

應用粒線體DNA鑑定臺灣產鹿科動物 肉類製品之種類

楊懿如¹、林曜松²、劉怡里²

¹慈濟大學生命科學系 花蓮市中央路三段701號

²台灣大學動物學系 台北市羅斯福路四段1號

摘要

本研究利用 PCR-RFLP (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism) 方法分析粒線體DNA的細胞色素b (cytochrome b) 基因，以建立臺灣產鹿科動物肉類製品的鑑定基準，並協助野生動物保育法執行。利用 13種限制內切酶對 14份包括水鹿、梅花鹿、山羌、紅鹿、牛及豬肉樣本進行單酶切作用，結果依片段長度多型態性的一致性可分成8個單倍基因型 (haplotype)，每個種類都有其特有的單倍基因型，可用來作為種類鑑定之用。根據研究結果，本文提出利用粒線體 DNA及PCR-RFLP方法辨識臺灣產鹿科動物的簡單鑑定流程，並探討方法的適用性及優缺點。

關鍵詞：聚合酶連鎖反應、粒線體DNA細胞色素b基因、片段長度多型態性變異、野生動物蒐證學、鹿科動物

收件日期：2000年2月29日

接受日期：2000年12月4日

緒言

我國野生動物保育法及文化資產保存法之訂定，對於保育類野生動物之獵捕、販售，均有規定之刑責。然而，迄今因國內對於保育類野生動物之辨識尚有許多亟待釐清與深入瞭解之處，而處理後的肉類製品也很難從外形加以判斷，以致其罰則難以落實而收嚇阻懲戒之效。在國內保育類野生動物之中，哺乳類所面臨之非法狩獵與交易之情形，尤為嚴重 (王 1987)。因此，發展一簡易、方便而準確的鑑識技術，以支援野生動物保育相關法令之執行，就成為當務之急。

臺灣產的鹿科動物，包括水鹿(*Cervus unicolor swinhoei*)、梅花鹿(*Cervus nippon taivanus*) 以及山羌 (*Muntiacus reevesi micrurus*)，但目前在臺灣野外已無野生梅花鹿的蹤跡，野生水鹿的數量也相當稀少 (王 1987)。修訂之野生動物保育法施行細則，將野生水鹿及山羌列為第二級珍貴稀有之保育類野生動物，禁止狩獵及交易。不過由於水鹿和梅花鹿的養殖曾經是政府所鼓勵發展的精緻農業，迄今仍維持相當數量的養殖族群。此外，許多養鹿農戶及畜產試驗單位並自國外引進其他鹿科物種，如北美洛磯山紅鹿 (*Cervus nelsoni*)、暹羅鹿 (*Cervus eldi*) 等與臺

灣原產之梅花鹿、水鹿進行雜交育種，所以目前臺灣各地的水鹿、梅花鹿養殖族群，可能已有部分個體混雜其他鹿科動物的基因之情形。因此，開發鹿科動物肉類之鑑定技術，不但直接有利於保育工作的推行，也可能對本省養鹿之畜牧業有正面的助益。

由於分子生物學領域的長足進步，使得運用分子生物學技術進行物種的鑑識，變得相當簡易而且有效，尤其近年來有許多利用粒線體 DNA 鑑定物種的成功案例 (Baker and Palumbi 1994, 1995 ; Baker *et al.* 1996)。大多數脊椎動物的粒線體DNA分子量大約16到18 Kb之間 (1 Kb表1000個鹼基對)，基因的組成相當保守，13個蛋白質基因，22個tRNA 基因及 2 個rRNA 基因約占整個粒線體分子的90%，其餘10%為非譯碼區 (noncoding region) (Brown *et al.* 1979)。粒線體DNA屬於母系遺傳 (maternal inheritance)，很少有重組現象 (David and Blackler 1972)；而且缺乏修補系統 (repair system)，因此具有較高的突變率，使粒線體DNA的演化速率大約是細胞核內DNA的5-10倍 (Brown *et al.* 1979)。粒線體DNA的分子量小，容易分離、分析，因此是研究動物族群型態結構、基因交流、雜交、生物地理學及物種類緣關係的一個有利工具 (Moritz *et al.* 1987)。

過去利用粒線體DNA研究物種之遺傳結構，或不同地理族群間之隔離、演化關係時，常利用限制內切 Ⅲ 片段長度多型態性分析 (以下簡稱為RFLP, restriction fragment length polymorphism) 的方法。因為RFLP具有方法簡單，不須昂貴精密的設備，且適合樣本數大的實驗等優點 (Avisé *et al.* 1987 ; Dowling *et al.* 1990)。聚合 Ⅲ 連鎖反應 (PCR: polymerase chain reaction) 產物之限制內切 Ⅲ 片段長度多型態性 (以下簡稱為PCR-RFLP) 則是最近發展出來的一種快速又有效的方

法，其原理是將聚合 Ⅲ 連鎖反應產物用限制內切 Ⅲ 作用切割成小片段，由於種間 DNA 序列不同，不同種生物的限制內切 Ⅲ 片段長度會有所不同，藉此可區分不同的物種，並建立種間的親緣關係。

本研究即以臺灣產鹿科動物粒線體 DNA 為目標，應用 PCR-RFLP 方法建立臺灣鹿科動物肉類製品的鑑定基準，並評估其適用性。

材料與方法

一、樣本的收集

自1994年5月至1995年3月，赴全省各地收集鹿科肉類樣本，來源包括臺北市立動物園、行政院農業委員會特有生物研究保育中心 (TESRI)、墾丁國家公園梅花鹿復育中心 (KNP)、國立自然科學博物館蒐藏研究組 (NMNS)、高雄及南投山產店以及桃園、彰化、臺南、臺東等地的養鹿場，共計有 27份國內外鹿科肉類樣本 (表1)。此外，也收集外觀和鹿肉容易混淆的牛、豬肉及長鬃山羊等肉類樣本 3份，以作為比對之用。

二、粗DNA (crude DNA) 之抽取

抽取肌肉組織之粗DNA的方法乃參考 Kocher *et al.* (1989) 的方法加以改良，其簡單流程如下：將少量 (0.01-0.02g) 肉類製品放入含 1 ml 消化緩衝液 (digestion buffer : 10 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 10 mM NaCl, 1 % SDS, 10 mg/ml DTT, 0.5 mg/ml proteinase K) 的均質器中均質，然後在55°C、並加以震盪的情況下作用一夜，再用酚溶液 (phenol) 及氯仿溶液 (chloroform) 去除蛋白質及多醣類，最後經酒精沉澱及抽真空乾燥的方法獲得DNA，將此 DNA產物放在 -20°C 冷凍櫃中備用。

表1. 樣本收集時間、地點及 DNA 抽取編號紀錄，樣本種名根據提供者的資料，正確種名見內文結果

Table 1. Date, locality and DNA code number of cervids samples

Date	Code	Species name	Common name	Locality	Source
Dec. 1994	M5 *	<i>Muntiacus reevesi</i>	Formosan muntjac	Kaohsiung, Jeashian	Restaurant
Dec. 1994	M7	<i>Muntiacus reevesi</i>	Formosan muntjac	Nantou	TESRI
Dec. 1994	M8	<i>Muntiacus reevesi</i>	Formosan muntjac	Nantou	TESRI
Dec. 1994	M9	<i>Muntiacus reevesi</i>	Formosan muntjac	Nantou	TESRI
Dec. 1994	M11	<i>Muntiacus reevesi</i>	Formosan muntjac	Nantou	TESRI
Dec. 1994	M15	<i>Muntiacus reevesi</i>	Formosan muntjac	Nantou	TESRI
Dec. 1994	M16	<i>Muntiacus reevesi</i>	Formosan muntjac	Taipei	Taipei Zoo
Dec. 1994	M13	<i>Muntiacus reevesi</i>	Formosan muntjac	Nantou	TESRI
Feb. 1995	M28	<i>Muntiacus reevesi</i>	Formosan muntjac	Taipei, Juifang	NMNS
Feb. 1995	M29	<i>Muntiacus reevesi</i>	Formosan muntjac	Taipei	Taipei Zoo
Feb. 1995	M30 *	<i>Muntiacus reevesi</i>	Formosan muntjac	Taoyuan	Farm
Feb. 1995	M31 *	<i>Muntiacus reevesi</i>	Formosan muntjac	Taoyuan	Farm
Aug. 1994	M1 *	<i>Cervus unicolor</i>	Sambar	Kaohsiung, Jeashian	Restaurant
Dec. 1994	M2	<i>Cervus unicolor</i>	Sambar	Kaohsiung, Jeashian	Restaurant
Dec. 1994	M10	<i>Cervus unicolor</i>	Sambar	Nantou	TESRI
Dec. 1994	M12	<i>Cervus unicolor</i>	Sambar	Nantou	TESRI
Dec. 1994	M14	<i>Cervus unicolor</i>	Sambar	Nantou	TESRI
Feb. 1995	M18 *	<i>Cervus unicolor</i>	Sambar	Taitung	Farm
Feb. 1995	M19 *	<i>Cervus unicolor</i>	Sambar	Taitung	Farm
Feb. 1995	M22	<i>Cervus unicolor</i>	Sambar	Tainan, Chiali	Farm
Feb. 1995	M24	<i>Cervus unicolor</i>	Sambar	Tainan, Chiali	Farm
Feb. 1995	M20 *	<i>Cervus nippon</i>	Sika deer	Taitung	Farm
Feb. 1995	M21 *	<i>Cervus nippon</i>	Sika deer	Pingtung, Kenting	KNP
Feb. 1995	M23 *	<i>Cervus nippon</i>	Sika deer	Tainan, Chiali	Farm
Feb. 1995	M25	<i>Cervus nippon</i>	Sika deer	Changhua, Ellin	Farm
Feb. 1995	M26 *	<i>Cervus nippon</i>	Sika deer	Changhua, Ellin	Farm
Feb. 1995	M27 *	<i>Cervus nelsoni</i>	Red deer	Changhua, Ellin	Farm
May 1994	M40 *	<i>Naemorhedus swinhoei</i>	Formosan serow	Nantou	Restaurant
May 1994	pork *		pig	Taipei	Market
May 1994	beef *		cattle	Taipei	Market

* RFLP analysis

三、聚合酶連鎖反應

選用粒線體 DNA細胞色素 b基因兩側的部分核酸序列作為引子；引子CL1位於輕股(light strand)，序列為5'-CGAAGCTTGATATG AAAAACCATCGTTG-3'，引子 CH2位於重股(heavy strand)，序列為5'-AACTGCAGTCAT CTCCGTTTACAAGAC-3' (Dewalt *et al.* 1993)。增幅出來的 DNA片段長約1.3 Kb，包

括整個細胞色素 b基因。

雙股DNA聚合酶連鎖反應是在總體積為50 μL的反應液內進行，反應液內含1單位的聚合酶 (Super Taq polymerase, HT Biotechnology LTP)，5 μL 10倍緩衝溶液(reaction buffer)，0.4 μL的dATP、dGTP、dCTP、dTTP (各25 mM) 之dNTP混合溶液，一對各1 μL 20 pmole 的重股及輕股引子CL1與CH2，1 μL粗

DNA 抽取液。聚合酶連鎖反應是在 Perkin Elmer-Cetus 製造的溫度循環器 (Thermal cycler) 進行，雙股 DNA 聚合酶連鎖反應共進行 32 個循環，每個循環的流程 (profile) 設定為：94°C，40 秒，使 DNA 雙股變性解開 (denaturation)；50°C，40 秒，使 DNA 與引子煉合 (annealing)；72°C，1 分 40 秒，進行 DNA 之延伸作用 (extension)，最後在 72°C 下作用 10 分鐘，使反應更完全。

四、限制內切酶作用

聚合酶連鎖反應所產生的雙股 DNA 先以 NUCLEOTRAP[®]CR (MACHEREY-NAGEL) 予以純化，以去除多餘的緩衝溶液、dNTP 及引子等。先利用 23 種限制內切酶對 DNA 編號 M1、M18、M19、M20、M21、牛做單酶切處理 (single digestion)，以篩選能產生片段長度多型態性的限制內切酶。其中 13 種限制內切酶 (*Alu I*, *Msp I*, *Mse I*, *Sau3A I*, *Taq I*, *Rsa I*, *Hpa II*, *Hinf I*, *Dde I*, *Hinc II*, *Sau96 I*, *Ava II*, *EcoR I*) 產生多型態性，再用這 13 種限制內切酶作用於其他所有的樣品。進行限制內切酶處理時，主要是參考 Laguerre *et al.* (1994)。總反應體積為 20 μ L，其中含有 100 ng 純化的 PCR 產物，2 μ L 的 10 倍緩衝溶液，1 單位的限制內切酶，其餘體積用 TE 緩衝溶液補

足。除了 *Taq I* 須於 65°C 水浴加熱外，其餘均於 37°C 水浴加熱 4 小時。限制內切酶作用完畢後，加入 3 μ L 的 6 倍染色溶液，然後取 11.5 μ L 溶液在 3%-4.5% 低溶解度瓊脂膠體 (low melting gel, Nusieve agarose : agarose I = 3 : 1) 做電泳解析。電泳後的膠體經過溴化乙啶螢光染色劑 (0.5 μ g / ml EtBr) 處理後，配合所選用之標幟如 100 bp ladder marker (BRL) 及 superladder marker (GenSura)，可求得各限制內切酶所切特定粒線體 DNA 片段的分子量。經比對電泳型態之後，可得知種間之差異。

五、定序

為了能精確區分山羌、水鹿及梅花鹿，將確定為水鹿 (DNA 編號 M1)、梅花鹿 (DNA 編號 M23) 及山羌 (DNA 編號 M31) 的粒線體 DNA 細胞色素 b 基因輕股約 278 bp 定序出來做為比對標準。DNA 定序反應是根據 Sanger *et al.* (1977) 發表的雙去氧核糖鏈停止法 (dideoxynucleotide chain termination)。用電泳透析法將聚合酶連鎖反應產生的雙股 DNA 片段純化出來，取 100 - 200 ng DNA，加 5 pmole 單條引子，以 [α - ³⁵S] 作為標記物，利用 Amplicycle sequencing kit (Perkin Elmer) 及溫度循環器進行定序反應。反應後

表 2. PCR 產物在限制內切酶作用後產生的各種單倍基因型之代號及其組成樣本

Table 2. Samples and species of the haplotypes defined by the PCR-RFLP method

Haplotype	Species	Sample
D1	<i>Cervus unicolor</i>	M1
D2	<i>Cervus nippon</i>	M23
D3	<i>Cervus nippon</i>	M20, M21, M26, M18, M19
D4	<i>Cervus nelsoni</i>	M27
D5	<i>Muntiacus reevesi</i>	M5
D6	<i>Muntiacus reevesi</i>	M30, M31, M40
cattle	Cattle	Beef
pig	Pig	Pork

以 6% 聚丙烯醯胺膠 (polyacrylamide gel) 做電泳分析，再以膠片轉附到 3 MM 濾紙上，經烘乾後，以 X-Omat film (Kodak) 壓片 2-10 天，經顯影 (develop) 及定影 (fix) 後判讀 DNA 序列。

結果

一、粗DNA之抽取

收集所得的30個肉類樣本中，僅有14個樣品其純化之聚合酶連鎖反應產物可以有效的被限制內切酶作用。在放棄的 16個樣本中，有一半的樣本無法得到粗 DNA，其餘一半的樣本其聚合酶連鎖反應產物的產量及品質均甚低，不足以供限制內切酶作用。

二、限制內切酶片段長度多型態性與單倍基因型

在所取用的14個樣本中，依其粒線體 DNA細胞色素 b基因限制內切酶片段長度多型態性的一致性可分成8種單倍基因型，各種單倍基因型代號及其組成樣品代號見表2，表3顯示的是各種單倍基因型之限制內切酶片段長度。這8種單倍基因型中，除了D3、D6外，都是由單一樣本及種類構成。D3包括梅花鹿 (DNA編號M20、M21、M26) 及水鹿 (DNA編號M18、M19) 兩種肉類樣本，D6包括山羌 (DNA編號M30、M31) 及長鬃山羊的樣本 (DNA 編號 M40)。但長鬃山羊在分類上屬於牛科，與屬鹿科的山羌在分類及親緣上關係甚遠，不可能有相同的基因型。而 D6和屬於山羌的 D5單倍基因型差異很小，僅在 *Hinf I*及*Sau3A I*限制內切酶作用時產生不同長度的片段型態 (表3)；但D6和牛肉的單倍基因型則差異很大，有10種限制內切酶作用產生完全不同的片段長度型態 (表3)，因此，判斷 DNA編號 M40的肉類樣本應該是山羌，但被提供者誤判為長鬃山羊。

至於包括水鹿及梅花鹿兩種肉類樣本的 D3單倍基因型，也可能是提供者誤判造成同一單倍基因型包含不同種類，因為提供者宣稱為水鹿肉 DNA編號 M18、M19，以及宣稱為梅花鹿肉 DNA編號 M20肉類樣本都來自同時飼養水鹿及梅花鹿的臺東養殖場，兩種鹿肉樣本同時存放在冰櫃中，有誤拿的可能性。而 D3單倍基因型和確定屬於水鹿的 D1及梅花鹿的 D2單倍基因型三者間的限制內切酶片段長度型態互有異同 (表3)。因此，為了確定 D3單倍基因型的鹿科動物種類，將確定為水鹿 (DNA編號M1)、梅花鹿 (DNA編號M23) 及山羌 (DNA編號M31) 的部分粒線體 DNA細胞色素 b基因定序出來做為比對標準。而 D3單倍基因型中，梅花鹿及水鹿各取一個肉類樣本進行定序分析，並比較其異同。其中梅花鹿是取自墾丁野放梅花鹿族群的 DNA編號 M21樣本，水鹿取自臺東養殖場 DNA編號 M19的樣本。因此共對 5個樣本 (DNA編號M1、M19、M21、M23、M31)，三個種類 (水鹿、山羌、梅花鹿) 進行定序分析。

表4顯示的是 DNA編號M1、M19、M21、M23、M31等5個樣本的粒線體 DNA細胞色素 b基因輕股的 278個鹼基對序列，5個鹿肉樣本和人類此部分細胞色素 b基因序列 (Anderson *et al.* 1981) 相似度為 73%-77%，因此確定增幅出來的 DNA片段屬於粒線體 DNA細胞色素 b基因。比較 5個樣本的序列相似性發現，臺東養殖場提供的 DNA編號 M19鹿肉樣本和墾丁野放梅花鹿 DNA編號 M21樣本的序列完全相同，並和確定為梅花鹿的 DNA編號 M23樣本僅有 2個鹼基對之差異。但 DNA編號 M19的鹿肉樣本和確定為水鹿的 DNA編號 M1樣本有 9個鹼基對之差異，和山羌之差異則高達 28個鹼基對。由序列相似性來看，臺東養殖場提供的肉類樣品是梅花鹿。同樣的，單倍基因型和 DNA編號M19相

表3. 臺灣產之鹿科動物與北美紅鹿、牛、豬等動物其粒線體DNA細胞色素b基因片段，經13種限制內切酶作用下，切出分子量大小不同的片段，數字表示估計的片段分子量大小 (Kb)

Table 3. Thirteen restriction enzymes used for the RFLP analysis of the cytochrome b region and observed fragment patterns for the cervids of Taiwan, *Cervus nelsoni*, cattle and pig

Restriction enzyme	Haplotype (species)						cattle	pig
	D1(<i>C. unicolor</i>)	D2(<i>C. nippon</i>)	D3(<i>C. nippon</i>)	D4(<i>C. nelsoni</i>)	D5(<i>M. reevesi</i>)	D6(<i>M. reevesi</i>)		
<i>Alu</i> I	1.30	1.30	1.30	1.30	1.00	1.00	0.48	0.44
					0.30	0.30	0.44	0.30
<i>Msp</i> I	0.80	1.30	1.30	1.30	1.00	1.30	1.20	0.68
	0.45						0.30	0.20
<i>Mse</i> I	1.30	1.30	1.30	0.42	0.70	0.70	0.80	0.70
				0.42	0.38	0.38	0.50	0.22
				0.23	0.18	0.18		0.14
								0.13
<i>Sau3A</i> I	0.38	0.38	0.38	0.38	0.38	0.38	0.84	0.60
	0.36	0.30	0.30	0.30	0.35	0.35	0.36	0.38
	0.30	0.26	0.26	0.26	0.30	0.30		0.30
	0.24	0.14	0.14	0.14	0.22	0.22		
		0.09	0.09	0.09	0.14	0.09		
<i>Taq</i> I	0.65	0.65	0.65	0.65	0.56	0.56	0.56	0.50
	0.28	0.26	0.26	0.26	0.52	0.52	0.48	0.33
	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24	0.20	0.30
<i>Rsa</i> I	0.46	0.46	0.46	0.46	1.30	1.30	0.70	0.50
	0.36	0.36	0.36	0.36			0.30	0.40
	0.38	0.38	0.38	0.38			0.15	
	0.17	0.17	0.17	0.17				
<i>Hpa</i> II	0.80	1.30	1.30	1.30	1.30	1.30	1.20	1.30
<i>Hinf</i> I	0.45							
	0.28	0.28	0.55	0.36	0.28	0.58	0.68	0.55
	0.26	0.26	0.25	0.36	0.26	0.55	0.20	0.52
	0.25	0.25	0.23	0.26	0.25	0.09	0.17	
	0.20	0.20	0.15	0.15	0.20		0.12	
<i>Dde</i> I	0.15	0.15	0.08	0.08	0.15			
	0.08	0.08			0.08			
	0.50	0.50	0.50	0.50	0.55	0.55	0.48	0.55
	0.32	0.32	0.32	0.38	0.48	0.48	0.28	0.48
	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22	0.26	0.28
<i>Hinc</i> II	0.18	0.18	0.18	0.13			0.14	
	1.30	1.30	1.30	1.20	1.05	1.05	1.20	0.65
<i>Sau96</i> I				0.13	0.27	0.27		0.59
	0.80	0.80	1.30	1.30	1.30	1.30	0.84	1.30
	0.35	0.35					0.36	
<i>Ava</i> II	0.12	0.12						
	0.80	0.80	1.30	1.30	1.30	1.30	1.20	1.30
<i>EcoR</i> I	0.45	0.45						
	0.80	0.80	1.30	1.30	1.30	1.30	1.20	1.30
				0.22	0.22			

表4. DNA編號M1 (水鹿)、M23、M19、M21 (梅花鹿)、M31 (山羌)及人類之粒線體DNA細胞色素 b 基因輕股 278個鹼基對之比較 (· 表示和DNA編號M1相同)

Table 4. Sequences of 278 nucleotides from the light strand of mitochondrial DNA cytochrome b gene for *Cervus unicolor* (M1), *Cervus nippon* (M19, M21, M23), *Muntiacus reevesi* (M31) and human. Nucleotide positions indicated by dots are identical to those on the first line(M1)

	<u>*1</u>	50bp
M1	ATGACCAATATCCGAGAAACCCACCCATTAATAAAGATTGTGAACAACGC	
M19, M21G.....	
M23G.....	
M31C.....A.....A.....	
humanCCA..A..CA...TTA...CC.....A.T..AATTA.C.T.	
		100bp
M1	ATTCATTGACCTCCCAGCCCCATCAGATATTTTCATCCTGATGAAATTTTCG	
M19, M21CA.....	
M23CA.....	
M31G.....T.....C..T.	
humanC.....CA.....CA.C..C..CG.A.....	
		150bp
M1	GCTCCTTACTAGGAATTTGTCTAATCCTACAAATCATCACAGGCCTATTC	
M19, M21TC.....	
M23T.....	
M31TC...T.....C.....T	
human	...A..C..T..CG...C..G...C.....C.....A.....	
		200bp
M1	CTAGCAATACACTATACATCCGATACAATAACAGCATTTTCCTCTGTTAC	
M19, M21C.....C..	
M23C..	
M31G.....	
humanC..G...CT..C.A..CG.CTC...C..C.....A..AA.CG.	
	<u>*2</u> <u>*3</u> <u>*4</u> <u>*2</u>	250bp
M1	CCATATCTGCCGAGATGTCAATTATGGCTGACTCATTCGATATATACACG	
M19, M21T.....T.....	
M23T.....T.....	
M31C.....C.....G..A...C.....	
human	...C...ACT.....A.....A.....C..CT.....	
		278bp
M1	CCAACGGGGCATCAATATTTTTCATCAG	
M19, M21G.....C.....	
M23G.....C.....	
M31A.G..T.....	
human	...T..C..C.....C..T...T.	

	Restriction enzyme	Recognition sequence
* 1	<i>Mse</i> I	T ↓ TAA
* 2	<i>Taq</i> I	T ↓ CGA
* 3	<i>Hinc</i> II	GT (T,C) ↓ (A,G)AC
* 4	<i>Hinf</i> I	G ↓ ANTC

同、來自臺東養殖場 DNA編號 M18也是梅花鹿。因此利用 PCR-RFLP 獲得的 D3單倍基因型態只包括梅花鹿一種鹿科動物，也就是每個種類都有其特有的限制內切 Ⅲ 片段長度型態，可用來做種間之區分 (表2、表3)。不過梅花鹿及山羌各有兩種單倍基因型，顯示有種內變異存在，但種內變異小於種間變異 (表4)，而且來自同一地點的同種樣本，都屬於同一種單倍基因型。

討論

一、粗DNA之抽取

一般而言，進行蛋白質電泳時，必須採用新鮮的組織；但利用 PCR技術增幅特定DNA片段時，包括浸泡於 70%-90%酒精、保存於 -20°C以下冰櫃、甚至風乾的肉類，都可作為鑑定的樣本 (Dessauer *et al.* 1996)。而一般需要鑑定的樣本，大多屬於取締非法獵捕、交易所沒收的野生動物屍骸等不太新鮮的樣本，因此考慮野生動物保育法實際的執行面，利用少量 DNA作鑑定的方法似乎較為可行。然而，自哺乳動物的肌肉組織抽取粗DNA，仍必須考慮所取樣本的新鮮度。在本研究進行的過程中，有一半的樣本所抽取之粗DNA及PCR產物的品質及產量都非常不理想。經詢問提供樣本的單位，發現大多數有問題的樣本多曾在保存期間因冷凍櫃長時間停電或故障造成解凍的情形，可能因此造成DNA的分解。所以特別建議在採集待鑑定的肉類樣本時，最好將整個肉塊 (一立方公分大小即可) 浸置在含 70%酒精的密封瓶中，並加以冷藏或冷凍保存。也可以在酒精中添加有助保持DNA完整的藥品，例如 DMSO，或者加入抑制DNA分解的物質，例如 EDTA 妥予保存 (Dessauer *et al.* 1996)。

二、鑑定臺灣產鹿科動物的有效標幟及流程

本研究所採用的 PCR-RFLP方法及粒線體DNA標幟，能有效的區分屬於保育類的鹿肉及市場上常見的牛、豬肉。雖然研究結果顯示有13種限制內切 Ⅲ 作用產生長度多型態性，但在實際應用時，僅需用 *Sau3A I*、*Mse I*、*Taq I* 及 *Dde I* 對樣本作單 Ⅲ 切處理就可有效區分水鹿、梅花鹿、山羌、紅鹿、牛及豬 (表3)。此外這種方法在操作上非常方便迅速，僅需一些分子生物學必備儀器，不需要使用具危險性的放射性同位素，而且整個流程僅需四天。即第一、二天抽取粗DNA，並進行聚合 Ⅲ 連鎖反應增幅出細胞色素 b 整個基因片段；第三天再做一次聚合 Ⅲ 連鎖反應，以獲得較多的DNA量，並進行純化；第四天再做限制內切 Ⅲ 作用，並電泳照相，最後和已知單倍基因型比對，即可判斷待鑑定的樣品是否屬於保育類的鹿肉。其正確性可由原本以為是長鬃山羊的DNA編號 M40的肉類樣本，經檢驗後判斷為山羌肉；以及DNA編號 M19經DNA定序比對之後確定為梅花鹿獲得證實。因此，以限制內切 Ⅲ 片段長度多型態性分析粒線體DNA細胞色素 b 基因序列變異方法，是檢驗該樣本是否為保育類鹿科動物的一種快速、有效的方法。

粒線體DNA為母系遺傳，若有雜交的現象，則子代的粒線體DNA與母鹿品系相同。根據養鹿場表示，由於梅花鹿體型較小，所以雄性梅花鹿可能與雌性水鹿雜交，而所產生的子代外形像梅花鹿。這種雜交的梅花鹿，其粒線體DNA與水鹿相同。因此本方法除了可以確定種類之外，也可以用在檢驗養鹿場鹿隻是否有雜交情況。

三、方法限制性

PCR-RFLP方法在應用上有其限制，必須考慮其精確性。因為此方法主要根據片段長度多型態性判斷種類，但片段大小相同並不表示DNA序列相同，而片段位置不同可能是

限制內切酶作用不完全的結果。此外，同種不同族群或個體間也可能會出現片段長度變異，因此必須到全島各地收集大量的標本，才能完成種或族群之比對基準圖形，這在作業上有所困難。因此建議 PCR-RFLP方法可作為初步鑑定之用，對於無法明確判斷種類的樣本，可進一步利用 DNA定序方法加以確認。

運用分子生物學技術進行物種鑑識，必須配合相關物種形態資料庫的建立，方能提供有效的物種鑑識比對基準。在本研究進行的過程中，曾經出現樣本提供者誤判肉類樣本的種類而提供錯誤資訊的情形，造成比對上的困擾。因此，除了找出可供動物辨識上有效的遺傳物質標幟外，最好也能配合原始標本的保存，將相同樣本來源的外部形態、比較解剖的資料一起建立，作為比對上的參考。

結論

本研究結果顯示，如選用適當的限制內切酶(如 *Sau3A I*、*Mse I*、*Taq I*、及 *Dde I*) 作用於 PCR增幅出來的細胞色素b基因片段上，所得的片段長度多型態性將是一種有效的標幟，可區分臺灣產鹿科動物與紅鹿、牛、豬等可能在肉質外觀上造成混淆的物種。

誌謝

感謝臺北市立動物園、國立自然科學博物館、行政院農業委員會特有生物研究保育中心、墾丁國家公園及臺灣省畜產協會協助收集樣品，葉文珊及傅子煜等人對於實驗的協助。本研究承蒙農委會之經費補助，特致謝忱。

引用文獻

- 王穎、林文昌。1987。臺灣地區山產店對野生動物資源利用的調查 (II)。行政院農業委員會編印。
- Anderson, S., A. T. Bankier, B. G. Barrell, M. H. L. de Bruijn, A. R. Coulson, J. Drouin, I. C. Eperon, D. P. Nierlich, B. A. Roe, F. Sanger, P. H. Schreier, A. J. H. Smith, R. Staden, and I. C. Young. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290: 457-465.
- Avise, J. C., J. Arnold, R. M. Ball, E. Bermingham Jr., T. Lamb, J. E. Neigel, C. A. Reeb, and N. C. Saunders. 1987. Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 489-522.
- Baker, C. S., F. Cipriano, and S. R. Palumbi. 1996. Molecular genetic identification for whale and dolphin products from commercial markets in Korea and Japan. *Molecular Ecology* 5: 671-685.
- Baker, C. S., and S. R. Palumbi. 1994. Which whales are hunted? A molecular genetic approach to monitoring whaling. *Science* 265: 1538-1539.
- Baker, C. S., and S. R. Palumbi. 1995. Population structure, molecular systematic and forensic identification of whales and dolphins. pp. 10-49. *In*: Avise, J. C., and J. L. Hamrick (eds.). *Conservation Genetics: Case Histories from Nature*. Chapman & Hall, New York.
- Brown, W. M., M. J. George, and A. C. Wilson. 1979. Rapid evolution of animal

- mitochondrial DNA. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America 76: 1967-1971.
- David, I. B., and A. W. Blackler. 1972. Maternal and cytoplasmic inheritance of mitochondrial DNA in *Xenopus*. Developmental Biology 29: 152-161.
- Dessauer, H. C., C. J. Cole, and M. S. Hafner. 1996. Collection and storage of tissues. pp. 29-50. *In*: Hills, D. M., C. Moritz, and B. K. Mable (eds.). Molecular Systematics (second edition). Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Dewalt, T. S., P. D. Sudman., M. S. Hafner, and S. K. Davist. 1993. Phylogenetic relationships of pocket gophers (*Cratogeomys* and *Pappogeomys*) based on mitochondrial DNA cytochrome b sequences. Molecular Phylogenetics and Evolution 2(3): 193-204.
- Dowling, T. E., C. Moritz, and J. D. Palmer. 1990. Nucleic acids II : Restriction site analysis. pp. 250-317. *In*: Hills, D. M., and C. Moritz (eds.). Molecular Systematics (first edition). Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Laguerre, G., L. Rigottier-Gois, and P. Lemanceau. 1994. Fluorescent *Pseudomonas* species categorized by using polymerase chain reaction (PCR)/ restriction fragment analysis of 16S rDNA. Molecular Ecology 3: 479-487.
- Kocher, T. D., W. K. Thomas, A. Meyer, S. V. Edwards, S. Pabbo, F. X. Villablanca, and A. C. Wilson. 1989. Dynamic of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America 86: 6196-6200.
- Moritz, C., T. E. Dowling, and W. M. Brown. 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA: Relevance for population biology and systematics. Annual Review of Ecology and Systematics 18: 269-292.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America 74: 5463-5467.

Using Mitochondrial DNA to Identify Meat Products of the Cervids in Taiwan

Yi-Ju Yang¹, Yao-Sung Lin² and Yi-Li Liu²

¹Department of Life Sciences, Tzu-Chi University, Hualien, Taiwan

²Department of Zoology, National Taiwan University, Taipei, Taiwan

Abstract

We used the restriction fragment length polymorphism analysis (RFLP) of mitochondrial DNA cytochrome b gene amplified by polymerase chain reaction (PCR) to identify meat products of cervids in Taiwan. Thirteen restriction enzymes were used to assay the RFLP variation of 14 samples belonging to Formosan sambar deer, Formosan sika deer, Formosan muntjac, red deer, domestic pig and domestic cattle. We detected eight mtDNA haplotypes which are species-specific and useful for their forensic identification. Accordingly, we propose a simple procedure *via* mtDNA and PCR-RFLP method to identify the species of the meat products of the cervids in Taiwan, and discuss its application, advantages and shortcomings.

Key words : polymerase chain reaction, mitochondrial cytochrome b gene, restriction fragment length polymorphism, wildlife forensics, Cervidae

Received: February 29, 2000

Accepted: December 4, 2000