

# 12S rRNA 在黑麂和黄麂物种鉴定中的应用

贺培建 阮向东 方盛国\*

(浙江大学生命科学院, 国家濒危野生动植物种质基因保护中心, 濒危野生动物保护遗传  
与繁殖教育部重点实验室, 杭州, 310029)

关键词: 黑麂; 黄麂; 12S rRNA; 鉴定

中图分类号: Q751

文献标识码: A

文章编号: 1000 - 1050 (2004) 04 - 0350 - 03

## Application of 12S rRNA in the identification of *Muntiacus crinifons* and *Muntiacus reevesi*

HE Peijian RUAN Xiangdong FANG Shengguo\*

(College of life sciences, Zhejiang University, Hangzhou, 310029; State Conservation Center for Gene Resources of Endangered Wildlife;  
Key Laboratory of Conservation Genetics and Reproductive Biology for Endangered Wild Animals, Ministry of Education)

**Abstract:** The gene of 12S rRNA exhibits a high degree of conservation during animal evolution. Its sequence shows partial difference among species but little variation among individuals of the same species. Therefore, the 12S rRNA could be used to perform intra- and inter-specific identification studies. All the deer of genus *Muntiacus* become endangered due to excessive poaching and thus protected by China's Wildlife Protection Law at the national and provincial level. In this study, we employed the sequencing of 12S rRNA to identify two confiscated samples and found out that the two samples were *Muntiacus crinifons* and *Muntiacus reevesi*, respectively. The sequence of the 12S rRNA adopted in this study proved to be a suitable genetic marker for species identification of conservation animals.

**Key words:** *Muntiacus crinifons*; *Muntiacus reevesi*; 12S rRNA; Identification

黑麂 (*Muntiacus crinifons*), 别名乌獐, 其体长为 95 ~ 108 cm, 体重 21 ~ 26 kg, 是我国特有物种, 全国资源量约 6 000 只, 为国家 I 级重点保护的动物<sup>[1,2]</sup>。由于黑麂皮革上乘, 且肉嫩味美, 故长期被不法分子列为主要的偷猎对象之一<sup>[1]</sup>。黄麂 (*Muntiacus reevesi*), 又名小麂, 其体长为 73 ~ 87 cm, 体重 10 ~ 15 kg, 为浙江省重点保护的野生物种。由于黄麂的经济价值高, 一直为传统的出口商品。正因为如此, 黄麂在近年来遭到了人类的大肆猎杀<sup>[2]</sup>。

为了有效地保护以黑麂为代表的野生动物, 促进资源的可持续发展, 近年来浙江省林业主管部门在打击非法猎杀野生动物的过程中, 特别注重搜集现场查获的物证材料, 并及时送有关科研机构进行

科学鉴定, 以保证案件审理的准确性。本文所用检测材料, 就是 2003 年 3 月浙江省临安市森林警察大队在执行公务时收缴的物证材料。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料来源

1 号样品, 为 2003 年 3 月 6 日临安市森林警察大队在接到市民举报后, 在被举报人家的菜板上搜集到的残留肌肉渣; 2 号样品, 是 2003 年 3 月 22 日临安市森林警察大队在对某野味餐馆例行公务检查时, 获得的肌肉取材。以上样品, 于 2003 年 3 月 22 日送教育部濒危野生动物保护遗传与繁殖重点实验室要求做物种鉴定。由于送检单位对其送检材料疑为是黑麂的肌肉, 故作者于浙江大学生命科

基金项目: 国家林业局“948”项目 (2003 - 4 - 42)

作者简介: 贺培建 (1979 - ), 男, 硕士, 主要从事保护生物学研究。

收稿日期: 2004 - 03 - 28; 修回日期: 2004 - 06 - 28

\* 通讯作者, E-mail: sfgang@mail.hz.zj.cn

学学院标本室取了 2 只黑麂的皮张样品作为对照样品。

### 1.2 DNA 提取

干皮先用 TNE 缓冲液 (10 mM Tris - HCl, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, pH 7.8) 浸泡过夜, 然后将其剪成碎片并在研磨钵中边加液氮边将其研磨成粉末, 然后将粉末转移至具有 400  $\mu$ l 消化体系 (加有 40 mM DTT、2% SDS 和 100  $\mu$ g/ml 蛋白酶 K 的 TNE 溶液) 的离心管中, 于 56  $^{\circ}$ C 温浴过夜至溶液澄清<sup>[3]</sup>。肌肉组织则直接切碎, 同样于上述裂解体系和温度下反应过夜。消化后样品液先后经两次等体积酚 - 氯仿 - 异戊醇 (25:24:1, pH 8.0) 和二次氯仿 - 异戊醇 (24:1) 抽提。抽提上清液中加入 2.5 倍体积的无水乙醇于 -20  $^{\circ}$ C 沉淀 30 min。沉淀经真空干燥后溶于适量 TE 缓冲液 (10 mM Tris - HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) 中备用。

### 1.3 PCR 扩增及测序

采用 PCR 扩增哺乳动物 12S rRNA 序列的通用引物 (除去 5' 端部分序列)。上游引物为: 5' - AAAGTGGGATTA GATACCCCACTAT - 3', 下游引物为: 5' - GAGGGTGACGGCCGGTGTGT - 3'。扩增反应在 25  $\mu$ l 体系 (50 mM KCl, 10 mM Tris - HCl, 1.5 mM Mg<sup>2+</sup>, 0.8 mM dNTP, 上下游引物各 0.6  $\mu$ M) 中进行。反应条件为: 94  $^{\circ}$ C, 40 s; 55  $^{\circ}$ C, 40 s; 72  $^{\circ}$ C, 40 s, 35 个循环, 反应前于 94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 反应后再于 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物经纯化、克隆、重组子鉴定后, 通过 M13 正反向引物, 用 ABI Prism dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Applied Biosystems), 于 ABI Prism 377 DNA Sequenceer DNA 自动测序仪上进行测序。

### 1.4 序列分析

PCR 扩增产物经测序后, 通过 Clustal W 软件与 DNASTAR 中的 MegAlign 程序进行同源性分析, 并将序列在 NCBI 数据库内进行 Blast 比较。

## 2 结果

实验获得 4 个样品的 PCR 扩增片段, 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳并经 EB 染色后拍照 (图 1), 可见扩增条带大小在样品间无明显差别。进一步对 PCR 产物进行克隆、双向测序。结果显示: 2 个对照样品和 1 号样品测得的序列长度均为 440 个碱基, 2 号样品的序列长为 442 个碱基。通过

Clustal W 和 MegAlign 分析软件对测得序列进行同源性比较, 1 号样品与各个对照样品间的同源性均为 100%, 因此, 1 号样品与对照样品黑麂的序列完全一致, 并确定 1 号样品为黑麂。

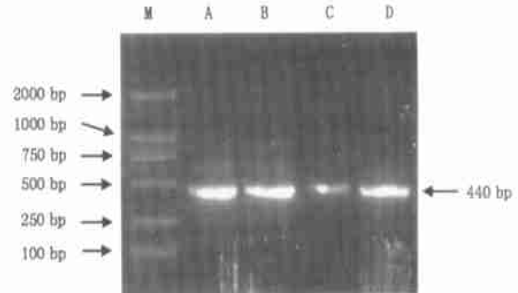


图 1 扩增 12S rRNA 的电泳图谱

Fig. 1 Electrophoresis map for the amplified 12S rRNA

M: DL2000 Marker; A: 对照样品 1 号 Control sample 1; B: 对照样品 2 号 Control sample 2; C: 鉴定样品 1 号 Identified sample 1; D: 鉴定样品 2 号 Identified sample 2

而 2 号样品与对照样品的同源性仅为 97.5%, 因此将 2 号样品序列在 NCBI 数据库内进行 blast 比较, 并截取与 2 号样品具有最高同源性序列的相应区段, 利用同源性比较软件进行同源性分析, 表明测得的 2 号待鉴定样品序列与黄麂的 12S rRNA (AF527537) 对应区段序列具有完全一致性, 认定其为黄麂。图 2 示各样品 12S rRNA 序列的同源性比较结果。

## 3 讨论

随着分子生物学手段在法医鉴定中的不断应用, 分子生物学技术在濒危野生动物物种鉴定中也得到了广泛的应用<sup>[3,4]</sup>。常用的鉴定方法主要有: 应用寡核苷酸探针杂交, 对亲缘关系较近物种进行有效鉴定<sup>[3]</sup>; 应用位点特异性引物进行 PCR 扩增, 根据能否产生目的扩增产物来鉴定<sup>[4]</sup>; RFLP 技术在物种鉴定中的应用<sup>[5]</sup>; 通过 PCR 扩增和测序, 并与对照样品序列或数据库中已有序列进行分析比较来鉴定等等。

应用 12S rRNA 进行物种鉴定有两个明显优势: 一是其具有高度保守性<sup>[8]</sup>; 二是 12S rRNA 序列在物种间具明显的可辨性<sup>[5~9]</sup>, 对已有数据进行统计比较, 结果表明, 其中属内种间最小序列变异度为 0.8%<sup>[5]</sup>。这些优势使应用 12S rRNA 通过引物扩增、测序以及序列比对, 进行物种鉴定成为可能。

|        |                               |   |
|--------|-------------------------------|---|
| 黄麂序列   | ( <i>M. reevesi</i> sequence) | AAACTGGGATTA GATACCCCACTATGCCTA GCCCTAAACACAAATA GTTTCACAA            |
| 鉴定样品 2 | (Identified sample 2)         | AAACTGGGATTA GATACCCCACTATGCCTA GCCCTAAACACAAATA GTTTCACAA            |
| 对照样品   | (Control sample)              | AAACTGGGATTA GATACCCCACTATGCCTA GCCCTAAACACAAATA GIT - CCACAA         |
| 鉴定样品 1 | (Identified sample 1)         | AAACTGGGATTA GATACCCCACTATGCCTA GCCCTAAACACAAATA GIT - CCACAA         |
|        |                               | *   |
| 黄麂序列   | ( <i>M. reevesi</i> sequence) | ACAAAACCTATTCGCCA GA G TACTACCGGCAATA GCTTAAAAC TCAAA GGACTTGCC       |
| 鉴定样品 2 | (Identified sample 2)         | ACAAAACCTATTCGCCA GA G TACTACCGGCAATA GCTTAAAAC TCAAA GGACTTGCC       |
| 对照样品   | (Control sample)              | ACAAAACCTATTCGCCA GA G TACTACCGGCAATA GCTTAAAAC TCAAA GGACTTGCC       |
| 鉴定样品 1 | (Identified sample 1)         | ACAAAACCTATTCGCCA GA G TACTACCGGCAATA GCTTAAAAC TCAAA GGACTTGCC       |
| 黄麂序列   | ( <i>M. reevesi</i> sequence) | GGTGCTTTA TACCCCTTCTA GA GGA GCCTGTCTATAA TC GA TAAACCCCGA TA GAC     |
| 鉴定样品 2 | (Identified sample 2)         | GGTGCTTTA TACCCCTTCTA GA GGA GCCTGTCTATAA TC GA TAAACCCCGA TA GAC     |
| 对照样品   | (Control sample)              | GGTGCTTTA TACCCCTTCTA GA GGA GCCTGTCTATAA TC GA TAAACCCCGA TA GAC     |
| 鉴定样品 1 | (Identified sample 1)         | GGTGCTTTA TACCCCTTCTA GA GGA GCCTGTCTATAA TC GA TAAACCCCGA TA GAC     |
| 黄麂序列   | ( <i>M. reevesi</i> sequence) | CTCACCA TTCCTC GCTAA TACA G TCTATA TACC GCCA TCTTCA GCAAAACCTAAAA     |
| 鉴定样品 2 | (Identified sample 2)         | CTCACCA TTCCTC GCTAA TACA G TCTATA TACC GCCA TCTTCA GCAAAACCTAAAA     |
| 对照样品   | (Control sample)              | CTCACCA TTCCTC GCTAA TACA G TCTATA TACC GCCA TCTTCA GCAAAACCTAAAA     |
| 鉴定样品 1 | (Identified sample 1)         | CTCACCA TTCCTC GCTAA TACA G TCTATA TACC GCCA TCTTCA GCAAAACCTAAAA     |
| 黄麂序列   | ( <i>M. reevesi</i> sequence) | AGGAATAAAA GTAA GC CCAATCA TAA TAC GTAAAAAC GTTA GGTC AA GGTGTAACC    |
| 鉴定样品 2 | (Identified sample 2)         | AGGAATAAAA GTAA GC CCAATCA TAA TAC GTAAAAAC GTTA GGTC AA GGTGTAACC    |
| 对照样品   | (Control sample)              | AGGA GTGAAA GTAA GC CCAATCA TA GTACATAAAAAC GTTA GGTC AA GGTGTAACC    |
| 鉴定样品 1 | (Identified sample 1)         | AGGA GTGAAA GTAA GC CCAATCA TA GTACATAAAAAC GTTA GGTC AA GGTGTAACC    |
|        |                               | * * * * *   |
| 黄麂序列   | ( <i>M. reevesi</i> sequence) | TATGGGATGGGAA GAAATGGGCTACATTTTCTA ACTTAA GAATAA TTCATATACGA          |
| 鉴定样品 2 | (Identified sample 2)         | TATGGGATGGGAA GAAATGGGCTACATTTTCTA ACTTAA GAATAA TTCATATACGA          |
| 对照样品   | (Control sample)              | TATGGAA TGGAAA GAAATGGGCTACATTTTCTA A TTTAA GAACAACTCA - ATACGA       |
| 鉴定样品 1 | (Identified sample 1)         | TATGGAA TGGAAA GAAATGGGCTACATTTTCTA A TTTAA GAACAACTCA - ATACGA       |
|        |                               | * * * * *   |
| 黄麂序列   | ( <i>M. reevesi</i> sequence) | AA GTTATTA TGAATAA TAA TAACCAAA GGA G GATTTA GCA GTAAACTAA GAATA GA G |
| 鉴定样品 2 | (Identified sample 2)         | AA GTTATTA TGAATAA TAA TAACCAAA GGA G GATTTA GCA GTAAACTAA GAATA GA G |
| 对照样品   | (Control sample)              | AA GTTATTA TGAATAA TAA TAACCAAA GGA G GATTTA GCA GTAAACTAA GAATA GA G |
| 鉴定样品 1 | (Identified sample 1)         | AA GTTATTA TGAATAA TAA TAACCAAA GGA G GATTTA GCA GTAAACTAA GAATA GA G |
| 黄麂序列   | ( <i>M. reevesi</i> sequence) | TGCTTA GTTGAATTA GGCCATGAA GCACGCACACACC GCCCGTACCCCTC                |
| 鉴定样品 2 | (Identified sample 2)         | TGCTTA GTTGAATTA GGCCATGAA GCACGCACACACC GCCCGTACCCCTC                |
| 对照样品   | (Control sample)              | TGCTTA GTTGAATTA GGCCATGAA GCACGCACACACC GCCCGTACCCCTC                |
| 鉴定样品 1 | (Identified sample 1)         | TGCTTA GTTGAATTA GGCCATGAA GCACGCACACACC GCCCGTACCCCTC                |

图 2 对照样品、鉴定样品与黄麂 12S rRNA 序列比较 (\* 示变异位点)

Fig. 2 Comparison of control sample, identified samples and the 12S rRNA sequence of the *M. reevesi* (\* indicates variable sites)

本次鉴定通过扩增和测序 12S rRNA，经同源性比较软件分析发现，1 号和 2 号待鉴定样品分别与对照样品黑麂序列和 Genbank 内黄麂 12S rRNA 序列完全一致，从而成功地对疑为是黑麂的待测样品，做出了明确鉴定。这在科学上，表明 12S rRNA 除了作为系统分类、进化分析与药品质监中的工具之外<sup>[10-11]</sup>，在濒危野生动物的执法鉴定中，不失为一种有效的遗传标记。同时，对物种的准确鉴定，为相关部门依法办案，提供了可靠的依据。

参考文献：

[1] 汪松主编. 中国濒危动物红皮书(兽类) [M]. 北京: 科学出版社, 1998. 282 - 283.  
 [2] 刘明玉, 解玉浩, 季达明主编. 中国脊椎动物大全 [M]. 沈阳: 辽宁大学出版社, 2000. 804.  
 [3] Fang Shengguo, Wan Qiuhong. A genetic fingerprinting carcasses of protected deer species in China [J]. *Biological Conservation*, 2002, **103**: 371 - 373.

[4] Wan Qiuhong, Fang Shengguo. Application of species-specific polymerase chain reaction in the forensic identification of tiger species [J]. *Forensic Science International*, 2003, **131**: 75 - 78.  
 [5] 吴平, 周开亚, 张朝晖, 徐璐珊. 海马类药材的分子遗传标记鉴定研究 [J]. *药学学报*, 1998, **33** (3): 226 - 2333.  
 [6] 江建平, 周开亚. 从 12S rRNA 基因序列研究中国蛙科 24 种的进化关系 [J]. *动物学报*, 2001, **47** (1): 38 - 44.  
 [7] 童宗中, 王义权, 周开亚. 从 12S rRNA 基因片段序列研究 20 种蛇的系统发生关系 [J]. *动物学报*, 2002, **48** (4): 494 - 500.  
 [8] 姜海英, 陆佩洪, 李悦民. 鹟科五种鸟类线粒体 DNA 序列变化与亲缘关系的研究 [J]. *遗传*, 2001, **22** (1): 21 - 24.  
 [9] 易广才, 张晓梅, 单祥年. 麂属 (*Muntiacus*) 动物线粒体 12S rRNA、细胞色素 b 基因和多药耐药基因序列分析及其分子进化关系 [J]. *遗传学报*, 2002, **29** (8): 674 - 680.  
 [10] 张亚洲, 张亚平. 12S rRNA 基因序列变异与六足总纲高级单元系统分类 [J]. *科学通报*, 2000, **45** (22): 2434 - 2438.  
 [11] 杨学干, 王义权, 周开亚, 刘中权, 赵文阁. 中药材哈蟆油 PCR 鉴定的初步研究 [J]. *应用与环境生物学报*, 2000, **6** (2): 166 - 170.

