

# 穿山甲标本和甲片的 DNA 提取及 PCR 扩增

邢亚琳<sup>①②③</sup> 彭建军<sup>②</sup> 胡慧建<sup>②\*</sup> 于冬梅<sup>②\*</sup> 张礼标<sup>②</sup> 遇宝成<sup>④</sup>

① 中国科学院华南植物园 广州 510650; ② 广东省昆虫研究所(华南濒危动物研究所) 广州 510260;

③ 中国科学院研究生院 北京 100049; ④ 国家林业局调查规划设计院 北京 100714

**摘要:** 为验证经处理后的穿山甲(*Manis* spp.) 标本和甲片是否可以用于种间分子鉴定标记的开发及个体识别工作, 本文在样品的预处理、消化、提取后纯化等方面对传统提取方法进行了改进, 分别从穿山甲剥制标本、干皮标本及甲片中提取总 DNA; 然后用 *Cyt b* 基因扩增通用引物、12S rRNA 基因全序列扩增引物、RAPD 引物及微卫星引物进行了 PCR 扩增, 并对部分扩增结果进行了序列测定。结果表明, 除剥制标本的脚底皮张组织外, 其他样品基本都可以提取出 DNA。以此为模板的 PCR 扩增中, 2 种线粒体基因引物扩增出明显目的条带, RAPD 引物扩增出种间特异条带, 测序结果可用于种间特异性引物及 SCAR 引物的开发; 微卫星引物在甲片样品中扩增稳定, 可用于个体识别工作。

**关键词:** 穿山甲; 标本; 甲片; DNA 提取; PCR 扩增; 分子标记

中图分类号: Q953 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263(2013)01-49-09

## Extraction and Amplification of DNA from Pangolin Specimen and Scales

XING Ya-Lin<sup>①②③</sup> PENG Jian-Jun<sup>②</sup> HU Hui-Jian<sup>②\*</sup> YU Dong-Mei<sup>②\*</sup>

ZHANG Li-Biao<sup>②</sup> YU Bao-Cheng<sup>④</sup>

① *South China Botanical Garden, Guangzhou 510650;*

② *Guangdong Entomological Institute (South China Institute of Endangered Animals), Guangzhou 510260;*

③ *Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049;*

④ *Academy of Forest Inventory and Planning, Ministry of Forestry, Beijing 100714, China*

**Abstract:** Illegal trade of Pangolin is becoming more serious, thus forensic identification of criminal material from the molecular level is very urgent and necessary. In order to ascertain whether the processed specimen and scales could be authenticated by DNA molecular technology, total DNA from specimen or scales of Pangolin was extracted with an improved method. Four pairs of primers, which were universal primers for *Cyt b* gene, primer for complete 12S rRNA sequence, RAPD primer and microsatellite primer were used for amplification. Some amplified fragments were sequenced. The results showed that DNA of almost all these samples could be extracted except for that of the footpad of museum specimen. The extracted DNA could be amplified well with four primers, indicating the value of the present method in species-specific identification and individual recognition study.

**Key words:** Pangolin; Specimen; Scale; DNA extraction; PCR amplification; Molecular markers

**基金项目** 国家林业公益性行业科研专项(No. 200904037), 广东省科学院青年科学研究基金项目(No. qnjjsq201112), 广州市珠江科技新星项目(No. 2011086);

\* 通讯作者, E-mail: hutiger@gdei.gd.cn; yudongmei50@163.com;

**第一作者介绍** 邢亚琳, 女, 硕士研究生; 研究方向: 分子生态学; E-mail: yyx870730@126.com。

收稿日期: 2012-06-30, 修回日期: 2012-10-14

穿山甲 (*Manis* spp.) 是哺乳动物中一个较小的分类群, 隶属于鳞甲目 (Pholidota) 穿山甲科 (Manidae) 穿山甲属; 在分类上属生态极度特化的单型目、科、属, 现仅存 8 个种 (Wilson et al. 1993, Gaubert et al. 2005)。主要分布在亚洲的东部、东南部和南部及非洲大部分地区, 其中, 4 种分布于非洲, 另外 4 种分布于亚洲。穿山甲由于食用和药用价值而遭到乱捕滥猎, 加上栖息地破坏, 致使其呈现不连续分布, 野生种群数量急剧下降, 大部分物种面临濒危灭迹的危险 (吴诗宝等 2002)。目前 8 种穿山甲均被国际濒危绝种动植物贸易公约 (convention on international trade in endangered species of wild fauna and flora, CITES) 列入附录 II; 中国穿山甲 (*Manis pentadactyla*) 被《中国濒危动物红皮书》列为易危级 (vulnerable, VU), 是国家 II 级保护野生动物 (汪松 1998)。虽然穿山甲保护的重视度不断提高, 但我国走私野生穿山甲的犯罪数量却仍逐年攀升, 每年森林公安及海关都会查获大量走私的穿山甲活体、肉块或其产品 (皮张、甲片等)。其中, 对于查获的残缺个体和甲片, 通常很容易通过形态学特征鉴定为穿山甲类物种, 但从形态学层次上进行具体穿山甲物种的鉴定及走私个体数量的确定, 则存在鉴定不准确、无法确认个体数量等问题, 从而给司法定罪和确定国际间非法走私贸易趋向带来了困难。为了更有效地加强穿山甲的保护工作, 从分子水平上对案件中的穿山甲样品进行特异性司法鉴定是十分急需和必要的。

在分子生物学研究中, 首先必须获得所研究物种的目的 DNA。对于新鲜样品, 获得目的 DNA 的方法已非常成熟, 但由于一些客观条件的限制, 使得获取研究物种的新鲜样品较为困难。近年来, 伴随着 PCR 技术得到广泛应用和测序技术的不断完善, 已可以利用非损伤性取样方法从动物的皮张、毛发、牙齿、骨骼、固定标本、包埋化石等样品中提取 DNA 并进行序列分析 (Cano et al. 1993, Pichler et al. 2001, 饶刚等 2001, Pfeiffera et al. 2004, Horváth et al. 2005)。穿山甲分子生物学研究中也存在较大

的取样局限性, 森林公安及海关查获的多种穿山甲样品、已通过形态鉴定确定物种的馆藏标本都是重要的 DNA 来源。在获取物种 DNA 信息之后, 可对几个不同穿山甲物种的线粒体基因部分区域进行分析和比对, 设计出用于鉴别的特异性引物; 利用随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 标记技术筛选特异条带, 获得种间序列特异性扩增 (sequence-characterized amplified regions, SCAR) 引物; 同时, 筛选出多态性较高的微卫星引物, 用于对案件中的穿山甲甲片进行个体识别工作, 可为司法办案提供理论依据和法律技术支持。

因此, 本研究综合了现有文献的一些方法, 对传统的蛋白酶 K 裂解、酚-氯仿抽提方法进行了一些优化改进, 分别从穿山甲剥制标本、干皮标本、甲片中提取 DNA, 并利用线粒体 Cyt *b* 基因扩增的通用引物、12S rRNA 基因全序列扩增引物、微卫星引物、RAPD 引物进行 PCR 扩增, 然后对部分 PCR 扩增结果进行测序, 以鉴定所提取的 DNA。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 用于 DNA 提取的剥制标本取自广东省野生动物救护中心, 经形态鉴定确定为马来穿山甲 (*M. javanica*) 和中国穿山甲, 数量各 1 份, 编号分别为 BML、BZH; 干皮标本取自华南濒危动物研究所物种鉴定中心, 经形态鉴定确定为长尾穿山甲 (*M. tetradactyla*), 数量 1 份, 编号为 BCW; 甲片为近两年从广州白云机场查获的穿山甲走私案件中取样并保存的部分样品, 形态鉴定无法准确确定到种, 数量 4 份, 编号为 PL1 ~ PL4。剥制标本有部分破损, 经工作人员介绍, 在制作过程中一般使用砷类等化学试剂涂抹皮肤进行防腐处理, 其中, 马来穿山甲标本已保存时间为 5 年, 中华穿山甲标本已保存 10 年; 干皮标本保存完整, 处理方式及存放年代不详; 甲片已自然风干, 其中编号为 PL1、PL2 的甲片上有残留的腹面皮肤组织, PL3 和 PL4 则没有。阳性对照为马来穿山甲肌肉组织, 取自

广东省野生动物救护中心已死亡 10 d 的穿山甲个体(个体死亡后保存在  $-20^{\circ}\text{C}$  的冰箱内),数量 1 份,编号为 ML,无水乙醇浸泡置于  $-20^{\circ}\text{C}$  备用。其形态鉴定依据参考文献(吴诗宝等 2005)进行。

## 1.2 方法

**1.2.1 DNA 提取** 从剥制标本的耳部和脚掌皮肤缝合处分别剪取约 0.5 g 皮张,从干皮标本里层剪取约 0.5 g 的皮张,均确保不破坏标本外观及完整性。取甲片残留的腹面皮肤组织部分约 0.5 g,无残留皮肤组织的甲片在末端处剪取约 0.5 g。分 2 次对同一样品的总 DNA 进行提取,所有样品 DNA 提取时均用洁净的灭菌滤纸片作为阴性 DNA 提取对照。

**1.2.1.1 皮肤组织 DNA 提取** 穿山甲标本皮张 DNA 提取:(1)去除皮张表面的毛发及其他附着物,用灭菌剪刀剪成约  $1\text{ mm}^2$  的碎片,置于 1.5 ml 离心管中。(2)加入 1 ml 无水乙醇,震荡后静置 30 min,5 000 r/min 离心 5 min 后弃上清液;去离子水充分震荡洗涤,5 000 r/min 离心 5 min 后弃上清液,重复 2 次。(3)加入 1 ml 浸泡液(10 mmol/L Tris-HCl、0.5 mmol/L EDTA、50 mmol/L NaCl, pH 8.0)于  $4^{\circ}\text{C}$  放置 1 h,5 000 r/min 离心 5 min 后弃上清液。(4)加入 1 ml 去离子水,充分震荡,10 000 r/min 高速离心 3 min 后弃上清液,重复 2 次。(5)向沉淀中加入 600  $\mu\text{l}$  含有 10 mmol/L Tris-HCl、50 mmol/L NaCl、2% SDS、1 mmol/L DTT、1 mmol/L  $\text{CaCl}_2$  和 30  $\mu\text{l}$  蛋白酶 K(10 g/L)的消化液,  $55^{\circ}\text{C}$  水浴 10 h,期间每 2 h 轻轻震荡混匀一次。10 h 后视组织消化程度再加适量蛋白酶 K,消化时间也适当延长,直至组织消化较彻底;10 000 r/min 离心 10 min 取上清。(6)此后抽提等步骤按常规 DNA 提取方法进行(Sambrook et al. 1989)。(7)DNA 提取后用 Genomic DNA Purification Kit (TOYOBO) 进行二次提取、纯化。

穿山甲甲片腹部干皮 DNA 提取:提取前,将甲片腹面的皮肤组织用无水乙醇浸泡 12 h,并每隔 3 h 更换一次乙醇,期间在震荡器上轻

微震荡清洗;无水乙醇浸泡完毕后,用去离子水做同样操作,以去除表面杂质及无机离子。前处理后甲片腹面的皮肤组织部分直接使用 EZgene<sup>TM</sup> Tissues gDNA Kit (Biomiga) 提取基因组 DNA。

**1.2.1.2 甲片组织 DNA 提取** 无残留皮肤组织的甲片样品,先用同样的方法用无水乙醇和去离子水浸泡、洗涤,并在  $60^{\circ}\text{C}$  下烘干,之后在紫外灯下正反面分别照射灭菌 30 min,以去除表面杂质、彻底交联表面外源 DNA。然后在已灭菌的的研钵中用液氮研磨至细末,转移至离心管中,之后的消化及抽提过程均按上述标本皮张 DNA 提取方法进行。

**1.2.1.3 肌肉组织 DNA 提取** 肌肉样品使用 EZgene<sup>TM</sup> Tissues gDNA Kit (Biomiga) 提取基因组 DNA。为防止交叉污染,3 种样品 DNA 的提取于不同时间、地点进行。

**1.2.2 琼脂糖凝胶电泳检测** 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 大小及完整性;采用 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳,根据相对质量标准判断分子大小、检测降解程度,在凝胶成像仪上观察并照相。

**1.2.3 引物设计** 通过对 GenBank 中已公布的长尾穿山甲和中华穿山甲线粒体基因组(登录号:NC-004027、NC-016008)进行同源比对,用 Primer5 设计了特异性扩增约 1.2 kb 片段的引物对(12S rRNA L、12S rRNA H),包含穿山甲线粒体 12S rRNA 基因的全序列;Cyt b 通用引物(L14724、H15149)(Irwin et al. 1991),特异性扩增哺乳动物线粒体 Cyt b 基因中的一个长度约为 460 bp 的片段;微卫星引物(MJA03F、MJA03R)(Luo et al. 2007);RAPD 引物(S23)为之前在穿山甲遗传学研究工作中筛选的扩增条带清晰、重复性较好的上海生工生物工程有限公司 S 系列随机引物。上述引物(表 1)均由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

**1.2.4 PCR 扩增及测序** 对以上几种样品提取得到的模板 DNA 进行 PCR 扩增(退火温度见表 1)及测序,以确保抽提效果,并检测所提

表 1 用于分析的引物序列及退火温度

Table 1 Primers for DNA amplification and their annealing temperature

引物对 Primer pair	引物序列 Sequences	退火温度 (°C) Annealing temperature
Cyt <i>b</i> 通用引物 Universal primers for Cyt <i>b</i> gene	L14724 5' GATATGAAAAACCATCGTTG 3' H15149 5' CTCAGAATGATATTTGTCCTCA 3'	55
12S rRNA 全序列引物 Primers for 12S rRNA complete sequences	12S rRNA L 5' AAAGCAAAGCACTGAAAATGC 3' 12S rRNA H 5' TTGGGCTAGGATTTGTTCAAAG 3'	44
微卫星引物 Microsatellite primers	MJA03F 5' TAGCTGGCAGACGAT TTGCT 3' MJA03R 5' CTGAGTGAGGCTGGCTTTCT 3'	60 ~ 50°C 每度 2 个循环的降落 PCR
RAPD 引物 RAPD primer	S23 5'AGTCAGCCAC 3'	36

取的 DNA 是否能用于后续实验。每次提取的 DNA 都进行 2 次重复 PCR 扩增,每次反应均设置阴性对照。PCR 反应结束后取 4  $\mu$ l 扩增产物在 1.5% 的琼脂糖凝胶中电泳检测,分子量标记选用 DL2000,拍照保存结果。将扩增效果较好的样品经凝胶回收试剂盒 (TOYOBO) 回收后,送上海美吉生物医药科技有限公司进行测序。

## 2 结果

**2.1 DNA 提取结果** 几种样品的 DNA 提取物电泳结果见图 1。剥制标本共设置了 2 个不同的取样部位,即耳部和脚掌,由于此类标本制作过程中的防腐处理和长时间保存,DNA 的质量受到了严重影响。在电泳结果中可以看出,脚掌皮张提取的 DNA 电泳结果中不见条带(泳道 1、2),耳部皮张提取的 DNA 电泳图谱仅

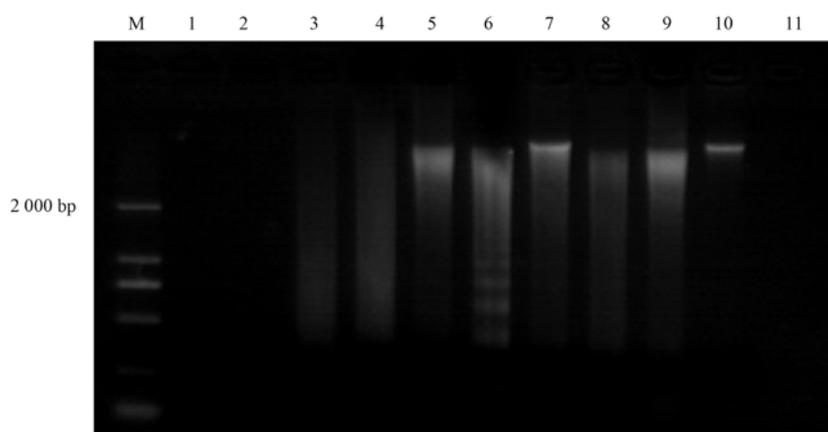


图 1 提取的总 DNA 琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 The agarose electrophoresis patterns of the extracted total DNA

M. DL2000 DNA 分子量标记; 1. 马来穿山甲剥制标本 (BML) 脚掌; 2. 中华穿山甲剥制标本 (BZH) 脚掌; 3. 马来穿山甲剥制标本 (BML) 耳部; 4. 中华穿山甲剥制标本 (BZH) 耳部; 5. 长尾穿山甲干皮标本 (BCW); 6. 甲片腹部干皮 (PL1); 7. 甲片腹部干皮 (PL2); 8. 甲片粉末 (PL3); 9. 甲片粉末 (PL4); 10. 马来穿山甲肌肉组织 (ML); 11. 阴性对照。

M. DL2000 DNA marker; 1. *M. javanica* museum specimen (BML) footpad; 2. *M. pentadactyla* museum specimen (BZH) footpad; 3. *M. javanica* museum specimen (BML) ear; 4. *M. pentadactyla* museum specimen (BZH) ear; 5. *M. tetradactyla* dry-skin specimen (BCW); 6. Dry-skin on scale (PL1); 7. Dry-skin on scale (PL2); 8. Scale powder (PL3); 9. Scale powder (PL4); 10. *M. javanica* muscle (ML); 11. Negative control.

有分子量较小的拖尾(泳道 3、4)。干皮标本提取效果较剥制标本好,但 DNA 量仍较少且有降解(泳道 5)。甲片的干扰因素少,提取的 DNA 量多,虽也有降解,但条带较为明显,其中甲片腹面残留的皮肤组织(泳道 6、7)提取效果优于甲片粉末(泳道 8、9)。肌肉组织提取效果好,无降解现象(泳道 10)。

**2.2 PCR 扩增结果** 4 种引物的扩增结果见图 2,图中均给出代表性的电泳图谱,代表性样品为图 1 中给出的样品,每种样品各选 1 个。Cyt *b* 通用引物在除脚掌皮张之外的其他样品中都有较好的扩增效果。用于扩增 12S rRNA 全序列的引物因扩增目的片段较大,样品间扩增效果存在差异,其中值得注意的是,我们从穿山甲干皮标本、甲片腹面皮肤组织和甲片粉末的 DNA 中均扩增出了约 1.2 kb 的大片段。而由于标本不同的制作工艺,及保存方式和保存年代的差异,标本样品核基因的降解严重程度不同,因此,核基因引物扩增结果不稳定。其中,干皮标本有扩增结果但条带较弱,而剥制标本的所有重复实验中均无亮带出现。甲片腹部皮肤组织和甲片粉末中可扩增出明显亮带,说明从甲片中提取和扩增 DNA 的效果好。包括

重复实验在内的 PCR 扩增成功比例见表 2。

所有 PCR 扩增的电泳结果中阴性对照均无亮带出现,表明 PCR 扩增和 DNA 提取过程均未受到外源 DNA 污染。对部分 PCR 产物进行了序列测定,测序结果与 GenBank 中同一物种的同源序列进行了比对,并且样品之间也进行了比对。结果均证明了 PCR 产物的准确性、特异性,说明使用所提取出的 DNA 作模板时,PCR 扩增并不受到微生物 DNA 的影响。部分对比结果见图 3。

### 3 讨论

由于标本皮张组织及甲片组织材料的特殊性,之前已有研究经过比对实验表明,用未经改进的传统酚-氯仿法进行 DNA 提取的效果并不理想,不能获得可以进行后续 PCR 扩增的有效模板 DNA(史燕等 2004,吴唤玲等 2007)。因此,根据实验材料特征,在本实验中提取样品 DNA 时,对传统的提取方法进行改进是必需的。主要从三个方面进行改进:样品的预处理、消化液组分的添加及消化时间延长、提取后再次纯化。由于提取的模板 DNA 质量普遍不高且存在较大差异,设计及筛选了特异性高、重复

表 2 穿山甲样品 4 种引物 PCR 扩增结果

Table 2 PCR amplification results of 4 kinds of primers

PCR 扩增 PCR amplification	剥制标本 脚掌皮张 <i>n</i> = 2 Footpad-museum Specimen	剥制标本 耳部皮张 <i>n</i> = 2 Ear-museum Specimen	干皮标本 <i>n</i> = 1 Dry-skin Specimen	甲片腹面干皮 <i>n</i> = 2 Dry skin on scales	甲片粉末 <i>n</i> = 2 Scales powder
Cyt <i>b</i> 通用引物扩增 Cyt <i>b</i> fragment amplification	0/8	8/8	4/4	8/8	8/8
12S rRNA 全序列引物扩增 12S rRNA complete sequences amplification	0/8	0/8	3/4	6/8	4/8
微卫星引物扩增 MJA03 amplification	0/8	0/8	4/4	8/8	8/8
RAPD 引物扩增 S23 amplification	0/8	0/8	2/4	5/8	3/8

表中数据为包括重复实验在内的 PCR 扩增成功比例,样品数量为 *n*,重复实验数量为 4 *n*。

Comparison of PCR performance among five different sample types. The results, including all repeated cases, were shown in success ratio form. *n* means for the sample number, while 4 *n* means for the number of repeated cases.

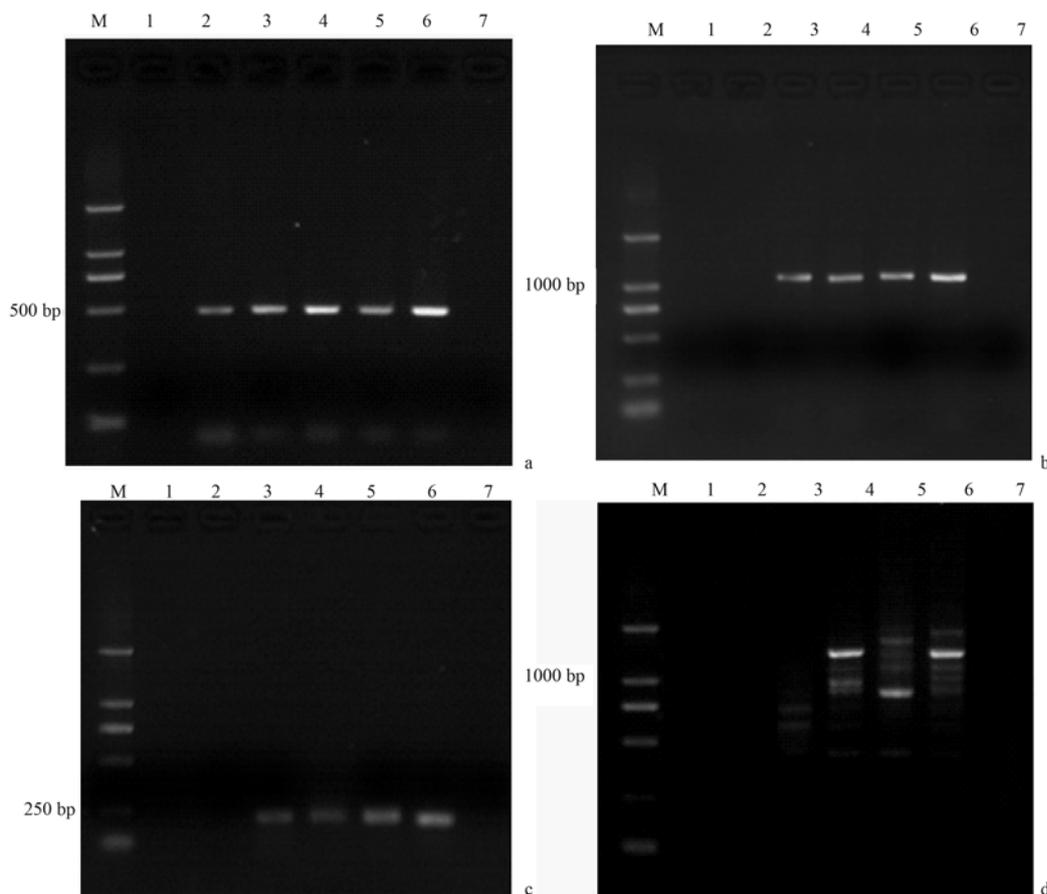


图 2 4 种引物 PCR 扩增结果

Fig. 2 PCR amplification results of 4 kinds of primers

a. *Cyt b* 通用引物; b. 12S rRNA 全序列引物; c. 微卫星引物; d. RAPD 引物。

M. DL2000 DNA 分子量标记; 1. 马来穿山甲剥制标本(BML)脚掌; 2. 马来穿山甲剥制标本(BML)耳部; 3. 长尾穿山甲干皮标本(BCW); 4. 甲片腹部干皮(PL1); 5. 甲片粉末(PL3); 6. 马来穿山甲肌肉组织(ML); 7. 阴性对照。

a. *Cyt b* universal primer; b. 12S rRNA complete sequences primer; c. Microsatellite primer; d. RAPD primer.

M. DL2000 molecular weight marker; 1. *M. javanica* museum specimen (BML) footpad; 2. *M. javanica* museum specimen (BML) ear; 3. *M. tetradactyla* dry-skin specimen (BCW); 4. Dry-skin on scale (PL1); 5. Scale powder (PL3); 6. *M. javanica* muscle (ML); 7. Negative control.

性强的引物,PCR 扩增时采用了热启动 PCR 或降落 PCR。

对于皮张标本和甲片,由于多由手工制作而成或保存在自然环境下,对其进行前处理主要是防止和减少外源 DNA 污染的可能性,主要为环境微生物、制作者和制作过程的 DNA 及实验环境原有的 DNA 污染(庞峻峰等 2001)。皮肤组织一般去除样品表面 5 mm 的薄层,取样品的内部部分,并使用乙醇和无菌水对样品进行多次清洗,清洗的同时同样可除去样品内

的脂溶性和水溶性抑制物成分;甲片组织用无菌水进行充分浸泡、清洗后紫外线进行照射消毒,然后再用无水乙醇溶液反复清洗。在使用浸泡液对样品进行预处理时,提高了浸泡液中 EDTA 浓度并缩短了浸泡时间。高浓度 EDTA 可整合去除重金属离子、抑制 DNA 酶的活性,这样可从微量样品中得到较高分子量的 DNA;在高浓度 EDTA 的作用下缩短浸泡时间可减少浸泡期间 DNA 的降解。

穿山甲皮层中含有较多的胶原蛋白且角质

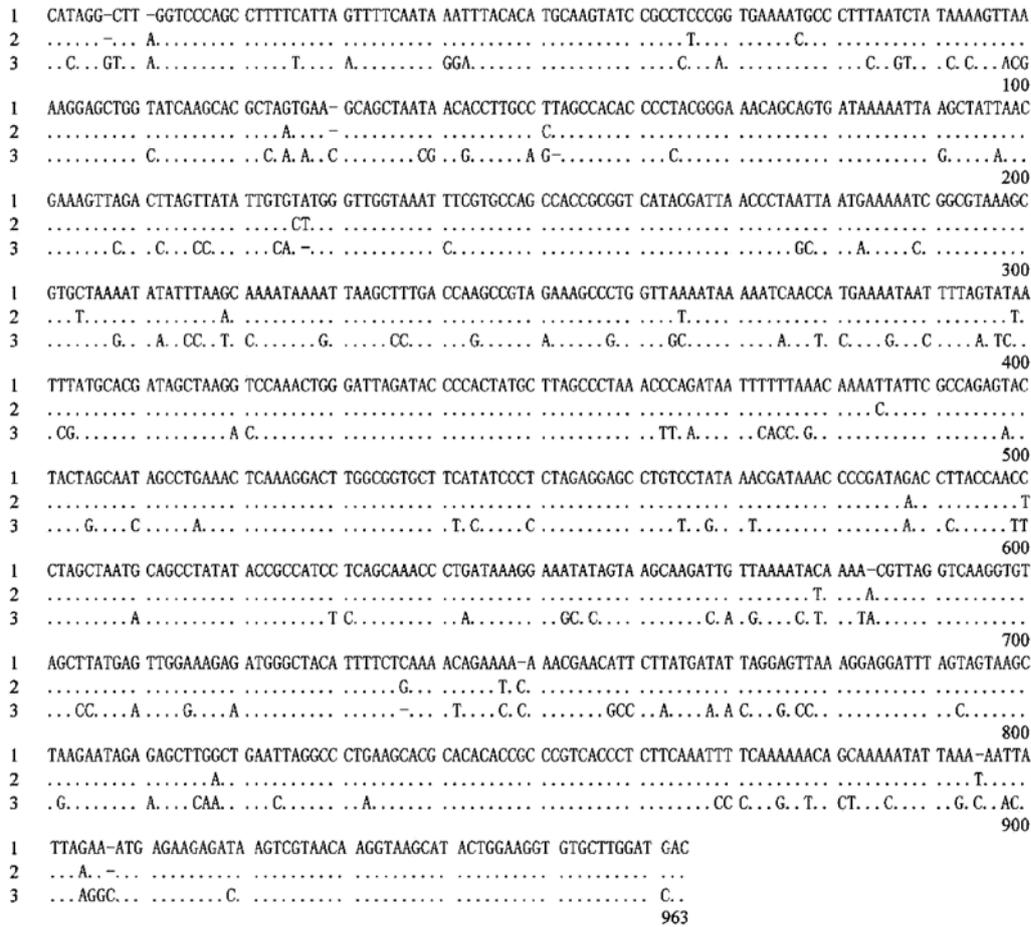


图 3 穿山甲 12S rRNA 基因全序列比对

Fig. 3 Alignment of pangolin complete sequences of 12S rRNA gene

- 1. GenBank 中已知长尾穿山甲 12S rRNA 基因全序列; 2. 长尾穿山甲剥制标本 12S rRNA 基因全序列;
  - 3. 阳性对照马来穿山甲 12S rRNA 基因全序列。圆点表示与第一个序列有相同的碱基组成,横线表示缺失。
1. The sequence from GenBank of *M. tetradactyla*; 2. The sequence of the Dry-skin specimen; 3. The sequence of the control amplification. A dot indicates identity and a dash indicates a gap relative to the top sequence.

化程度高,甲片为表皮高度角质化形成的角质鳞,角质细胞内的富含二硫键的角蛋白不易被破坏。用蛋白酶消化法提取 DNA 时最大的干扰问题是材料中的角蛋白和胶原蛋白对蛋白酶 K 的消化作用有较高的耐受性,导致蛋白酶 K 的水解效率较低。因此,增强标本及甲片样品中的角蛋白和胶原蛋白的消化效率才可释放更多 DNA,提高 DNA 最终得率。在消化液中提高了 SDS (2% ~ 3%) 的浓度,加入适量还原剂(二硫苏糖醇 DTT),可破坏细胞间连接和核

膜,加速标本已变性细胞膜的裂解;维持还原性环境、稳定酶的活性;打开角蛋白中过多的二硫键,提高角蛋白消化效率(薛小琦等 2005)。其次,向消化液中加入了 1 mmol/L 的 CaCl<sub>2</sub>,由于蛋白酶 K 有两个 Ca<sup>2+</sup> 结合位点,它们虽与催化机理并无直接关系,但如果从该酶中除去,则会出现远程的结构变化,催化活性将丧失 80% 左右(饶刚等 2001),因此对皮张的充分消化是很有必要的。在对标本皮张及甲片进行消化的过程中,通过对蛋白酶 K 加入量、温浴时间的比

较实验,发现随着采用提高蛋白酶 K 的质量浓度、延长消化时间等高强度的蛋白酶消化操作,都可以提高胶原蛋白的消化效果。特别是进行甲片粉末的消化操作时,温浴时间应视消化程度适当延长,以提高消化程度。

成分复杂的 PCR 抑制子常随 DNA 一起从标本中抽提出来,例如卟啉残基、未知盐离子或金属离子、糖降解产物等,是 *Taq* 酶的强力抑制剂(庞峻峰等 2001)。使用酚-氯仿抽提和乙醇沉淀 DNA 后,再使用分子生物学实验中常用的 PCR 产物纯化试剂盒进行第二次选择性沉淀提取,确保能更有效地去除提取物中的 PCR 抑制子。且需注意的是,在整个预处理、消化、抽提及再次纯化的过程中,操作动作应轻柔,避免对样品的 DNA 造成过多的机械损伤。

为获得准确可靠的实验结果,我们分 2 次对同一样品的总 DNA 进行提取,每次提取 DNA 的 PCR 扩增也进行了多次重复,在寻找到最佳扩增条件后,都进行 2 次重复实验。剥制标本经防腐处理及长期放置,核 DNA 降解的程度严重,但 mtDNA 具有高拷贝数的特点,且由于其闭合环状的结构,降解程度相对要轻(Wallace 1997)。从文中 PCR 扩增结果也可以看出,尽管剥制标本的耳部皮张样品总 DNA 降解得很厉害,缺乏可供分析的核 DNA,但不影响特异性地扩增 mtDNA 的基因片段,可用于部分基因引物的 PCR 扩增和测序研究。但剥制标本的脚掌皮张组织没有能提取到 DNA,也没有得到扩增产物,可能的原因有:此部位已无任何残留肌肉组织;此部位暴露完全,受砷类等化学试剂的处理影响大,由于砷可通过诱导氧化应激反应间接产生对 DNA 的氧化损伤并干扰 DNA 修复(石建朋等 2008),使 DNA 结构受到破坏程度严重。受化学试剂影响较少、可能保留有残留肌肉组织的耳部皮张组织,则易保留较多的 DNA,其 DNA 也不容易被氧化或遭受砷类等污染物的污染。但本实验中没有专门对这 2 份剥制标本样品的其他部分取样进行分析,这些部位有可能也存在质量稍好的 DNA,还需要进一步的实验证明。对于干制标本,

Pääbo(1989)认为,动物死亡后至完全干燥时间的长短决定着标本中 DNA 分子的大小,而标本保存时间的长短对其并无影响。本实验中的干皮标本可能由于制作过程中工艺技术的区别及优势, DNA 降解情况较剥制标本低,而且 mtDNA 引物和微卫星引物均有稳定的扩增结果。其中,如图 2 显示,我们从长尾穿山甲干皮标本所提的 DNA 中成功扩增出了 12S rRNA 基因约 1 200 bp 的较长片段,而一般认为标本 DNA 降解严重,很难扩增出大于 500 bp 的片段(Wandeler et al. 2007);但由于 DNA 存在降解、质量较低, RAPD 扩增有时虽能扩增出片段,稳定性却不理想。由于标本样品在放置过程中会有大量的细菌滋生,尽管前处理时经过浸泡和漂洗,但得到的 DNA 中仍会含有微生物 DNA,可能会影响 PCR 反应而产生假阳性结果(贾学渊等 2007)。由于无法从扩增体系中去除微生物 DNA,所以对 PCR 扩增产物进行了测序,以证明 DNA 的可用性。从甲片两个部位提取的 DNA 用多种引物均可扩增出目的条带, PCR 检测效果好,从表 2 的统计数据可以看出,微卫星引物扩增的效果好且稳定,这在个体鉴别及保护遗传学上具有很大的意义。甲片残留的腹面皮肤组织经长时间自然风干,虽有降解现象,但 DNA 质量较高,扩增效果稳定良好。甲片碎片由于高度角质化, DNA 提取及扩增效果不如腹面皮肤组织,且提取过程较之复杂。因此,在今后的鉴定工作及遗传学研究中,可注意采集有残留腹面皮肤组织的甲片样品。

本研究表明,经处理后的标本和甲片中仍含有大量的 DNA,用经过改进的传统 DNA 提取方法,使用分子生物学中的常用试剂,即能从少量的样品中提得足够的 DNA,通过用引物进行 PCR 扩增,能获得用于测序分析的阳性产物。所以,利用穿山甲干皮标本、剥制标本、甲片并结合采集的新鲜样品,提取所需 DNA 进行分子标记开发等研究是完全可以的。

**致谢** 感谢广东省野生动物救护中心和华南野生动物物种鉴定中心提供部分样品及给予的大力支持。广东省野生动物保护与利用公共实验

室杨琼芳老师在实验过程中提供帮助与支持,谭梁静同学对稿件修改提供帮助,在此一并深表感谢!

## 参 考 文 献

- Cano R J, Poinar H N. 1993. Rapid isolation of DNA from fossil and museum specimens suitable for PCR. *Biotechnology*, 15 (3): 432 - 436.
- Gaubert P, Antunes A. 2005. Assessing the taxonomic status of the Palawan pangolin *Manis culionensis* (Pholidota) using discrete morphological characters. *Journal of Mammalogy*, 86 (6): 1068 - 1074.
- Horvuth M B, Martinez-Cruz B, Negro J J, et al. 2005. An overlooked DNA source for non-invasive genetic analysis in birds. *Journal of Avian Biology*, 36(1): 84 - 88.
- Irwin D M, Kocher T D, Wilson A C. 1991. Evolution of the cytochrome *b* gene of mammals. *Journal of Molecular Evolution*, 32(2): 128 - 144.
- Luo S J, Cai Q X, David V A, et al. 2007. Isolation and characterization of microsatellite markers in pangolins (Mammalia, Pholidota, *Manis* spp.). *Molecular Ecology Notes*, 7(2): 269 - 272.
- Paabo S. 1989. Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(6): 1939 - 1943.
- Pfeiffera I, Volkela I, Taubert H, et al. 2004. Forensic DNA-typing of dog hair: DNA-extraction and PCR amplification. *Forensic Science International*, 141(2/3): 149 - 151.
- Pichler F B, Dalebout M L, Baker C S, et al. 2001. Nondestructive DNA extraction from sperm whale teeth and scrimshaw. *Molecular Ecology Notes*, 1(1/2): 106 - 109.
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 463 - 468.
- Wallace D C. 1997. Mitochondrial DNA in aging and disease. *Scientific American Magazine*, 277(2): 40 - 47.
- Wandeler P, Hoeck P E A, Keller L F. 2007. Back to the future: museum specimens in population genetics. *Trends in Ecology and Evolution*, 22(12): 634 - 642.
- Wilson D E, Reeder D M. 1993. *Mammal Species of the World, A Taxonomic and Geographic Reference*. 2nd ed. Washington: Smithsonian Institution Press.
- 贾学渊, 白素英, 徐艳春, 等. 2007. 鞣制皮张 DNA 的提取. *东北林业大学学报*, 35(11): 66 - 69.
- 庞峻峰, 张亚平. 2001. 标本 DNA 研究进展. *动物学研究*, 22 (6): 490 - 496.
- 饶刚, 李明, 牛屹东, 等. 2001. 陈旧皮张中 DNA 提取的新方法. *动物学杂志*, 36(4): 53 - 57.
- 石建朋, 张学红, 张波. 2008. 砷对 DNA 的损伤. *中国地方病防治杂志*, 23(6): 439 - 440.
- 史燕, 吴孝兵, 晏鹏, 等. 2004. 扬子鳄鞣制皮革和鳞片的 DNA 提取方法. *动物学报*, 50(2): 297 - 301.
- 汪松. 1998. *中国濒危动物红皮书: 兽类*. 北京: 科学出版社, 367 - 371.
- 吴唤玲, 韩德民, 章敬旗, 等. 2007. 一种从鸟类剥制标本提取 DNA 的改进方法. *动物学杂志*, 42(1): 84 - 88.
- 吴诗宝, 马广智, 唐玫, 等. 2002. 中国穿山甲资源现状及保护对策. *自然资源学报*, 17(2): 174 - 179.
- 吴诗宝, 王应祥, 冯庆. 2005. 中国兽类一新纪录——爪哇穿山甲. *动物分类学报*, 30(2): 440 - 443.
- 薛小琦, 莫耀南. 2005. 腐败及角化组织的 DNA 提取及 mtDNA (CA)<sub>n</sub> 重复子分型. *河南科技大学学报: 医学版*, 23(4): 248 - 249.