

# mtDNA 标记在几种海关进出口动物产品 鉴定中的应用<sup>\*</sup>

杨光 蔡 珪 刘 海

(南京师范大学生命科学学院遗传资源研究所 南京 210097)

**摘要:** 从海关查获的动物及其制品中提取基因组 DNA, 通过 PCR 技术扩增 mtDNA 细胞色素 *b* (cytochrome *b*, *cyt b*) 和 12S rRNA 基因并测定其序列。利用互联网上丰富的基因数据库进行 BLAST 搜索, 准确地鉴定了动物的种类, 从而为海关查获的走私珍稀野生动物的鉴定提供了一条灵敏和可靠的途径。

**关键词:** 海关; 进出口动物; 线粒体 DNA; 鉴定

**中图分类号:** Q959.841, Q81 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2004)05-40-04

## Identification of Several Imported and Exported Animal Products by Mitochondrial DNA

YANG Guang CAI Yao LIU Hai

(College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

**Abstract:** Genomic DNA was extracted from several animal products provided by Nanjing Customs. Partial mitochondrial DNA cytochrome *b* (*cyt b*) and 12S rRNA genes were amplified and sequenced. The original animals of these products were successfully determined by BLAST search of these sequences in GenBank. The present study provides a novel approach for the identification of imported and exported animal products in customs.

**Key words:** Customs; Imported and exported animals; Mitochondrial DNA; Identification

近些年, 野生动物走私日渐嚣张, 已经成为世界第三大非法贸易。据估计, 每年走私野生动物的年交易额可达 100 亿美元, 其中走私濒危野生动物的年交易额至少达 20~30 亿美元, 这已对全世界的生物多样性构成严重威胁<sup>[1]</sup>。海关打击野生动物走私活动的力度也在加大, 查获走私野生动物的数量和等级均在上升<sup>[1-3]</sup>。

为了合理的利用野生动植物资源, 进一步适应我国野生动植物保护管理工作及社会经济发展的需要, 逐步实现野生动植物进出口管理工作的科学化、制度化、规范化, 国家濒危物种进出口管理办公室和海关总署于 2000 年根据《濒危野生动植物种国际贸易公约》、《中华人民共和国森林法》、《中华人民共和国野生动物保护法》、《中华人民共和国野生植物保护条例》、《中华人民共和国海关法》等法律法规, 制定了《进出口野生动植物种商品目录》。对目录中所列的野生动物或其

产品, 海关将按相关规定进行监管。其目的, 一方面是保护和支持合法的野生动植物贸易, 另一方面, 对涉及濒危野生动植物的走私活动则予以坚决打击。要到达上述目的, 首先就需要对海关查获的动物或其制品进行准确的种类鉴定。但由于进出口的动物及其制品来自全世界不同国家或地区, 种类繁多, 特别是一些经过加工的制品或与原动物相比在形态上有着显著的改变, 或已经完全缺失了用于鉴别的形态特征, 因此难以根据外形进行识别和鉴定。

<sup>\*</sup> 江苏省“青蓝工程”中青年学术带头人科研基金, 国家“211”工程“十五”建设项目资助;

**第一作者介绍** 杨光, 男, 35 岁, 博士, 教授, 博士生导师; 研究方向: 动物保护遗传学和分子生态学; E-mail: gyang@nynu.edu.cn。

收稿日期: 2003-10-20, 修回日期: 2004-07-05

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的识别。Dalebout 等用 mtDNA 控制区和 *cyt b* 基因序列进行喙鲸类的分类鉴定研究,并发现了一个新种——*Mesoplodon perrini*<sup>[4]</sup>。Baker 等对集市出售的鲸肉及鲸肉加工产品用分子标记技术进行了种类识别,以监测日本和韩国的捕捞渔业对鲸类的影响,取得了较好的效果<sup>[5]</sup>。杨光等则用 mtDNA 控制区和 *cyt b* 基因序列,成功地把中国水域的布氏鲸鉴定为小布氏鲸(*Balaenoptera edeni*)<sup>[6]</sup>。此外,在动物类中药材的鉴定中 DNA 分子标记技术也有着广泛的应用,包括蛇类、海马类、鹿类、药材、龟甲与鳖甲等药材真伪品的鉴别<sup>[7-10]</sup>。

本研究从动物胆、角和牙中成功地获得总 DNA。通过 PCR 技术扩增 mtDNA 上的细胞色素 *b* (cytochrome *b*, *cyt b*) 和 12S rRNA 基因的部分片断并进行序列测定。序列结果在 GenBank 进行 BLAST 搜索,找出相似性程度最高的物种,并下载了这些物种的序列,进行比对,结合形态特征准确鉴定其种类。目的是探讨 DNA 分子标记技术在海关进出口动物制品物种鉴定中的有效性。

1 材料与方法

1.1 样品采集和 DNA 提取 南京海关送检样品动物胆干制品 2 个、角 4 只、象牙制品 1 个(表 1)。

表 1 本研究使用的海关送检的进出口动物产品

编号	样品	时间 (年/月/日)	形态 鉴定	分子鉴定结果 (序列相似度)
HG01	动物胆	02/3/5	不确定	牛(100%) <i>Bos taurus</i>
HG02	动物胆	02/3/5	不确定	牛(100%) <i>B. taurus</i>
HG03	角	02/4/23	不确定	非洲弯角羚 (97.2%~98.2%) <i>Tragelaphus strepsiceros</i>
HG04	角	02/4/23	非洲弯角羚	(97.2%~98.2%) <i>T. strepsiceros</i>
HG05	角	02/4/23	不确定	非洲跳羚(98.7%) <i>Antidorcas marsupialis</i>
HG06	角	02/4/23	不确定	非洲黑斑羚(>99.5%) <i>Aepyceros melampus</i>
HG07	牙	03/05/12	不确定	象(99%) <i>Loxodonta africana</i>

胆干制品(HG01 和 HG02)的处理和 DNA 提取按照标准的蛋白酶 K 消化和酚/氯仿抽提的方法<sup>[11]</sup>进行。HG03、HG04 和 HG07 的处理则参照骨骼样品的处理方法<sup>[12]</sup>。样品 HG05 和 HG06 为带皮的角,参照饶刚等的

方法<sup>[13]</sup>从其角基部的皮中提取总 DNA。

1.2 PCR 扩增、序列测定 扩增 mtDNA 细胞色素 *b* 基因片段的引物为 L14724 和 H15149,扩增 12S rRNA 基因片段的引物为 L1091 和 H1478<sup>[14]</sup>。扩增反应在 PTC-200 型 DNA 热循环仪(MJ Research Inc.)上进行。反应总体积为 30  $\mu$ l,包括模板 DNA 5~50 ng,0.2 mmol/L dNTP,2.0 mmol/L MgCl<sub>2</sub>,10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3),50 mmol/L KCl,两条引物各 10 pmol,1 U *Taq* 酶(Promega)。反应体系在 95℃ 预变性 5 min,然后进入如下循环:95℃ 变性 30 s,55℃ 复性 30 s,72℃ 延伸 50 s,循环次数为 35。循环结束后在 72℃ 延伸 7 min。扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳,在图像分析系统 DGS-7600(UVP Inc.)上紫外检测、成像。产物用柱式 PCR 产物纯化试剂盒或胶纯化试剂盒(上海华舜生物工程有限公司)纯化。纯化产物用 Prism™ BigDye Terminator Ready Reaction 试剂盒(Applied Biosystem Inc.),在 PTC-200 型 DNA 热循环仪(MJ Research Inc.)和 310 型全自动遗传分析仪(Applied Biosystem Inc.)上进行。

为避免污染,所有提取和 PCR 扩增的操作都设阴性对照。

1.3 BLAST 搜索和序列比对 将所测序列在 GenBank 中进行 BLAST 搜索,并从数据库中下载相关物种的序列,与所鉴定物种的序列合并,用 Clustal X 软件<sup>[15]</sup>进行比对(alignment)。比对结果输入 MEGA 软件 2.1 版本<sup>[16]</sup>,计算所鉴定序列和相关物种序列之间的差异百分比,作为物种鉴定的依据。

2 结果

可能由于降解的原因,样品 HG03-HG06 中基因组 DNA 的提取产物较少,在琼脂糖凝胶电泳时无法检测出来,而样品 HG01-02 和 07 则得到了高质量的基因组 DNA。不过,不论基因组提取的质量如何,都能获得良好的 PCR 扩增产物(图 1)。通过对 PCR 产物的序列测定结果进行人工校正,从两个动物胆(HG01 和 HG02)中获得了 359 bp 的 *cyt b* 基因序列,且两个序列的碱基组成完全一致。从 HG03 和 HG04 均获得了 357 bp 的 *cyt b* 基因序列,两者的碱基组成也完全一致。样品 HG05 和 HG06 所测得的 *cyt b* 基因序列长度分别是 399 bp 和 414 bp。从样品 HG07 获得了 406 bp 的 12S rRNA 基因序列(图 2)。

当用上述序列在 GenBank 中进行 BLAST 搜索时,发现 2 个动物胆(HG01 和 HG02)的 *cyt b* 基因序列与牛(*Bos taurus*)的序列相似性高达 100%,而与熊类的序列差别很大(如与黑熊 *Ursus americanus* 的序列差异百分

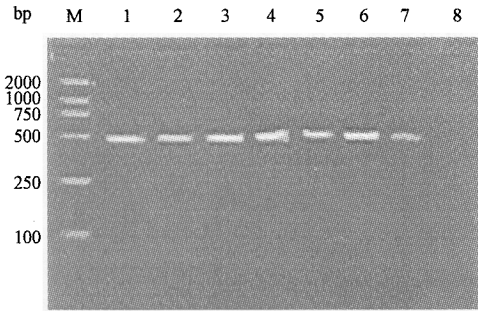


图1 南京海关几种进出口动物产品 *cyt b* 和 12S rRNA 基因的扩增产物

M:DL2000 分子量标记; 1~6. 样品 HG01-06 的 *cyt b* 基因扩增产物; 7. 样品 HG07 的 12S rRNA 基因扩增产物; 8. 阴性对照

比为 19.7% ~ 22.3%, 与灰熊 *U. arctos* 的序列差异百分比为 20.7% ~ 21.3%)。因此, 这两个胆应是牛胆而非怀疑的熊胆。HG03 和 HG04 的 *cyt b* 基因序列与非洲弯角羚 (*Tragelaphus strepsiceros*) 的序列相似性在 97.2% ~ 98.2% 之间, 与非洲弯角羚的种内序列相似性水平 (96.1% ~ 99.6%) 相当, 而与近缘种肯尼亚林羚 (*T. euryceros*)、非洲林羚 (*T. oryx*) 和林羚 (*T. speikii*) 序列相似性均不超过 93.6%。因此, 与基于角形态特征的鉴定结果一致, HG03 和 HG04 应是非洲弯角羚。HG05 与非洲跳羚 (*Antidorcas marsupialis*) 序列同源相似性超过 98.7%。而根据 GenBank 中查询得到的序列, 非洲跳羚种内单元型间的序列差异为 0.3% ~ 1.5%, 因此 HG05 应是非洲跳羚。同样, HG06 与 GenBank 中非洲黑斑羚 (*Aepyceros melampus*) 序列相似性在 99.5%

HG01 和 HG02, 线粒体细胞色素 *b* 基因, 359 bp

ACAAGAACACTAATGACTAACATTCGAAAGTCCACCCACTAATAAAAAATTGTAACAATGCATTCATCGACCTTCCAG  
CCCCATCAAACATTTTCATCATGATGAAATTTTCGGTTCCTCCTGGGAATCTGCCTAATCTACAAATCCTCAGAGCCT  
ATTCTAGCAATACACTACACATCCGACACAACAACAGCATTCTCCTCTGTTACCCATATCTGCCGAGACGTGAACATAC  
GGCTGAATCATCCGATACATACACGCAACGGAGCTTCAATGTTTTTATCTGCTTATATGCACGTAGGACGAGGCT  
TATATTACGGTCTTACACTTTTCTAGAAACATGAAATATTGG

HG03 和 HG04, 线粒体细胞色素 *b* 基因, 357 bp

CCCCATCAAATATCTCATCATGATGAACTTCGGATCCCTCTAGGAATCTGCCTAATCTACAAATCCTCAGAGCCTT  
ATTTCTAGCAATACACTACAGCCGAGACACAACAACAGCATTCTCTTCTGTCATCATATCTGCCGAGACGTAAACTAC  
GGCTGAATCATCCGATATATACATGCAACGGAGCCTCAATATCTTCATTGCTGTACATACATGTAGGACGGGGA  
TATATTACGGATCATACACTTTTCTAGAGACATGAAACATCGGAGTAATTCCTATTACCGTAATAGCCACAGCATT  
CATAGGCCTACGTGCTACCATGAGGACAATATCATTCTGA

HG05, 线粒体细胞色素 *b* 基因, 399 bp

AGACTCACCACCTCATAAAAAATTGTAATAACGCATTTCATGACCTTCCAGCCCCATCAAACATCTCATCATGATGAAA  
CTTCGGCTCCTTACTAGGTATCTGCTTAATCTACAAATTTTAACAGGCCTATTCTTGGCAATGCACTACACAGCCGAT  
ACAGAACAGCATTCTCCTCTGTACGCACATCTGCCGAGACGTCAACTACGGTTGAATTATTCGATACATACATGCGA  
ACGGAGCATCTATATTCTTCATCTGCCTCTTACACACGTAGGACGAGGCCTCTACTATGGATCATACACATTCCTAGA  
AACATGAAATGTTGGAGTAATCTTTTATTGCAACAATGGCTACAGCATTTCATAGGATACGTCTACCATGAGGACAA  
ATAT

HG06, 线粒体细胞色素 *b* 基因, 414 bp

ATTGAAAAATCACACCCACTAATAAAAAATTATTAATAACGCATTTCATGACCTACCAGCCCCATCAAACATTTTCATCAT  
GATGAAACTTCGGTTCTCTCCTAGGCATCTGCCTAATCTACAAATCCTAACAGGCCTATTCTAGCAATACACTACAC  
ATCTGACACAACAACAGCATTTCCTCTGTGACCCATATTGCCGAGATGTCAACTACGGATGGATTATCCGATATATA  
CATGCAACGGAGCATCAATGTTCTTCATCTGTCTATTTCATGTCATGTAGGACGAGGCTTATACTACGGATCATACTTAT  
TTCTAGAAACATGAAACATTGGAATTATCTTCTATTTCGCAACAATAGCCACAGCATTTCATAGGCTATGTCCTGCCATG  
AGGACAAATATCATTCTGA

HG07, 线粒体 12S rRNA 基因, 406 bp

GCCTGCCTAACTTTGTAGCTCCTTTCAAGCTTCCGACAGAACTCTAGCCAGAGCTTAAACTTAAAGGACTTGGCGGT  
GCTTTATATCCACCTAGGGAGGCTGTCTCGTAACCGATGAACCCGATATACCTTACCGTCACTTGCTAATTCAGTCC  
ATATACCACCATCTTCAGCAAAACCCCTATGGGGCACAAGTGAAGCTTAATCATAACCCATGAAAAAGTTAGGCGGAG  
GTGTGCCTACGTGACGGTCAAAGATGGGTACATTTTCTATTATAGAACAGACAAACGGATATCACTCTGAAATGGGT  
GGTTGAAGGCGGATTTAGTAGTAACTAAGAAATAGAGAGCTTAATTGAACAAGGCCATGAAGCGCGTACACACCGCCG  
TCACCCCTCTGG

图2 南京海关几种进出口动物产品的 *cyt b* 和 12S rRNA 基因部分序列

~100%,可以判定为非洲黑斑羚。HG07 与非洲象 (*Loxodonta africana*) 的 12S rRNA 序列相似性高达 99%,被判定为非洲象。

### 3 讨 论

随着分子生物学技术的发展,DNA 序列数据库也呈几何数增长。本研究正是利用 GenBank 中丰富的资源,将 PCR 和 PCR 产物的直接测序技术运用到海关进出口动物产品的物种鉴定中。由于 DNA 是生物的遗传信息载体,分析结果不受环境因素、样品形态(无论原品、粉状或片状)和材料来源的影响,克服了形态学鉴定中主观性强等缺点。同时此法还具有重复性好、灵敏度高等优点。此方法的另一大优点是不要求对所鉴定物种有很强的背景知识,如本研究中鉴定的非洲羚羊等物种来自非洲地区,在本地区没有分布,也缺乏这些物种的生物学资料。此外,本研究所选用 *cyt b* 基因和 12S rRNA 基因,进化速度适中,一个较小的基因片段就包含着从种内到种间乃至科间的进化遗传信息<sup>[17,18]</sup>,同时在 GenBank 中已经积累了大量的关于这两个基因的序列资源,可为物种鉴定提供丰富的可比较的数据库。毫无疑问,随着 GenBank 中更多 DNA 序列资源(mtDNA 和核 DNA)的积累,将在动物及其制品鉴定中必将发挥更广泛的作用。

本研究从南京海关送检的样品中,既鉴定出黑斑羚和非洲象等被 IUCN 红色名录列为濒危级(EN)的物种,也有弯角羚、跳羚等低危等级(LR)的动物,同时还有不属于濒危动物的牛。这对于海关在不妨碍合法的野生动植物贸易的前提下,准确地打击濒危野生动植物的走私活动,提供了可靠的依据。从长远来说,这将有效地促进世界范围内的生物多样性保护。

通过 PCR 和 PCR 产物的直接测序法使进出口动物产品的鉴定具有充分的科学性和较高的可靠性,但测序方法仍存在成本较高、鉴别程序较为复杂等缺点,今后有必要继续探索更快速、简捷、成本更低的技术。王义权等报道了一种新的 PCR 鉴别技术,即位点特异性鉴别 PCR(allele-specific diagnostic PCR)<sup>[19]</sup>。该方法主要是设计出鉴定物种的高度特异性引物。当有样品需要鉴定时,提取 DNA 后,用鉴别引物对样品 DNA 进行一次 PCR 反应,经电泳检测便可达到准确鉴别样品的目的。此法对实验操作要求不十分高,较易掌握,但海关动物的鉴定与中药材的鉴定具有不完全一致的特点,该方法是否能在进出口动物产品的鉴定中得到应用,值得进一步研究。同时,近年来发展起来的 DNA

芯片技术也将有可能用于进出口动物产品的鉴定中,使鉴别更迅速、简便,成本也可能更低。

### 参 考 文 献

- [1] 王乐乐. 亚洲的走私动物网络. 沿海环境, 2001, 8: 7.
- [2] 周敏. 我省野生动植物进出口管理现状及对策. 福建环境, 2002, 19(5): 11~13.
- [3] 安学义. 利剑斩黑手——一起跨国跨省走私野生动物案侦破纪实. 云南林业, 2000, 2: 10~11.
- [4] Dalebout M L, Mead J G, Baker C S, et al. A new species of beaked whale *Mesoplodon perreni* sp. n. (Cetacea: Ziphiidae) discovered through phylogenetic analysis of mitochondrial DNA sequence. *Marine Mammal Science*, 2002, 18(3): 577~608.
- [5] Baker C S, Lento G M, Cipriano F, et al. Scientific whaling: source of illegal products for market? *Science*, 2000, 290(5497): 1695~1696.
- [6] 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.
- [7] 王义权, 周开亚, 徐璐珊等. 中药材乌梢蛇及其混滑品的 DNA 序列分析鉴别. 药学报, 1999, 34(1): 67~71.
- [8] 吴平, 周开亚, 张朝晖等. 海马类药材的分子遗传标记鉴定研究. 药学报, 1998, 33(3): 226~233.
- [9] 刘向华, 王义权, 周开亚等. 鹿类中药材的位点特异性 PCR 鉴定研究. 药学报, 2001, 36(8): 631~635.
- [10] 刘中权, 王义权, 周开亚等. 中药材龟甲及原动物的高特异性 PCR 鉴定研究. 药学报, 1999, 34(12): 941~945.
- [11] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [12] 季国庆, 杨光, 刘珊等. 中国水域瓶鼻海豚的 mtDNA 控制区序列变异性分析. 动物学报, 2002, 48(4): 487~493.
- [13] 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: 53~57.
- [14] Kocher T D, Thomas W K, Meyer A, et al. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86: 6190~6200.
- [15] Jeanmougin F, Thompson J D, Gouy M, et al. Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends Biochem Sci*, 1998, 23: 403~405.
- [16] Kumar S, Tamura K, Jakobsen I B, et al. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics*, 2001, 17: 1244~1245.
- [17] Irwin D M, Kocher T D, Wilson A C. Evolution of the cytochrome *b* gene of mammals. *J Mol Evol*, 1991, 32: 128~144.
- [18] Wilson A C, Cann R L, Carr S M, et al. Mitochondrial DNA and two perspective on evolutionary genetic. *Biol J Linn Soc*, 1985, 26: 375~400.
- [19] 王义权, 周开亚, 徐璐珊等. 中药材分子标记鉴别新方法——PCR 鉴别法. 南京大学学报(自然科学版), 1997, 33: 136~138.