

清潔劑應用在動物 DNA 遺傳物質的保存

Laundry Detergents as Animal Tissue Preservatives for DNA Analyses

張廖年鴻*

Nian-Hong Jang-Liaw*

國立自然科學博物館動物學組 台中市館前路 1 號

Department of Zoology, National Museum of Natural Science, Taichung, Taiwan

* 通訊作者：taco.tw@gmail.com

* Corresponding author: taco.tw@gmail.com

摘要

本文測試保存在常溫下酒精中 2 個月到 9 年間的動物組織樣本的 DNA 衰退程度，以及幾種清潔劑在長時間、高溫環境下保存 DNA 組織樣本的效果，並討論酒精在現今動物 DNA 組織樣本保存上的優缺點，及其應用在 DNA 序列判讀等分子生物學研究技術上的限制。測試結果顯示，保存在 95% 酒精中的組織樣本其 DNA 結構在 7 年後會有明顯的衰退現象，以 70% 酒精保存 DNA 的效果亦相當差。而多種清潔劑在一定的時間內對於 DNA 物質的保存效果與 99.5% 的無水酒精相近，但並非所有的家用清潔劑都適用於 DNA 樣本保存。

Abstract

Several brands of laundry detergents were tested as the preservatives for animal tissues in DNA analyses. Their DNA degradations were compared to those from the tissues preserved in ethanol and DNA preservation buffer, and from cryopreservation (immersion in liquid nitrogen). The results showed that the tissues preserved in 99.5% ethanol and DNA preservation buffer were as good as those from cryopreservation, but those in 70% ethanol degraded faster. Some (not all) of the detergents brands tested

were found to be as good as those preserved in concentrated ethanol and DNA preservation buffer. Preservation in a detergent-based solution is an easy and economic way for tissue preservation in DNA analyses.

關鍵詞：清潔劑、動物組織樣本、DNA 保存、DNA 衰退

Key words: detergents, animal tissue specimen, DNA preservation, DNA degradation

收件日期：98 年 5 月 11 日

接受日期：98 年 9 月 14 日

Received: May 11, 2009

Accepted: September 14, 2009

緒 言

近年來，由於各項分子生物學操作技術的進步，技術門檻大幅降低，DNA 序列分析已經成為分類學、演化生物學、族群遺傳學及生物地理學等各領域研究應用的利器之一。對於數量稀少的珍稀或瀕危物種，分子生物技術可以僅就少量的血液或組織樣本，如一小片魚鱗或是蜥蜴自割的尾巴，在不嚴重危害研究對象的情形下取得大量的遺傳資訊，對其族群的傷害可減至最低。也隨著實驗步驟的精簡及單項操作所需費用日益降低，一般應用 DNA 定序技術的生物學研究已經很難滿足於少量樣本數的分析結果。然而，大量的分析樣本往往需要長時間的蒐集，衍生出來的樣本保存問題則隨著數量及保存時間的增加而逐漸浮現。

在一般博物館的動物標本蒐藏中，除了獸類及鳥類常用皮毛剝製法製作標本外，體型較小的兩爬動物、魚類及昆蟲以外的無脊椎動物大多以浸液標本的形式保存。常見的浸液標本主要可分為福馬林(formalin)固定及酒精直接浸漬兩種製作方法。福馬林為 40% 的甲醛(formaldehyde)稀釋溶液(Fox *et al.* 1985)。甲醛於 1859 年首次被配製後，福馬林很快地就

被應用在生物標本保存技術上面(Fox *et al.* 1985; Schander and Halanych 2003)。福馬林能防止樣本腐壞，並藉由形成蛋白質結構間的鏈結結構(cross-linkages)固定生物標本的形狀，使其形態免於收縮(shrinkage)或扭曲(distortion)等變形(Fox *et al.* 1985)。然而，福馬林可能有破壞所保存樣本的 DNA 的副作用(Shibata 1994)。一般博物館所保存的動物浸液標本大多先以福馬林固定形態，再轉移至酒精溶液中保存，這樣的處理方式相當不利於 DNA 分析、定序等分子生物學研究(France and Kocher 1996)，很難從福馬林固定過的樣本中萃取出足量、質優的 DNA 來進行聚合酶連鎖反應(PCR, polymerase chains reaction)放大等實驗室操作。福馬林溶液如何影響樣本的 DNA 結構目前並不清楚(Chaw *et al.* 1980; Chang and Loew 1994; Schander and Halanych 2003)。有多篇研究報告敘述如何萃取福馬林固定過的動物標本的 DNA (France and Kocher 1996; Chatigny 2000; 徐等 2002; Wandeler *et al.* 2007)，多數結果未臻理想，一般只能增幅出小於 400-500 bp 的小片段序列(Shibata 1994; Wandeler *et al.* 2007)。由於這項技術並非本文的主題，在此不多做討論。

超低溫冷凍法(cryopreservation)是已知最

佳的組織樣本保存技術(Zhang and Hewett 1998)。新鮮的組織樣本先以液態氮或乾冰處理，再以-70°C以下的低溫保存，如此處理的樣本可以應用於大部分的分子生物學研究中。然而，除了在野外工作時很難將樣本如此處理外，超低溫設備的維護也是相當昂貴，若要全面應用於所有組織樣本的保存則需要有相當龐大的預算長期支持才行。Dessaure *et al.* (1990) 提出多種可在野外工作時短時間保存動物血液或組織樣本的溶液，如酒精、抗凝血劑保存液(anticoagulant preservative solution) (Arctander 1988)、含十二烷基硫酸鈉(SDS, sodium dodecyl sulfate)的溶液，或是過飽和的食鹽溶液，每種溶液都有一定的效果。

以高濃度的酒精保存欲進行 DNA 萃取的血液或組織樣本，是目前許多實驗室普遍採用的方法。酒精有容易取得、容易稀釋及無毒性等優點，雖為易燃物質，在野外或實驗室操作時只要注意火源或避免高熱環境即可。酒精樣本應保存於 4-8°C 的環境中；保存於 4°C 環境的酒精組織樣本會比保存於室溫或 -20°C 以下的樣本更易萃取出質優的 DNA (Tegelström 1989; Zhang and Hewett 1998)。在筆者個人的經驗中，經過酒精短時間浸泡的樣本，其所萃取出來的 crude DNA 在 PCR 技術應用上有時甚至較冷凍或未經處理的新鮮樣本為佳。但是，酒精長時間保存的組織樣本依舊會有無法萃取出足夠的 DNA 以進行 PCR 增幅程序的問題存在，且保存時間越長久的樣本其萃取出來的 DNA 質量越差。Reiss *et al.* (1995) 發現甲蟲 *Amara glacialis* (Mannerhrim) 保存在 70% 的酒精中約 6 週後其 DNA 質量就會明顯衰退(degradation)。類似的衰退現象也出現在酒精保存的蜘蛛(Hormiga *et al.* 2003; Vink and Paterson 2003) 等其他無脊椎動物樣本中；Vink *et al.* (2005) 甚至認為室溫下保存於 95% 酒精中的蜘蛛樣本 5 天後其 DNA 就開始衰退。關於酒精保存技術對於脊椎動物 DNA 影響方面的研究則比較少。

筆者由實驗室操作經驗中發現，長時間保存於酒精的組織樣本普遍存在 DNA 衰退的現象，而常溫下浸漬於酒精溶液達 10 年以上的標本所萃取的 DNA 往往濃度很低，難以進行 PCR 增幅。如 1998 年國立自然科學博物館(簡稱科博館)同仁赴越南採集的一批兩棲類酒精浸漬標本，在室溫下直接浸漬、保存於濃度 75% 的酒精中，形態保存相當完好；但是在 2008 年時因研究需求取出該批標本部分大頭蛙(*Limnonectes* sp.) 樣本的腿部肌肉進行 DNA 萃取，卻完全無法取得可供 PCR 增幅的 crude DNA。

由於以酒精保存樣本 DNA 的缺點逐漸呈現，多種非酒精的 DNA 組織樣本保存方法被發展出來，取代原本的酒精保存方式(Arctander 1988; Dessaure *et al.* 1990; Kuch *et al.* 1999)。TODD's DNA buffer (附錄)即為一簡易、穩定的 DNA 保存溶液。其配方以 SDS 為主，而 SDS 本身即是洗滌用的清潔劑的主要成分。有趣的是，一般家庭用洗衣清潔劑就可以用來保存 DNA 組織樣本(Kuch *et al.* 1999)，有著和 TODD's DNA buffer 類似的效果。為了加強去污能力，一般市售的家用洗衣粉都會添加能夠分解有機物質的去污劑、酵素(如 proteases 及 lipases)以及類似 EDTA 的螯化物(Kuch *et al.* 1999)，其成分恰如一般商業 DNA 萃取試劑組用來分離 DNA 的萃取溶液(extraction buffer) (Bahl and Pfenning 1996; Kuch *et al.* 1999)。Kuch *et al.* (1999) 測試了洗滌用清潔劑用在保存兩爬動物的血液及肌肉組織樣本，以及取代慣用的 DNA 萃取試劑組中 digest buffer 的可行性，兩者都有不錯的效果。

本研究分兩個部分進行：第一部分為利用科博館動物學組兩爬實驗室所保存的多組拉都希氏赤蛙(*Sylvirana latouchii*)酒精組織樣本，測試不同浸泡時間的樣本其 DNA 質量是否有差異，以證實長時間保存於酒精中的組織樣本會造成 DNA 衰退；另外，為確定 Kuch *et al.* (1999) 的結論能否套用在國產的清潔劑上，並應用於

國內學者的野外工作及動物組織樣本保存策略，本研究第二部分將依循 Kuch *et al.* (1999) 的測試方法並稍做修改，測試 TODD's DNA buffer 及台灣市面上可見的幾種洗衣粉及清潔劑應用在保存組織樣本的可行性，並以相近的測試條件測試兩種酒精濃度所保存的組織樣本對照之。

材料與方法

一、酒精組織樣本 DNA 衰退與保存時間的關連性測試

選取在 6 個時間點常溫下浸漬於濃度 95% 以上的酒精中的 12 組拉都希氏赤蛙樣本(詳見表 1)同時進行萃取，萃取操作時間為 2009/4/21，每組以 5 mg (± 0.8 mg) 的新鮮組織樣本定量操作。所有樣本利用商業試劑組 Tissue and Cell Genomic DNA Purification Kit (Hopegen Biotechnology Development Enterprises) 進行 DNA 萃取，操作步驟依據試劑組使用手冊，並修改 56°C 水浴時間，由手冊建議的 4 hr 延長至 16 hr。保存於酒精中的組織樣本在此步

驟操作前先去掉酒精，再以真空乾燥機 (CVE-200D, EYEL4) 常溫下真空處理 10 min，確保樣本內的酒精完全去除。萃取出來的 crude DNA 產物溶於 50 μ l 的二次去離子水中，進行電泳時各組取出 5 μ l 的 crude DNA 溶液，加上 1 μ l 的 6X 染色染劑混合均勻後在 1.2% 電泳凝膠中以 100V 電壓進行電泳 30 min，以估算各組樣本的相對濃度。DNA Integrated Density Value (IDV) 值為估算電泳圖上約 20 kb 分子量大小的 DNA 濃度所得的結果，顯示各組樣本占有樣本總濃度的比例，並以最後兩組樣本(保存 2 個月)的 IDV 平均值為分母，計算各時間點的樣本平均值相對於保存 2 個月的樣本之 DNA 濃度比值。凝膠製作時添加 HealthView Nucleic Acid Stain (Genomics) 進行內染。進行電泳時同時以 1 kb DNA ladder 標定 DNA 分子量大小。電泳測試結果在波長 312 nm 的紫外光下判讀，並且利用數位照相系統(Alpha Innotech Corp.)照相保存，以 AlphaImager IS-2200 (NatureGene Corp.) 影像處理軟體估算 DNA 相對濃度。

表 1. 測試在不同保存時間下 DNA 衰退情形所使用的組織樣本資訊，包括國立自然科學博物館(NMNS) 標本號、標本採集時間以及樣本保存時間(所有樣本皆為拉都希氏赤蛙 *Sylvirana latouchii* 的腿部肌肉)

Table 1. Data on the *Sylvirana latouchii* specimens used in the DNA degradation experiment

	NMNS ¹ catalogue numbers	Collection dates	Preservation period (month)	DNA Integrated Density Value ² (%)	Crude DNA ³ (%)
1	#16445			1.50	
2	#16446	2000.05.01	107	1.50	10.49
3	#16529			3.70	
4	#16530	2002.02.12	86	5.60	32.52
5	#12995			16.50	
6	#12996	2004.03.27	59	9.10	89.51
7	#16155			9.50	
8	#16156	2006.07.18	34	7.80	60.49
9	#17122			6.30	
10	#17123	2008.04.01	12	10	56.99
11	#17754			14.30	
12	#17755	2009.02.14	2	14.30	-

¹ National Museum of Natural Science, Taiwan.

² Estimated DNA concentrations in molecular weight of about 20 kb.

³ Proportion of DNA concentration equivalent to that at 2-month preservation.

二、清潔劑保存 DNA 物質的適用性測試

本研究測試了 5 種市售的洗衣粉、洗衣精以及洗碗精，其品牌及製造商如表 2，均以一次去離子水稀釋，濃度為 10%。除了清潔劑外，同時還測試了液態氮、TODD's DNA buffer 以及 70%、99.5% 的酒精溶液等保存媒介。每個測試做 3 重複，每個重複均包含 5 mg (± 0.8 mg) 的新鮮組織樣本，樣本分裝在已編號的微量離心管中。編號由 1-1 編至 9-3，前面的數字為實驗組編號，後面的數字為該實驗組 3 個重複樣本中的序號。肌肉組織的分裝過程盡量在冰上操作，避免因處理時間過長而腐敗，造成樣本 DNA 衰退導致實驗誤差。由於已知保存於清潔劑溶液及 TODD's DNA buffer 的組織樣本在常溫下會自解、均質化(homogenization)於保存液中，因此這兩類保存液均定量於 100 μ l，待高溫處理結束後直接將微量離心管全部內容物進行 DNA 萃取程序。酒精保存的樣本則保存於 1 ml 的酒精中，且在測試開始第 2 天

更換 1 次酒精溶液，避免保存液濃度被組織樣本本身的水分稀釋。液態氮保存的樣本直接以 2.0 ml 冷凍小瓶(NALGENE®)保存於國立自然科學博物館鳥獸工作室的液態氮保存設備中。選用的組織樣本為同一隻拉都希氏赤蛙的腿部肌肉組織。所有實驗組的組織樣本均避免沾染血液，以免影響測試結果。切下腿部組織後，青蛙標本以福馬林固定 2 週，然後轉移至 75% 的酒精中保存於該館浸液標本蒐藏庫，標本編號為 NMNS#17833。測試的環境條件參考 Kuch *et al.* (1999)，測試溫度由 37°C 提高到 50°C，測試時間由 14 天延長為 28 天。除了以液態氮保存的樣本外，其他的樣本以封口蠟膜(Parafilm® M)封住離心管開口細縫後，全數置於電子式恆溫烘箱(Celsius 2000 Memmert)以維持測試溫度，烘箱 28 天內不間斷連續運作。高溫保存後，樣本進行 DNA 萃取，操作程序如前述。第 1、2、3 組樣本在水浴前以剪刀將肌肉組織剪碎，以加速樣本均質化程序的進行。

表 2. 各實驗組的相關資訊及測試條件。¹ 表示各實驗組的 DNA 濃度平均值相對於第 1 組樣本(液態氮保存) DNA 濃度的比值

Table 2. Data on preservatives used in the experiment

	Preservatives and brands	Producers	Appearance	Preservation periods and conditions	Crude DNA ¹ (%)
1	Liquid nitrogen	翔源行	Transparent liquid	28 days in ultra cold	-
2	99.5% ethanol	島久藥品株式會社	Transparent liquid	28 days in 50°C	81.87
3	70% ethanol (diluted with R. O.)	島久藥品株式會社	Transparent liquid	28 days in 50°C	51.66
4	白蘭濃縮洗衣粉	聯合利華股份有限公司	White grains/ powder mixed with few blue, red grains	28 days in 50°C	77.97
5	加倍潔 SOPP 濃縮洗衣粉	金美克能化學工業股份有限公司	White grains/ powder mixed with few blue, red grains	28 days in 50°C	72.12
6	中性洗潔精 (Neutral cleaner)	Reidel-de Haën®	Sticky transparent liquid	28 days in 50°C	108.19
7	沙拉脫	日星化工股份有限公司	Sticky, light yellow, transparent liquid	28 days in 50°C	83.82
8	泡舒 POAS 抗菌洗潔精	耐斯企業股份有限公司	Sticky, orange-colored, transparent liquid	28 days in 50°C	25.34
9	TODD's DNA buffer	-	Sticky transparent liquid	28 days in 50°C	128.07

¹ Proportion of DNA concentration equivalent to that preserved in liquid nitrogen.

結果與討論

一、長時間酒精保存的組織樣本 DNA 衰退情形

由電泳結果(圖 1, 表 1)可發現保存在高濃度酒精中 5 年內對樣本的 DNA 影響不大, 相對於保存僅 2 個月的樣本, 保存 5 年內的樣本萃取出來的 DNA 相對濃度約為 56.99-89.51%; 保存 7 年後的樣本 crude DNA 產量明顯減少,

僅 32.52%, 且有隨著浸漬時間延長而遞減的趨勢。已保存 9 年的組織樣本可萃取出來的 DNA 質量均差, 僅 10.49%。保存 5 年內的樣本 DNA 濃度並未與時間長短有正相關, 可能因各組不同時間點樣本處理時操作上有誤差所致, 如所剪取的肌肉組織若較大, 樣本瓶中的酒精體積則相對較小, 樣本釋出的體液可能造成酒精濃度大幅降低。

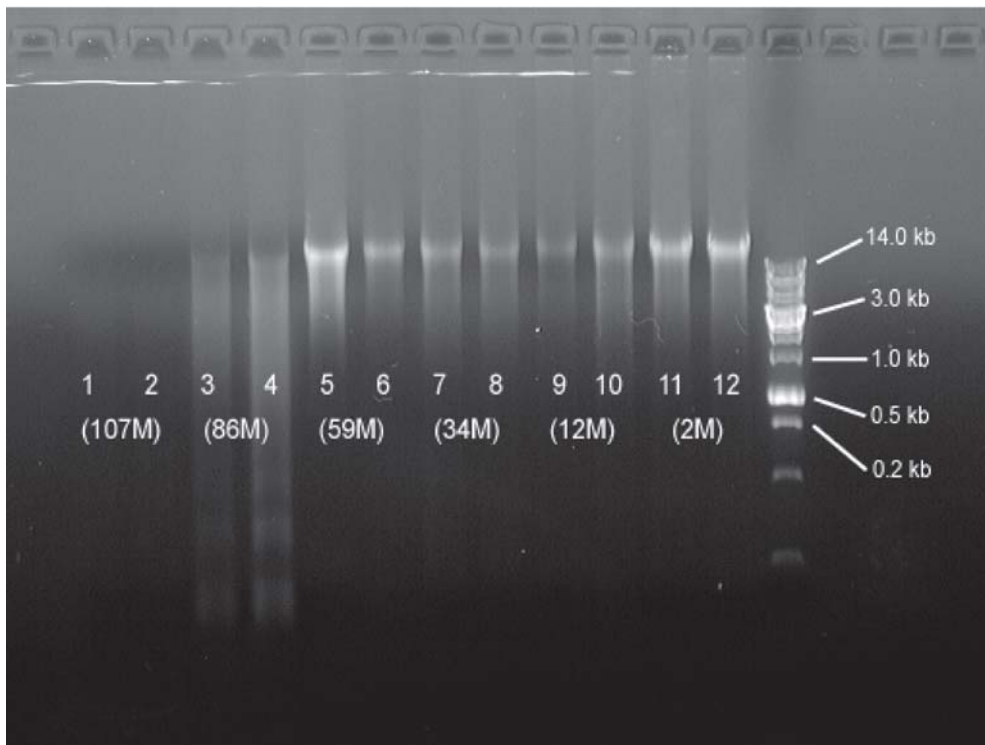


圖 1. 保存於 95% 酒精中的 12 組組織樣本 crude DNA 萃取結果電泳圖。電泳凝膠濃度為 1.2%，每組樣本取 5 μ l 測試。樣本保存的時間依次為 107 個月、86 個月、59 個月、34 個月、12 個月以及 2 個月，每段時間取 2 組樣本。樣本資訊請參考表 1。

Fig. 1. A 1.2% agarose gel showing crude DNA concentrations in 5 μ l DNA products from the tissues preserved in 95% ethanol for various periods (M, number of months; data of the specimens 1 to 12 shown in Table 1).

二、利用清潔劑保存的組織樣本 DNA 的效果及限制
10% 的兩種廠牌洗衣粉為過飽和狀態，溶

液呈白濁狀；另 3 種廠牌的清潔劑稀釋後皆為透明液體。除了液態氮及酒精測試組外，其他測試組溶液中的 5 mg 組織樣本在測試溫度下

0.5 hr 內開始有均質化的現象，洗衣粉測試組樣本則有白色沈澱物產生。兩天後第 7、8、9 三組清潔劑溶液中樣本的肌肉組織已經完全均質化。樣本烘烤 28 天後，保存於 99.5% 酒精中的樣本(第 2 組)變為橙紅色，而保存於 70% 酒精中的樣本(第 3 組)則呈白色；洗衣粉與清潔劑各實驗組中除中性清潔劑組(第 6 組)外，其餘各組肌肉組織均已均質化於溶液中，中性清潔劑組的肌肉組織則均質化不完全，留有些許半透明狀的組織懸浮其中。兩個洗衣粉溶液實驗組中皆有白色沈澱，應為溶質過飽和所產生。3 件樣本(3-2、4-3、6-1)在烘烤過程中有部分的肌肉組織沾黏於離心管管壁上未浸漬於測試溶液中，呈乾燥塊狀，未受溶液浸泡。為避免干擾到測試結果，此 3 組樣本在 DNA 萃取程序進行前即行捨棄。

各實驗組 crude DNA 的產量可由圖 2 推估。除了第 3 組、第 8 組之外，其他實驗組所萃取得到的 crude DNA 質量都相當不錯。由圖 2 得知，TODD's DNA buffer 組(第 9 組)的產量還多於液態氮保存的樣本(第 1 組)，且較少短片段 DNA 產生。若以第 1 組約 20 kb 大小位置的 DNA 平均產量做為比較基準，以 AlphaImager IS-2200 影像處理軟體估算各樣本同大小 DNA 片段的平均產量，則還是以 TODD's DNA buffer 組的 DNA 產量最高，達 128.07%；其次為第 6 組(中性洗潔精)，達 108.19%。保存於 99.5% 酒精中的樣本為 81.87%。其他實驗組產量表現多在 50% 以上，第 3 組(70% 酒精)及第 8 組保存效果較差，分別為 51.66% 及 25.34% (表 2)。由此可知，TODD's DNA buffer 在 50°C 的高溫環境下 1 個月內保存 DNA 的效果其實不遜於液態氮。而多種市面上流通的洗衣粉、洗潔精也可以應用在 DNA 物質的保存，效果直逼昂貴的高濃度酒精。Kuch *et al.* (1999) 所測試的 Persil Megaperls®、Persil Supra® 及 Liquid Frosch® 都是當地相當普遍的家用清潔劑品牌，也成功地證明其在 DNA 保存上的適用性。然

而，並非所有的清潔劑都有優異的 DNA 保存效果，本實驗第 8 組(抗菌洗潔精)似乎比 70% 酒精的保存效果還差。這提醒我們並非所有的清潔劑都一體適用於 DNA 保存的目的。在利用不熟悉的清潔劑保存 DNA 組織樣本前，最好先進行類似測試，以免誤用不適合的保存溶液而損害珍貴的組織樣本。其他兩種清潔劑，中性清潔劑及沙拉脫，保存效果比第 8 組的抗菌洗潔精好，顯示沒有添加特殊成分清潔劑比較適用於 DNA 樣本的保存。

三、標本處理及組織樣本保存的建議

與經過福馬林固定處理的標本相比，酒精直接浸泡的動物標本組織可進行 DNA 萃取，進而進行 PCR 增幅、定序等程序，在應用上比福馬林固定過的標本更為廣泛，適合應用於小型無脊椎動物、魚類或兩棲動物的標本保存。一般浸液標本約保存在 70-80% 左右的酒精中(國立科學博物館編 2003; Vink *et al.* 2005)，而要使用於 DNA 萃取、分析的樣本，應以更高濃度的酒精浸漬，以無水實驗級酒精為佳(Zhang and Hewett 1998)。但是酒精直接浸泡固定的標本容易因脫水而皺縮變形，且酒精濃度越高變形的情形越嚴重，對於外部形態保存的效果不如福馬林。此外，酒精對動物標本的滲透效果也較福馬林為差，對於體型稍大的動物標本的防腐效果並不理想，特別是內臟的部分，往往在酒精滲透進腹腔之前就已開始腐敗，因而呈現標本肌肉僵硬、腹部柔軟的狀況。直接浸泡在酒精的動物標本體液會逐漸被酒精吸出，稀釋原本的酒精濃度，因此酒精浸漬標本的製作初期要適時更換酒精溶液以維持其濃度。除了有特殊用途(如日後預計取出耳石分析的魚類標本)及披覆外骨骼的無脊椎動物外，對於較大型，或是需要測量其外部形質，或是較為珍貴稀少的動物浸漬標本，在環境許可的狀況下應以福馬林固定為優先考量，且在進行固定之前先取下一小部分組織樣本

(如肌肉、肝臟或鱗)另行編號，以低溫冷凍或是浸漬於非福馬林的保存溶液中，如此則可兼

顧形態保存及分子生物學方面的應用，將標本發揮最大效益。

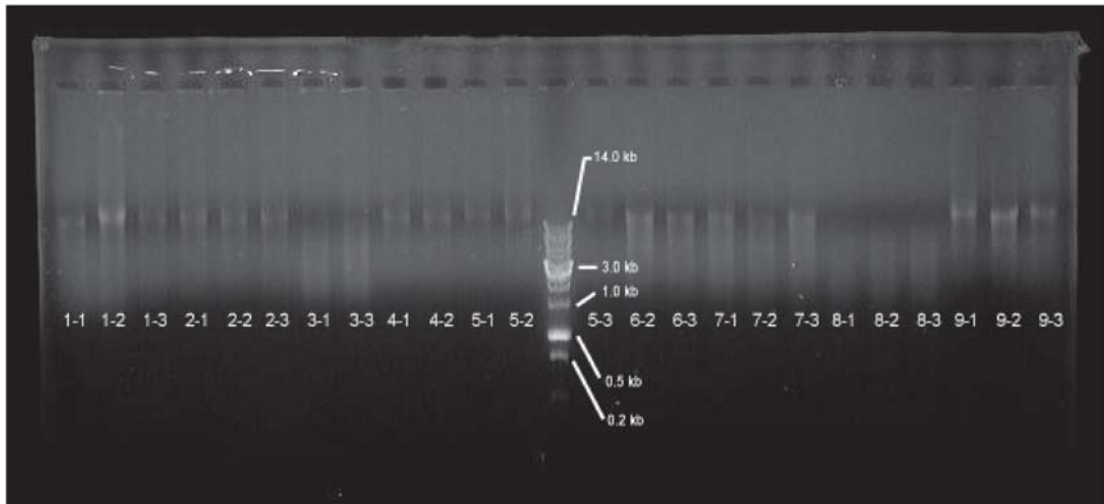


圖 2. 在 9 種介質中保存 28 天後的樣本 crude DNA 萃取結果電泳圖。電泳凝膠濃度為 1.2%，每組樣本取 5 μ l 測試。保存的介質依序為液態氮(1-1-1-3)、99.5%酒精(2-1-2-3)、70%酒精(3-1 與 3-3)、2 種廠牌的洗衣粉(4-1-5-3)、3 種洗潔精(6-2-8-3)，以及 TODD's DNA buffer (9-1-9-3)。除液態氮組外，其餘各組均保存於 50°C 環境下。各實驗組詳細資料請參考表 2。

Fig. 2. Electrophoreses of crude DNAs in 5 μ l DNA products from the tissues preserved with 9 different preservatives for 28 days (1-1-1-3, liquid nitrogen; 2-1-2-3, 99.5% ethanol; 3-1 and 3-3, 70% ethanol; 4-1-8-3, detergents; 9-1-9-3, TODD's DNA buffer; detailed data shown in Table 2).

現今國內各研究單位除了超低溫冷凍設備外，最普遍的組織樣本保存應該還是以酒精浸泡為主。高濃度酒精以往被認為是保存樣本 DNA 物質的首選之一。然而，許多案例(Reiss *et al.* 1995; Hormiga *et al.* 2003; Vink *et al.* 2005)，包括本研究的結果顯示酒精並不是絕無後顧之憂的 DNA 保存媒介。對一般沒有足夠超低溫設備的實驗室而言，面對日漸累積的動物組織樣本，尋得適當的保存方式實為當務之急。TODD's DNA buffer 及家用清潔劑似乎是可行的選項。利用清潔劑保存 DNA 組織樣本有著價格低廉、容易取得、非可燃性、操作簡便(一般乾淨的飲用水就可以稀釋)、使用上無法令管制等優點，除了適用於野外工作外，

也很適合用來大量保存組織樣本(Kuch *et al.* 1999)。已用酒精固定、保存的組織樣本，為避免酒精持續破壞樣本的 DNA 結構，應該儘快去除酒精，然後直接保存於-20°C 低溫以下的冰箱即可，不用再保存於任何保存液中。若冷凍設備有限，則可利用真空乾燥機或是低溫烘烤方式將酒精完全去除，然後加入適量(約 20 倍體積)的 TODD's DNA buffer 或是清潔劑溶液在室溫下保存。新鮮的組織樣本可在室溫下直接保存於 TODD's DNA buffer 中；若在野外長時間採集，特別在無法取得低溫設備、酒精的狀況下，則可購買當地販售的清潔劑充當保存媒介。清潔劑的選用以成分單純、無特殊添加物者為佳。

TODD's DNA buffer 或是清潔劑溶液在使用上有個異於酒精的特性，即在室溫或高溫下會溶解樣本組織。動物肌肉組織在室溫下浸泡於 TODD's DNA buffer，1 天內就可明顯地發現樣本正在分解，剩餘的部分呈半透明狀態。組織溶解後其 DNA 物質會懸浮於保存液中，在室溫中可長期保存。若能在組織完全均質化後移至 -20°C 以下的低溫環境保存，則可得更佳的保存效果。懸浮於保存液中的 DNA 物質可很容易地以商用試劑組完成 crude DNA 的萃取，省略均質化組織的步驟。TODD's DNA buffer 已被德州大學阿靈頓分校動物學系應用於兩棲爬行動物的組織樣本保存，多年來樣本的保存狀況良好(Eric N. Smith，個人通訊)。

值得注意的是，縱使本研究結果認為大部分的稀釋清潔劑可以長時間、妥適地保存動物組織樣本的 DNA 結構，然而並非表示可以適用於所有的物種。保存媒介在實際操作時必須考慮到被保存物質的特性，以便做出適當的操作修正。就以常用的酒精來說，雖然普遍應用於各種動物樣本 DNA 的保存中，但是 Zhang and Hewett (1998)曾描述某些甲蟲若一採集到就立刻投入無水酒精中，其 DNA 將被嚴重破壞至無法進行 PCR 增幅程序。若欲以酒精保存那些甲蟲 DNA 樣本，正確的作法是在浸泡於酒精之前先讓甲蟲活著並且餓上幾天，才能成功的保存其 DNA 物質。另外，較大體積的肌肉組織在稀釋清潔液中均質化的過程會比較緩慢，若組織尚未完全溶解前取出保存液進行萃取 DNA 操作，則可能取得的 crude DNA 濃度會顯著低於預期。而像魚鱗等較為堅固的組織，其硬棘部分不容易在短時間內被清潔劑均質、溶解，保存前最好先用剪刀將其剪碎後再以稀釋清潔劑保存之，當可得到更佳的保存效果。其他如有些動物剛死亡時表皮細胞仍會分泌黏液，有些動物具有毒腺，操作時必須先了解這些物質會不會與保存液相結合，而破壞了 DNA 的結構。在規劃新的研究物種樣本保存

計畫時，除了對保存液的適用性要有所了解評估外，也應該先以少量樣本謹慎地測試其可行性，以免危及辛苦得來的整批珍貴樣本。

謝 誌

本文感謝 Eric N. Smith 博士提供關於動物 DNA 組織樣本保存的經驗及建議，並對三位提供寶貴意見的未具名審查委員致上謝意。

引用文獻

- 徐來祥、張知彬、宋銘晶、曹小平、王福生、張春光。2002。福爾馬林保存的動物標本基因組 DNA 的提取方法。動物學報 48: 264-269。
- 国立科学博物館編。2003。標本学：自然史標本の収集と管理。東海大学出版会。(in Japanese)
- Arctander, P. 1988. Comparative studies of avian DNA by restriction fragment length polymorphism analysis: Convenient procedures based on blood samples from live birds. *Journal of Ornithology* 129: 205-216.
- Bahl, A. and M. Pfenning. 1996. A rapid method of DNA isolation using laundry detergent. *Nucleic Acids Research* 24: 1587-1588.
- Chang, Y. T. and G. H. Loew. 1994. Reaction mechanisms of formaldehyde with endocyclic amino groups of nucleic acid bases. *Journal of the American Chemical Society* 116: 3548-3555.
- Chatigny, M. E. 2000. The extraction of DNA from formalin-fixed, ethanol-preserved reptile and amphibian tissues. *Herpetological Review* 31: 86-87.
- Chaw, Y. F. M., L. E. Crane, P. Lange and R. Shapiro. 1980. Isolation and identification

- of cross-links from formaldehyde-treated nucleic acids. *Biochemistry* 19: 5525-5531.
- Dessaure, H. C., C. J. Cole and M. S. Hafner. 1990. Collection and storage of tissues. pp. 25-41. *In*: D. M. Hillis and C. Moritz (ed.). *Molecular Systematics*. Sinauer, Sunderland.
- Fox, C. H., F. B. Johnson, J. Whiting and P. P. Roller. 1985. Formaldehyde fixation. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 33: 845-853.
- France, S. C. and T. D. Kocher. 1996. DNA sequencing of formalin-fixed crustaceans from archival research collections. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 5: 304-313.
- Hormiga, G., M. A. Arnedo and R. G. Gillespie. 2003. Speciation on a conveyor belt: Sequential colonization of the Hawaiian Islands by Orsonwelles spiders (Araneae, Linyphiidae). *Systematic Biology* 52: 70-88.
- Kuch, U., M. Pfenninger and A. Bahl. 1999. Laundry detergent effectively preserves amphibian and reptile blood and tissue for DNA isolation. *Herpetological Review* 30: 80-82.
- Reiss, R. A., D. P. Schwert and A. C. Ashworth. 1995. Field preservation of Coleoptera for molecular genetic analyses. *Environmental Entomology* 24: 716-719.
- Schander, C. and K. M. Halanych. 2003. DNA, PCR and formalinized animal tissue-A short review and protocols. *Organisms Diversity and Evolution* 3: 195-205.
- Shibata, D. 1994. Extraction of DNA from paraffin-embedded tissue for analysis by polymerase chain reaction: New tricks from an old friend. *Human pathology* 25: 561-563.
- Tegelström, H. 1989. Cold room storage of blood may be better than storage at -70°C. *Fingerprint News* 4: 5-6.
- Vink, C. J. and A. M. Paterson. 2003. Combined molecular and morphological phylogenetic analyses of the New Zealand wolf spider genus *Anoteropsis* (Araneae: Lycosidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 28: 576-587.
- Vink, C. J., S. M. Thomas, P. Paquin, C. Y. Hayashi and M. Hedin. 2005. The effects of preservatives and temperatures on arachnid DNA. *Invertebrate Systematics* 19: 99-104.
- Wandeler, P., P. E. A. Hoeck and L. F. Keller. 2007. Back to the future: Museum specimens in population genetics. *TRENDS in Ecology and Evolution* 22: 634-642.
- Zhang, D. and G. M. Hewett. 1998. Isolation of DNA from preserved specimens. pp. 39-49. *In*: A. Karp, P. G. Isaac and D. S. Ingram (eds). *Molecular Tools for Screening Biodiversity: Plants and Animals*. Chapman & Hall, New York.

附錄、TODD'S DNA buffer 之配製方法

Appendix. TODD'S DNA buffer preparation method

(總體積為 1.5L)

90g Tris (或是 Tris Base，勿使用 Tris Hydrochloride);

+ 3.75g EDTA;

+ 37.5g SDS (Sodium Dodecyl Sulfate);

加純水稀釋至 1.5L，高壓滅菌，分裝至微量離心管或小單位樣本瓶即可。若未及時分裝，在長時間室溫下 SDS 會逐漸析出，分裝前必須先加溫至 SDS 完全溶解。

