V. niloticus* (AF004502)、*V. dumerilii* (AF004486)、*V. salvator* (AF004512)、*V. bengalensis* (AF004481)。熊属 4 个物种的 13 条序列:*Ursus americanus* 1 (NC-003426)、*U. americanus* 2 (AF303109)、*U. americanus* 3 (Y08520)、*U. maritimus* 1 (NC-003428)、*U. maritimus* 2 (AJ428577)、*U. maritimus* 3 (AF303111)、*U. arctos* 1 (NC-003427)、*U. arctos* 2 (AF303110)、*U. arctos* 3 (AY012153)、*U. arctos* 4 (U12854)、*U. arctos* 5 (L21889)、*U. arctos* 6 (Y08519)、*U. thibetanus* (L21890)。穿山甲属 5 条序列:*Manis pentadactyla* (AY012154) 、*M. tetradactyla* (AJ421454)、*M. tetradactyla* (NC-004027)、*Manis* sp. (U61079)、*Manis* sp. (AF107220)。

```
U. thibetanus TCGCCAGAGA ACTACTAGCA ACGGCTTAAA ACTCAAAGGA CTTGGCGGTG CTTTAAACCC
YXA3          .......... .......... .......... .......... .......... ..........

U. thibetanus CCCTAGAGGA GCCTGTTCTG TAATCGATAA ACCCCGATAG ACCTCACCAC CCCTTGCTAA
YXA3          .......... .......... .......... .......... .......... ..........

U. thibetanus TCCAGTCTAT ATACCGCCAT CTTCAGCGAA CCCTTAAAAG GAAAAAGAGT AAGCACAATC
YXA3          .......... .......... .......A.. .......... .......... ..........

U. thibetanus ATCTTGCATA AAAAAGTTAG GTCAAGGTGT AACCCATGGG ATGGGAAGAA ATGGGCTACA
YXA3          .......... .......... .......... ...T...... .......... ..........

U. thibetanus TTTTCTATTC AAGAACAACC TACGAAAGTT TTTATGAAAC TAAAAACTAA AGGTGGATTT
YXA3          .......... .......... .......... .......... .......... ..........

U. thibetanus AGTAGTAAAC CAAGAATAGA GAG
YXA3          .......... .......... ...
```

图 2　黑熊 *Ursus thibetanus* (L21890)和 YXA3 号样品的 12S rRNA 基因部分序列

2.3　12S rRNA 基因片段序列数据组　样品 YXA2、YXB2 的序列和巨蜥属已知的 21 条序列经 Clustal X 比对后共有 260 个位点,其中包含 110 个变异位点,78 个简约信息位点。样品 YXA3 的序列和熊属已知的 13 条序列比对后共有 328 个位点,其中包含 23 个变异位点,18 个简约信息位点。样品 YXA1、YXB1 的序列和穿山甲属已知的 5 条序列比对后共有 348 个位点,其中包含 71 个变异位点,55 个简约信息位点。

从 GenBank 取得的 21 种巨蜥的 12S rDNA 部分序列间的 *P* 值为 5.1%(*V. komodoensis* 与 *V. salvadorii*)至 20%(*V. albigularis* 与 *V. pilbarensis*)。YXA2、YXB2 号样品的序列完全相同,与孟加拉巨蜥(*V. bengalensis*)的序列最接近。它们与孟加拉巨蜥间只有 10 个碱基的替代和 1 个插入,*P* 值为 3.4%,小于巨蜥属种间 *P* 值的最小值。因此,这两个样品可鉴定为孟加拉巨蜥(*V. bengalensis*),两者可能为同一个体的不同部分。其中 YXB2 号样品的 DNA 分子鉴定结果与形态学鉴定的结果一致。熊属 4 个种相互间的 *P* 值为 0.9%(*U. maritimus* 1、*U. maritimus* 2 或 *U. maritimus* 3 与 *U. arctos* 6,3 条 *U. maritimus* 序列相同)到 4.6%(*U. americanus* 3 与 *U. maritimus*),棕熊种内个体间最大的 *P* 值达 1.5%(*U. arctos* 4 与 *U. arctos* 1 或 *U. arctos* 2)。YXA3 号样品的序列与与黑熊(*U. thibetamus*)的最接近,只有 2 个碱基的替代,*P* 值仅为 0.6%,可确定两者为同一个物种。世界上现存的穿山甲属 7 个种,但 GenBank 上只有 2 种穿山甲(*M. pentadactyla*、*M. tetradactyla*)和 2 个穿山甲属(*Manis* sp.)的共 5 条 12S rDNA 序列。这 5 条序列间的 *P* 值为 7.8%(*Manis* sp. 与 *M. tetradactyla*)到 13%(*M. tetradactyla* 与 *M. pentadactyla*)。YXA1 号样品的序列与中国穿山甲(*M. pentadactyla*)的最接近,只有 1 个碱基的替代,*P* 值为 0.3%,此样品可鉴定为中国穿山甲(*M. pentadactyla*)。YXB1 号样品与 *M. pentadactyla* 间有 28 个碱基替代,*P* 值为 8.1%;与 *M. tetradactyla* 间有 57 个碱基替代,*P* 值为 16.5%。此样品只能鉴定为穿山甲属未定种(*Manis* sp.)。

3　讨　论

对于脊椎动物的鉴定,分子系统学方法可以辅助甚至取代传统的基于形态学的方法。这些方法特别适合于生物监测(biosurveillance),即在物种保护、野生动物管理以及法律实施中对动物和动物产品的鉴定。在野生动物管理和濒危动物保护工作中,有时会面对动物的残躯或破碎的肢体,不能用传统分类学的方法来鉴定种类。这种情况下,野生动物样品的形态学鉴别特征已经丧失,而其 DNA 携带的遗传信息仍然存在,可以根据 DNA 信息进行鉴定。实际上,DNA 分类鉴定并不要求了解其全部遗传信息,只要通过一条或几条基因的部分序列,就可以鉴定物种。本实验室采用 PCR 直接测序法、位点特异性 PCR 法和 PCR/RFLP 法已分别鉴定了从鱼类到哺乳类的许多物种,以及河蟹的亚种[1-4]。后 2 种方法,需要通过对特定物种的专门研究才能建立,第一种方法则只需在 GenBank 有同一物种的有关基因序列就可采用。所以在本研究中采用了 12S rRNA 基因的部分序列来进行鉴定。

本文所鉴定的中国穿山甲和黑熊均为国家二级重点保护野生动物。准确的物种鉴定为野生动物保护法

```
M. pentadactyla TCGCCAGAGC ACTACTAGCA ATAGCCTAAA ACTCAAAGGA CTTGGCGGTG CTTTATACCC
YXA1            .......... .......... .......... .......... .......... ..........
YXB1            .........A ......G... .C........ .......... .......... .....C.T..

M. pentadactyla TTCTAGAGGA GCCTGTTCTA TAATCGATAA ACCCCGATAA ACCCCACCAA TTCTCGCTAA
YXA1            .......... .......... .......... .......... .......... ..........
YXB1            CC........ .........G .......... .......... ....T..... ....A.....

M. pentadactyla TACAGCCTAT ATACCGCCAT CTTCAGCAAA CCCTAAAAAG GAAGCACAGT AAGCAAAATT
YXA1            .......... .......... .......... .......... .......... ..........
YXB1            .......... .......... ..C....... .......... .......... ......G.C.

M. pentadactyla ATAAAAACAT AAATACGTTA GGTCAAGGTG TAGCCTATGA ATTGGAAAGA AATGGGCTAC
YXA1            .......... .......... .......... .....C.... .......... ..........
YXB1            ..G....... .......... .......... .....C.... .....G.... ..........

M. pentadactyla ATTTTCTAAA ACAGAACACA AACGAATACC CTAATGAAAA CGAGGGTTAA AGGAGGATTT
YXA1            .......... .......... .......... .......... .......... ..........
YXB1            .......... .T........ ......CG.. .......... .....ACC.. ..........

M. pentadactyla AGTAGTAAGC TAAGAATAGA AAGCTTAGCT GAACTCGGCT CTAAAGCACG CACACACCGC
YXA1            .......... .......... .......... .......... .......... ..........
YXB1            ..C....... .G........ .....C.A.. ....C...C. .......... ..........

M. pentadactyla CCGTCACCC
YXA1            .........
YXB1            .........
```

图 3 中国穿山甲 *Manis pentadactyla*（AY012154）和 YXA1、YXB1 号样品的 12S rRNA 基因部分序列

的实施、以及准确的量刑提供了依据。孟加拉巨蜥在中国仅限于云南边境，提示此样品可能是从国外非法进入境内的。本研究对几种野生动物的鉴定，依靠的是从 GenBank 检索的同源基因片段的序列。但 GenBank 并没有包括所有物种的基因序列。近年，DNA 分子标记作为分类学的有用工具已得到国际学术界的关注[10]，各类动物的 DNA 分类数据库将会陆续建立起来。届时，将可以采用 DNA 分子标记鉴定愈来愈多的动物种类。从保护濒危动物的需要出发，作者建议应尽快建立濒危动物 DNA 分类数据库，以利于濒危动物的 DNA 分子鉴定。

参 考 文 献

[1] 吴平，周开亚，徐珞珊等. 中药材龟甲的分子鉴定研究. 药学学报，1998，**33**(3)：304～309.

[2] Wang Y Q, Zhou K Y. Authentication of animal medicinal materials by DNA molecular markers. In: Shaw P C, Wang J, But PP-H eds. Authentication of Chinese Medicinal Materials by DNA Technology. World Scientific, New Jersey, London, Singapore, Hong Kong, 2002, 125～153.

[3] 孙红英，周开亚，陆健健等. 中国大陆绒螯蟹线粒体 16S rDNA 序列变异与分子鉴定标记. 自然科学进展，2002，**12**(5)：485～490.

[4] 杨光，刘海，周开亚等. 用 mtDNA 序列鉴定一头小布氏鲸标本. 动物学杂志，2002，**37**(4)：35～38.

[5] 饶刚，李明，牛屹东等. 陈旧皮张中 DNA 提取的新方法. 动物学杂志，2001，**36**(4)：53～57.

[6] 赵尔宓，赵肯堂，周开亚等. 中国动物志·蜥蜴亚目. 北京：科学出版社，1999.

[7] Kocher T D, Thomas W K, Meyer A, *et al*. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in mammals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc Natl Acad Sci* USA, 1989, **86**: 6 169～6 200.

[8] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 1989.

[9] Kumar S, Tamura K, Jakobsen I B, *et al*. MEGA2: Molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics*, 2001, **17**: 1 244～1 245.

[10] Tautz D, Arctander P, Minelli A, *et al*. A plea for DNA taxonomy. *Trends Ecol Evol*, 2003, **18**: 70～74.