

行政院農業委員會林務局林業發展計畫

109 年度細部計畫成果報告

計畫名稱：以直接 PCR 結合多重引子 PCR 技術建立哺乳類動物產製品
種屬鑑定之標準操作流程(三)

Establishment of the standard operation procedure for mammalian species
identification by direct-PCR and multiplex-PCR techniques(3)

補助機關：行政院農業委員會

執行機關：中央警察大學、國立臺灣大學

計畫編號：109 林發-08.2-保-18(2)

執行期間：109 年 1 月 1 日 至 109 年 12 月 31 日 止

計畫主持人：蔡麗琴

計畫執行人：蔡麗琴、李俊億

計畫主辦人：謝幸媚、李俊億

計畫參與人員：陳遠寧、葉光倫、張廖年鴻

中華民國 109 年 12 月

中文摘要

本實驗室歷年來即以發展與犯罪相關生物檢體之 DNA 鑑定方法為研究目標，也受理各相關單位所委託案件之鑑定，因此已陸續建立相關之鑑定系統，本年度計畫中即利用上述系統完成 2 件疑似保育類野生動物產製品鑑定案之鑑定。兩件鑑定案包括疑似含虎骨成分藥酒 1 瓶及龜板貨樣 21 片。經分析後有 18 個檢體獲得動物 DNA 序列，其與 GenBank 中所登錄之序列比對後發現，其中有 17 個龜板貨樣檢體其序列相似度最高之物種均屬於行政院農業委員會公告陸域保育類野生動物名錄或 CITES 附錄中之物種。此外，本計畫中亦利用多重引子 PCR 結合直接 PCR 複製技術，進行種屬鑑定標準操作流程之建立，以節省鑑定所需之時間及檢體量。本年度以哺乳類動物中之靈長目 (Primates)、齧齒目 (Rodentia)、蝟形目 (Erinaceomorpha) 及雙門齒目 (Diprotodontia) 物種為標的，複製粒線體基因位中 Cytb、COI、16S rRNA 及 12S rRNA 等 4 個基因之序列。本年度蒐集 47 個物種 DNA 作為標準檢體，共 116 個 DNA 檢體，並以 4 個物種之肉塊組織檢體作為直接 PCR 之測試。本研究針對品質各異之動物檢體，分別設計可複製上述 4 個基因全長之引子對，以應用於新鮮組織之 DNA 複製，而針對陳舊或裂解檢體，則於各基因位分別設計一次可同時複製 2 個較短片段 PCR 產物之引子組合，經由直接 PCR 結合多重引子 PCR 技術進行複製後之結果顯示，4 個基因位之成功率介於 97.87%~100% 之間。

關鍵字：哺乳類動物種屬鑑定、DNA 鑑定、粒線體 DNA、Cytb、COI、16S rRNA、12S rRNA、直接 PCR、多重引子 PCR

Abstract

To develop the methods for DNA identification of crime-related biospecimens is the objective in our laboratory for a long time. We also accept the cases for identification from the agencies of law enforcements. Therefore, the related identification systems have been established in our laboratory. In this project, the above systems were used in identification of the confiscated wildlife animal products from two cases (21 specimens of turtle shell and 1 tiger bone medicine wine). DNA sequences for 17 of these specimens were obtained and compared with the sequences registered in GenBank. The species of 17 specimens were both lists on the protected species of Taiwan conservation animals or the CITES appendices. Furthermore, in this study, the multiplex PCR was combined with the direct PCR for saving time and the sample amount. The mammals were focused to establish the standard operating procedures for species identification. In this year, the Primates, Rodentia, Erinaceomorpha and Diprotodontia of mammals were targeted. In a total of 116 DNA specimens were collected from 47 species for standard samples, and 4 meat samples from 4 species for direct PCR testing. The primers to amplify the full region of Cytb、COI、16S rRNA and 12S rRNA for these 4 orders were designed for fresh tissues, and the multiplex PCR with two different size fragments were developed for degraded samples. The results for combination of direct PCR and multiplex PCR showed that most collected species can be amplified successfully. The PCR amplification successful rates of these 4 loci were among 97.87%~100%.

Key word : Mammal species identification, DNA identification, Mitochondrial DNA, Cytb, COI, 16S rRNA, 12S rRNA, Direct PCR, Multiplex PCR.

目錄

中文摘要.....	I
Abstract.....	II
目錄.....	III
研究團隊說明.....	1
計畫目的.....	2
前言.....	4
重要工作項目及實施方法.....	8
結果與討論.....	19
結論.....	43
未來展望.....	44
參考文獻.....	45

附錄

附錄一、木柵動物園 DNA 採樣檢體資訊.....	52
附錄二、鑑定案動物 DNA 序列.....	56
附錄三、鑑定案植物 DNA 序列.....	59
附錄四、以直接 PCR 結合多重引子 PCR 技術建立靈長目、齧齒目、蝸形目及 雙門齒目動物種屬鑑定之標準操作流程.....	62

研究團隊說明

本實驗室長期以來即以發展與犯罪相關生物檢體之 DNA 鑑定方法為首要目標，也受理各相關單位所委託案件之鑑定，其中包括屬於人類及非人類（動植物）等之生物檢體，並期望建立相關之資料庫，以作為進行鑑定時比對之用。以下簡要說明本研究團隊中參與本年度計畫之相關成員與負責工作。

姓名	工作重點	現職
蔡麗琴	計畫主持人（執行人） 負責計畫之執行，如進度管控、技術指導以及報告撰寫等	中央警察大學 鑑識科學系教授
謝幸媚	計畫主辦人 計畫執行期間之相關問題諮詢	中央警察大學 鑑識科學系教授
陳遠寧	相關行政作業、計畫實驗操作及鑑定案之所有相關事宜等。	專任助理
葉光倫	相關行政作業及計畫實驗操作等	臨時工

此外，本年度計畫執行之合作實驗室，其相關成員與負責工作之說明如下。

姓名	工作重點	現職
李俊億	計畫主辦人（執行人） 負責計畫指導與問題諮詢等	國立臺灣大學 醫學院法醫學科暨研究所教授
張廖年鴻	協助標準檢體蒐集、種屬鑑定及檢體提供。	台北市立動物園 保育研究中心 助理研究員

計畫目的

我國政府於民國 78 年公布了野生動物保育法並開始實施，該法中對於野生動物棲息地之保護、保護區之設置、飼養及利用管理、進出口及罰則等均有詳細規定，並公告保育動物名錄，將所列保育類野生動物，列為重點保護及管制對象。本計畫中對於保育動物之認定，為依據行政院農業委員目前公告最新資料為 109 年 1 月 9 日生效之「陸域保育類野生動物名錄」及「海洋保育類野生動物名錄」。

對於經過加工製造之野生動物產製品，由於 DNA 大多嚴重裂解，因此針對此類檢體，選擇粒線體 DNA 作為鑑定之標的較具可行性。相對於細胞核 DNA，粒線體 DNA 具有母系遺傳、套數較多及突變率較高之特性，因此，粒線體 DNA 被廣泛應用於物種鑑定及親緣關係分析上。目前除了 D-loop 高變異區被研究外，有越來越多粒線體基因被重視，如本計畫中所分析之 Cytb (Cytochrome b, Cytb)、COI (Cytochrome c Oxidase subunit I, COI)、16S rRNA 及 12S rRNA 等基因。

本計畫中依 Cytb、COI、16S rRNA 及 12S rRNA 等基因之序列，設計可複製出不同長度之引子對組合，並應用於野生動物產製品之鑑定。複製長度較長之引子組合可應用於 DNA 品質較佳之檢體，而複製長度較短之引子組合則可應用於裂解較嚴重、陳舊及經過加工處理之檢體，但對於未知品質之鑑定案檢體，為節省重複測試不同長度片段之 PCR 複製等流程，故本研究中利用多重引子 PCR 技術，即可於同一批次之 PCR 複製獲得不同長度片段之產物，只要有被複製成功之 PCR 產物即可直接進行 DNA 定序，以節省重複測試不同長度片段之 PCR 複製所需時間。

而直接 PCR 技術因不需經過 DNA 萃取之步驟，即直接進行 PCR 複製，因此有快速、簡單和 DNA 流失較少之優點，若遇上大量鑑定之動物檢體、緊急之案件或微量檢體等，即可使用此方法以縮短鑑定所需時間及減少檢體需求量。因此本計畫中遂延續前一年度之計畫內容，並配合直接 PCR 技術，進行以直接 PCR 結合多重引子 PCR 技術應用於動物檢體快速鑑定之研究。

本計畫中利用本實驗室已建立之系統，分析粒線體 Cytb、COI、16S rRNA 及 12S rRNA 等基因，以鑑定執法單位所查扣之疑似保育類野生動物產製品之種屬；另一方面並以鑑定案中常見之哺乳類動物為標的，利用直接 PCR 結合多重引子 PCR 技術，進行種屬鑑定標準操作流程之建立，期望未來可應用於遭查緝檢體之快速鑑定，以提升檢警單位辦案之效率。

前言

目前與野生動物產製品相關之法令規定，主要包括文化資產保存法、野生動物保育法及華盛頓公約（瀕臨絕種野生動植物國際貿易公約；Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora；CITES）等。野生動物保育法依野生動物族群數量與保護等級，可將其分為瀕臨絕種保育類、珍貴稀有保育類及其他應予保育之野生動物等三大類，內容涵蓋臺灣境內及境外之物種；而華盛頓公約管制國際間貿易的物種，受管制之物種分列於三個附錄中，附錄一的物種為若再進行國際貿易會導致滅絕的動植物，明確規定禁止其國際性的貿易；附錄二的物種則為目前無滅絕危機，但仍管制其國際貿易的物種，日後若族群量繼續降低，則將其升級入附錄一；附錄三是各國視其國內需要，區域性管制國際貿易的物種。為明確辨識其物種，以執行保育之工作，目前已有許多學者致力於各動物種屬之粒線體 Cytb、COI、16S rRNA 及 12S rRNA 等基因之研究，有些應用於刑事鑑識上，有些研究則應用於物種分析與親緣關係演化上，如陳佳萱等人分析豬的 Cytb 基因，以研究蘭嶼豬與歐洲豬種間之親緣關係【1】；楊超等人以線粒體 Cytb 基因全序列探討部分鷗類的系統發育關係【2】；Gundry 等人研究粒線體 DNA SNPs 變異點之序列對於家犬遺傳性徵（如毛色）的影響【3】；梁宏彥等人利用粒線體 DNA 中 16S rRNA 和 COI 兩個基因之 DNA 序列資料，作為臺灣產梭子蟹類(Portunidae)物種鑑定時之分子遺傳標記，其發現蟬屬(Charybdis) 和梭子蟹屬(Portunus)關係較為接近，但與青蟹屬(Scylla)關係較遠【4】；鄭濤等人則是利用粒線體 DNA 12S rRNA 和 Cytb 研究 13 種貓科動物的分子系統關係【5】；姚維等人是利用粒線體 DNA COI 和 Cytb 基因序列針對 7 種龍蝦進行分析【6】；秦峰等人是利用 COI 和 Cytb 基因序列進行鳳蝶科(Papilionidae)六屬之分子系統學研究【7】；許麗等人則是利用 COI 及 Cytb 基因鑑別粉蝶亞科(Pierinae)及黃粉蝶亞科（粉蝶科）(Coliadinae)【8】；C. Ames 等人利用 COI 基因鑑別綠頭蒼蠅的品系【9】；劉連為等人以 COI 和 Cytb 基因序列研究北太平洋柔魚科(Ommastrephidae) 種群遺傳結構【10】；於俊琦等人以 12S rRNA 基因部分序列，針對浙江南部沿海的 6 種舌鰻屬(Cynoglossus)魚進行分析，並發現大部分舌鰻間的系統進化關係與傳統形態分類的結論吻合【11】；吳文珊等人以 28S rRNA、COI 和 Cytb 基因研究薜荔和愛玉子傳粉小蜂的分子遺傳關係，其研究發現早期認為薜荔和愛玉子之傳粉小蜂為同一物種，但實際上薜荔傳粉小蜂與愛玉子傳粉小蜂之間已經發生了很大的遺傳分化，其變異程度達到了種間分化之水準，即薜荔傳粉小蜂與愛玉子傳粉小蜂為兩個不同

的種【12】；李莉好等人以粒線體 COI 基因及 16S rRNA 針對瓶鼻海豚(*Tursiops truncatus*)、中華白海豚(*Sousa chinensis*) 和糙齒海豚(*Steno bredanensis*)進行分析【13-14】。此外，有些則以 12S rRNA 及 Cytb 探討個體間的變異，如洪東奇等人研究臺灣長鬃山羊(*Naemorhedus swinhoei*)粒線體 DNA 12S rRNA 及 Cytb 的部分序列，結果顯示臺灣長鬃山羊個體間其粒線體 DNA 12S rRNA 的演化速率很慢，利用該基因序列之分析可作為物種間鑑別的依據，而 Cytb DNA 比 12S rRNA 具有較快的演化速率及較大的變異，利用 Cytb 區域的分析結果發現臺灣長鬃山羊的遺傳變異可分為兩群，一群位在花蓮太魯閣地區，一群位在臺東地區，臺灣長鬃山羊的基因差異性可能是由於臺灣地理條件的阻隔而造成演化上的差異【15】；劉夢俠等人是以粒線體 Cytb 部份序列來分析榮成灣孔鰻(*Raja porosa*)遺傳多樣性和群體遺傳結構【16】；Y. Ma 等人以分析 Cytb 基因序列建立松江鱸魚(*Trachidermus fasciatus*)發育系統樹，選取杜父魚科(Cottidae)的 10 種魚類，與松江鱸魚進行序列及遺傳距離分析，結果發現松江鱸魚與鱸魚(*Perca fluviatilis*)的親緣關係最遠【17】；YF. Lu 等人利用水牛(*Bubalus bubalus*) 粒線體 D-loop 區和 Cytb 基因分析遺傳多態性及系統發育，結果發現以粒線體 D-loop 區單倍型建構之系統樹和進化網路，顯示江淮水牛存在沼澤型水牛粒線體支系 A 和 B，即其具有 2 個粒線體母系來源，其中 B 支又分為 b1 和 b2 兩個亞支；針對細胞色素 b 基因的進化分析亦支持此一結論【18】；徐龍鑫等人以粒線體 Cytb 基因研究中國矮馬 (*Equus caballus*) 的遺傳多樣性及系統進化，系統發生關係之分析說明了中國 5 個矮馬群體存在基因交流，且具有多重母系起源，因此各群體之間的遺傳多樣性相差不大【19】；楊慧榮等人利用 CR (control region) 和 Cytb 基因序列組合比較珠江和長江水系赤眼鱒(*Squaliobarbus curriculus*)的遺傳多樣性【20】；Somura 等人則是利用分析粒線體 COI、12S rRNA 及 16S rRNA 來改善倭蜂猴(*Bycticebus pygmaeus*)的鑑定【21】；馬牧等人利用 Cytb 基因鑑定出未知鯨骨為大村鯨(*Balaenoptera omurai*)【22】；Morf 等人利用 Cytb 基因之多組引子對組合，進行多重引子 PCR 複製，以應用於鑑別國際間貿易之野生肉類檢體之物種，作為研判是否有違法行為之依據【23】；Cutarelli 等人以 COI 和 Cytb 基因部分序列之複製及定序，應用於分類義大利漁類市場最常買賣之物種，以辨識標示不實的情況【24】；In 等人利用分析 COI 基因序列來鑑別韓國各地青鱗屬(*Oryzias*)物種 DNA 序列之差異性【25】；Rajput 等人利用分析肉類檢體之 12S rRNA 基因片段序列，以鑑別常見之小型野生及家養草食動物之物種，而應用於輔助法醫學上的證據研判【26】；Pesarakloo 等人為了瞭解伊朗水蛙(Iranian water frogs)的親緣關係以及分類，遂收集各地水蛙樣本，利用其粒線體 DNA 中 Cytb 之變異，以研

判其類別【27】；Kitpipit 等人利用 NADH dehydrogenase 5 和 cytochrome b 基因上的 SNPs 區域，設計相對應 primer，經過 PCR 複製後，可藉由不同片段大小區分三個現存的大象物種(亞洲象、非洲森林象與非洲象)【28】；Muangkram 等人設計新的引子複製 cytochrome b 基因短片，藉由此片段的序列區別，可簡單快速鑑別序列相似度高卻又不同保育等級的物種【29】；Vipin 等人先利用 X-ray 檢測所查獲的獸爪是否為大型貓科動物所有，再進行 DNA 萃取，利用 cytochrome b 和 16S rRNA 基因片段來鑑定所查獲之獸爪是否為老虎或是豹所有【30】；Khedkar 等人將複製 COI 基因之通用引子進行雞尾酒式混和(primer cocktail)，使用 21 個未知的獸爪檢體進行測試，結果可成功複製 16 個樣品之 DNA 並鑑定其種屬【31】。由上述文獻探討可知，粒線體 DNA 各基因之分析可作為動物種屬間或同種不同族群間親緣關係研判之依據。

而針對直接 PCR 技術之研究，如 Verheij 等人利用對抑制物耐受性較高之 DNA 聚合酶和可達到快速熱循環儀器之輔助，進行快速之直接 PCR 複製【32】；Swaran 等人比較利用直接 PCR 方法和經過 DNA 萃取步驟來處理不同基質上檢體之 DNA 複製情形，其結果顯示直接 PCR 比經由萃取所得 DNA 可得到更好之 STR DNA 圖譜【33】；Linacre 等人使用直接 PCR 方式針對接觸過皮膚之衣物纖維或使用膠帶沾黏後之檢體進行 DNA 複製，並進行 DNA 圖譜研判，結果顯示直接 PCR 為可行之方法，但纖維布料對於 DNA 複製之影響較大【34】；Tie 等人使用直接 PCR 方法，針對人類的一小塊指甲，以 GenePrint® SilverSTR® III System、AmpFℓSTR® Identifiler® PCR Amplification Kit 以及 Tks Gflex DNA polymerase 等試劑進行 DNA 複製，結果可成功獲得 STR 圖譜【35】；Ottens 等人亦利用直接 PCR 方法進行指甲 DNA 之 STR 複製【36】；Kitpipit 等人利用多重引子直接 PCR 技術，針對野豬、綿羊以及雞肉等三種肉類進行肉類檢測，應用於追查是否有標示不實之情況【37】；Kitpipit 等人針對經常食用之六種肉類設計六組不同長度之引子對，利用直接 PCR 技術複製 Cytb、COI 和 12S rRNA 等基因片段，以鑑定各種肉類產品之純度或是否有標示不實之現象【38】；Kitpipit 等人利用不同的直接 PCR 方法與試劑，針對 12 種類型各種不同動物的檢體進行鑑定，以成本相當低的方法直接複製 DNA 片段作為鑑識之工具【39】；Tobe 等人利用直接 PCR 鑑定精液，讓刑事案件可獲得更快的證據和結果，大幅縮減分析案件的時間【40】；由於案發事件的現場通常很難有冷凍裝置可以保存檢體，因此 Sorensen 之研究中利用直接 PCR 之前處理試劑使 DNA 釋放到溶液中再使用防腐劑保存，其可應用於現場以減少 DNA 裂解之發生【41】；Templeton 等人研究發現使用直接

PCR 技術可以在不同採樣的基質上得到更多的 PCR 產物【42】；Blackie 等人將直接 PCR 技術配合 DogFiler multiplex 進行狗毛鑑定，大幅縮減 DNA 鑑定所需時間，結果並發現毛髮中以粗毛較容易獲得好的結果【43】；Cavanaugh 等人則針對直接 PCR 技術於刑事實驗室可能的應用進行回顧【44】。

而多重引子 PCR 複製技術，為一次可以同時複製多個不同 DNA 片段之技術，其優點為可節省時間與降低工作量，但缺點為不易找到最佳之複製條件。該技術最早是被應用於疾病及致病菌之偵測【45，46】，而目前在刑事鑑識上關於人類身分鑑定之系統，亦皆以多重引子 PCR 複製技術為基礎發展而得【47】。其在動物檢體鑑定方面之應用，如動物之種屬鑑定【48】、肉類製品之種屬鑑定【49】及其致病菌之偵測【50】等。

近年來本實驗室已陸續建立一般動物及野生動物之種屬鑑定、性別鑑定及個體鑑別等系統，而國立臺灣大學法醫學研究所李俊億教授實驗室亦已陸續建立各類動物之 DNA 資料庫，包括粒線體細胞色素 b 基因、12S rRNA 基因、16S rRNA 基因及 COI 基因之序列資料庫，結合兩個實驗室所建立之系統，可進行大多數物種之鑑定。本實驗室以粒線體 DNA 進行野生動物種屬鑑定已累積多年之研究成果，所發表的學術論文其應用之相關種屬或類別包括：犀牛角【51】、龜板【52-54】、藏羚羊毛【55】、象牙【56】、穿山甲鱗片【57】及其他保育類或常見動物種屬【58-60】，此外尚包括鴿子【61-63】及其他鳥類【64-65】等，而本實驗室以這些基因所建立之粒線體 DNA 分析系統，多年來亦已成功地應用於許多案件中野生動物及其產製品之種屬鑑定上，如熊掌【66】、鯨豚肉【67】、犀牛角【51】及龜板【54】等。

為建立更有效率的 PCR 複製策略與序列分析系統，以應用於各種不同野生動物產製品或各種品質不一檢體之種屬鑑定，本計畫中利用可複製野生動物產製品之 Cytb、COI、16S rRNA 及 12S rRNA 等基因各不同長度片段之引子組合，依檢體之 DNA 裂解程度而選擇不同之組合進行複製，進一步為節省重複測試不同長度片段之 PCR 複製等流程，本研究中發展多重引子 PCR 技術，即可於同一批次之 PCR 複製獲得不同長度片段之產物，只要有被複製成功之 PCR 產物即可直接進行 DNA 定序。各檢體之 DNA 經 PCR 複製、定序及序列分析後，再與資料庫之序列比對，以達到種屬鑑定之目的。此外，本計畫中亦延續先前之計畫，利用直接 PCR 結合

多重引子 PCR 技術，並以鑑定案中常見之哺乳類動物為標的，進行種屬鑑定標準操作流程之建立。

重要工作項目及實施方法

為避免不同案件之檢體間在鑑定過程中互相污染，本計畫中進行鑑定之原則為避免同時進行不同案件檢體之前處理、DNA 萃取及 PCR 複製等實驗步驟，並於 PCR 複製過程中增加陽性控制品(Positive Control)與陰性控制品(Negative Control)作為對照組。以下分別針對野生動物產製品鑑定及以直接 PCR 結合多重引子 PCR 技術進行種屬鑑定標準操作流程之建立二部分，進行其重要工作項目及實施方法之說明。

壹、野生動物產製品鑑定

一、檢體來源

本計畫檢體來源為各縣市政府、農政單位、警政單位及司法執行機關等所查扣之疑似野生動物產製品，本年度共受理 2 個鑑定案，其檢體為疑似含虎骨藥酒 1 瓶及龜板貨樣 1 件。鑑定案之檢體類別與數量如表一所示。

表一、本年度鑑定案之檢體類別與數量

鑑定案來文日期	檢體類別	檢測檢體數量	鑑定案完成日期
民國 108 年 12 月 25 日	疑似含虎骨藥酒	1	民國 109 年 02 月 19 日
民國 109 年 06 月 02 日	龜板貨樣	21	民國 109 年 09 月 01 日
合計		22	

二、檢體前處理及 DNA 萃取

(一) 檢體前處理

1. 檢體前處理之步驟如下：

- (1)將外觀型態拍照並加以記錄。
 - (2)液態疑似虎骨藥酒檢體先用 13000rpm 之轉速離心 15 分鐘，然後再移除上清液。
 - (3)非組織之其他堅硬檢體以去離子水刷洗及酒精(70%)沖洗，再置於無菌操作臺風乾 1 天，乾燥後利用洗淨無菌銼刀將檢體磨成粉末。
2. 若為堅硬檢體，則以鹽/氯仿 (Salt/Chloroform) 法或 gSYNC™ DNA Extraction Kit (Geneaid, Taiwan)進行 DNA 萃取。

(二) 鹽/氯仿 (Salt/Chloroform) 萃取方法

1. 取約 50 mg 之檢體粉末置入 1.5 mL 微量離心管中，加入 400 μ L Lysis Buffer，震盪混合 20 秒。
(Lysis Buffer 之配方為：20 μ g/ μ L Proteinase K 500 μ L、10% SDS 300 μ L、1 M Tris-HCl (pH 7.5) 100 μ L、5 M NaCl 12 μ L、ddH₂O 88 μ L、1 M DTT (Dithiothreitol) 40 μ L，體積共 1040 μ L)
2. 56°C反應 15 小時以上 (Overnight)。
3. 加入 170 μ L 之 5M NaCl，混合 30 分鐘。
4. 加入 570 μ L 之 Chloroform，混合 60 分鐘。
5. 以高速離心機 15,000 g 於 4°C離心 15 分鐘，取上清液置於乾淨離心管。
6. 加入 450 μ L 酒精 (99.5%) 至上清液，震盪混合。
7. 將上述液體注入套在 Collection tube 的 GD Column 內[gSYNC™ DNA Extraction Kit (Geneaid, Taiwan)]，以 6,000 g 離心 2 分鐘，去除濾液，若有多餘液體則重複此步驟。
8. 加入 400 μ L W1 Buffer 於 GD Column 中，以 15,000 g 離心 1 分鐘，丟棄濾出液。
9. 加入 600 μ L Wash Buffer 於 GD Column 中，以 15,000 g 離心 1 分鐘，丟棄濾出液。
10. 以 18,000 g 離心 2 分鐘，以去除酒精殘渣。

11. 丟棄收集管，將 Column 套上一新 1.5 mL 微量離心管中，放置於 56°C 之烘箱烘乾 5 分鐘，以去除殘餘酒精。
12. 加入預熱 70°C 之無菌去離子水 50-200 μ L，將 DNA 溶解脫出。
13. 靜置 5 分鐘，以 6000 g 離心 2 分鐘，將 DNA 萃取出來，保存於 -20°C 冰箱。

(三) 以 gSYNC™ DNA Extraction Kit (Geneaid, Taiwan) 進行疑似虎骨藥酒檢體離心後沉澱物之 DNA 萃取，其步驟如下：

1. 將檢體，取 25 mg 放入 1.5 mL 微量試管內加入 200 μ L GST Buffer、20 μ L Proteinase K solution (20 μ g/ μ L) 和 5 μ L Dithiothreitol (DTT)，混和均勻後放置於 60°C 乾浴槽中 4 小時，並以持續以 800 rpm 之速度震盪。
2. 加入 200 μ L GSB buffer，混和均勻後放置於 60 °C 乾浴槽中 20 分鐘，並持續以 800 rpm 之速度震盪。
3. 用 3,000 g 的速度離心 5 分鐘，取出上清液到新的標示好的 1.5 mL 微量試管內，加入無水酒精 (99.5%) 200 μ L，Vortex 混和均勻 10 秒。
4. 將混和液轉移到套在 Collection tube 的 GD Column 中，15,000 g 離心 1 分鐘後，丟棄濾出液。
5. 加入 400 μ L W1 Buffer 於 GD Column 中，以 15,000 g 離心 1 分鐘，丟棄濾出液。
6. 加入 600 μ L Wash Buffer 於 GD Column 中，以 15,000 g 離心 1 分鐘，丟棄濾出液。
7. 不添加任何試劑再用 15,000 g 離心 3 分鐘，以去除殘留之酒精或是異丙醇 (或以 60°C 乾浴槽乾燥約 5 分鐘)。
8. 將 GD Column 轉移到乾淨並標示好的微量離心管上，加入 50~100 μ L 預熱至 60 °C 的 ddH₂O，靜置至少 3 分鐘後，以 15,000 g 離心 1 分鐘，丟棄 Spin Column，此濾出液中即含有 Genomic DNA，放置於 -20°C 冰箱保存。

三、引子序列設計

本計畫中使用引子對為適用於不同物種之通用引子(Universal Primer)，為依據 GenBank 中多個物種之序列比對結果而設計，並利用 Primer3 V.0.4.0 軟體 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>) 評估所設計之引子自行黏合形成髮夾結構 (Hairpin) 以及引子對之間形成二聚體(Dimer)之情形。本計畫及歷年計畫中針對 Cytb 基因共設計 17 條引子，針對 COI 基因共設計 10 條引子，針對 16S rRNA 基因共設計 6 條引子，針對 12S rRNA 基因共設計 7 條引子，其序列分別如表二所示。

四、聚合酶連鎖反應

聚合酶連鎖反應其反應試劑之組成為：2X Phire Tissue Direct PCR Master Mix 10 μ L、10 μ M 引子各 1 μ L 和約 1~10ng 的 DNA 量或約 1 μ L 稀釋 10 到 100 倍的檢體前處理液，最後以無菌去離子水將總反應體積調整至 20 μ L。將上述組成混合均勻並短暫離心後，放入 PCR 熱循環儀 (GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystems, USA) 中進行反應。反應條件為 98°C 使 DNA 變性 5 分鐘，接著進入循環程式，包括 98°C 使 DNA 由雙股變為單股約 5 秒，再以各引子特定之黏合溫度進行黏合約 5 秒，接著以 72°C 延長 DNA 片段約 20 秒（如需複製的長度大於 1000bp 則須要 30 秒以上），將此條件進行 35 至 40 個循環，完成循環反應後以 72°C 作用 1 分鐘使反應完全，最後將產物保存於 4°C。所得到之 PCR 產物以洋菜膠體電泳進行分析。

表二、複製各片段之引子序列(動物)

	引子名稱	引子長度(mers)	引子序列 (5'→3')
Cytb	L14696	20	TCTCACATGGACTTCAACCA
	L14724 (4a)	28	CGAAGCTTGATATGAAAAACCATCGTTG
	L14735	20	CCATCGTTGTAATCAACTA
	L14768	20	GACCCACACCCGAAAATCTC
	L14794sh	20	TAATAAAAATTGTAAACAAC
	L14829	20	CCAAGYCCBTCHAAYATCTC
	L14847sh	20	TCATCATGATGAAACTTTGG
	L14941	20	TYTYMYTRGCATTYTCATCA
	H14888	20	TGYATTGCYARRAARATTCC
	H14930	20	TGDGHNAYTGATGARAATGC
	H14957	20	CAGCCGTAGTTTACGTCTCG
	H15119	20	TAGCCTATGAATGCTGTGGC
	H15134	20	CCTCACGGAAGGACATATCC
	H15149 (9b)	34	TAAGTGTAGCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA
	H15197	20	CCGATATAAGGGATTGCTGA
	RA200	20	DATDGADGCTCCGTTTGCAT
	H15915 (H5a)	28	AACTGCAGTCATCTCCGGTTTACAAGAC
COI	COI-F1	19	RNHYYTAGTTAACAGCTAA
	RA300	20	GGDGCDCDATTATHARNGG
	LCO1490	25	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG
	LCO529	17	TCHCARTAYCAAACNCC
	HCO2198D rev	17	TGRTTYTTYGGNCAAYCC
	HCO2198D	26	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA
	HCO1128R	20	GTARTGGAAGTGBGCTACTA
	LCO1270 rev	17	TGTTGNGGRAARAADGT
	LCO1270	17	ACHTTYTTYCCNCAACA
	COI-R1	17	RGTTTCRANTCCTTCCTTT
16S rRNA	16S-F	20	GTGCAAAGGTAGCATAATCA
	16S-F2	20	CCGCCTGTTTACCAAAAACA
	16S-R	20	TGTCCTGATCCAACATCGAG
	16S-R2	23	GGATTGCGCTGTTATCCCTAGGG
	16S-F3	23	ACTTGTATGAATGGCCACACGAG
	16S-F5rev	18	TCCGAGGTCACCCCAACC

	引子名稱	引子長度(mers)	引子序列 (5'→3')
12S rRNA	12S-1	19	CAAACCTGGGATTAGATACC
	12S-2	18	TAGAACAGGCTCCTCTAG
	12S-5	21	ATAAACGAAAGTTTGACTAAG
	12S H1478	20	GAGGGTGACGGGCGGTGTGT
	12S L1091	21	CTGGGATTAGATACCCCACTA
	12S-UF	20	CAAACCTGGGATTAGATACCC
	12S-UR	20	GAGGGTGACGGGCGGTGTGT

*引子序列中鹼基之表示方式為依據 IUPAC 所提出之命名原則。

表三、複製各片段之引子序列(植物)

	引子名稱	引子長度(mers)	引子序列 (5'→3')
psbA-	psbA-	22	GTTATGCATGAACGTAATGCTC
trnH(IGS)	trnH	23	CGCGCATGGTGGATTCACAATCC
trnL intron	C	20	CGAAATCCGTAGACGCTACG
	D	20	GGGGATAGAGGGACTTGAAC
trnL-trnF	E	20	GGTCAAGTCCCTCTATCCC
(IGS)	F	20	ATTGAACTGGTGACACGAG
rbcL	rbcL-F	20	ATGTCACCACAAACAGAAAC
	rbcL-R	20	TCGCATGTACCTGCAGTAGC

五、洋菜膠電泳 (Agarose Gel Electrophoresis)分析

以 1X TBE Buffer 配製 2%之洋菜膠(Agarose Gel) 含有 5% SafeView™ (Arrowtec, Taiwan)染劑。5 µL 之 PCR 產物加到膠體中，以 100 V 進行電泳，電泳完成後將膠體置於 UV 燈(450 nm)下觀察並拍照存檔。

六、DNA 定序

定序方法為以 Big Dye™ Termination Kit (Applied Biosystems, USA)進行循環定序反應(Cycle Sequencing)，以臺灣大學醫學院之 ABI-3730 (Applied Biosystems, USA)或本實驗室之 SeqStudio Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA)自動化螢光電泳定序儀進行反應產物之分離。

七、序列分析

將上述所得序列與 GenBank 資料庫進行比對，以搜尋最相似之物種。此外，亦與國立臺灣大學李俊億教授實驗室建立之資料庫進行比對。

(一) 利用 NCBI (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 網站，進行與 GenBank 資料庫之搜尋比對，步驟如下：

1. 開啟 NCBI 網頁

(http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome)

2. 點選 Nucleotide Blast 選項，將序列複製後貼入 NCBI 網頁 Query 方格中。

3. 將 Others 及 Highly Similar Sequences (megablast) 選項選取。

4. 點下 BLAST 即可看到比對結果。

(二) 利用 BioEdit 軟體，將序列與本實驗室或國立臺灣大學法醫學研究所李俊億教授實驗室之資料庫進行自動化搜尋比對，步驟如下：

1. 開啟 BioEdit 7.0 軟體，由工具列 Accessory Application 中選取 BLAST，再選擇 Local BLAST 指令，於 Nucleotide Database 中選擇欲比對之資料庫名稱。

2. 加入欲比對之序列有兩種方法，一為直接於 Query 方格中貼上未知序列，或是由 Load From File 選項中選擇欲與資料庫比對之未知序列檔案，最後執行 Do Search 即可搜尋比對之結果。

貳、以直接 PCR 結合多重引子 PCR 複製技術建立哺乳類動物產製品種屬鑑定之標準操作流程

本計畫利用多重引子 PCR 結合直接 PCR 複製技術，以哺乳類動物為標的，進行種屬鑑定標準操作流程之建立。但因哺乳類動物所含物種眾多，難以設計適合其 PCR 複製之通用引子，因此，本年度計畫以哺乳類動物中之靈長目 (Primates)、齧齒目 (Rodentia)、蝟形目 (Erinaceomorpha) 及雙門齒目 (Diprotodontia) 物種為標的。此流程之建立不但可節省各類常見樣態檢體進行 DNA 萃取的時間，針對新鮮組織可分別複製 Cytb、COI、16S rRNA 及 12S rRNA 等 4 個基因全長之序列，至於陳舊及裂解檢體則可以多重引子 PCR 技術於同一批次之 PCR 複製獲得較短片段之產物，只要製成功之 PCR 產物即可直接進行 DNA 定序，將可節省重複測試不同長度片段 PCR 產物複製之流程。

一、檢體來源

本計畫中使用之標準檢體來源，來自台北市立動物園之標準物種 DNA (如表四及附錄

一所示)，靈長目 8 科(蜘蛛猴科 2 種、彌猴科 4 種、捲尾猴科 6 種、侏儒狐猴科 1 種、猩猩科 4 種、長臂猿科 6 種、狐猴科 3 種及懶猴科 3 種)；齧齒目 9 科(豪豬科 2 種、河狸科 1 種、毛絲鼠科 1 種、松鼠科 5 種、巨水鼠科 1 種、豚鼠科 1 種、倉鼠科 1 種、鼠科 1 種及刺鼠科 1 種)；蝸形目 1 科(蝸科 1 種)；雙門齒目 2 科(袋鼠科 2 種及無尾熊科 1 種)；合計 47 個物種共 122 個 DNA 檢體，其中 6 個為肉塊組織，選擇 4 個不同物種之肉塊組織作為本計畫中針對直接 PCR 測試之檢體，以評估本研究所建立之系統進行直接 PCR 複製的適用性。

表四、木柵動物園採樣 DNA 檢體

目	科	中文俗名	個體	目	科	中文俗名	個體
靈長目 8 科 29 種 70 個個體	蜘蛛猴科	黑蜘蛛猴	1	齧齒目 9 科 14 種 41 個個體	豪豬科	冠豪豬	2
		黑掌蜘蛛猴	1		2 種 5 個個體	馬來豪豬	3
	彌猴科	松鼠猴	3				
		黑冠松鼠猴	3		河狸科	加拿大河狸	3
		阿氏夜猴	2		1 種 3 個個體		
		馬來猴	3		毛絲鼠科	絨鼠	2
	捲尾猴科	臺灣獼猴	5		1 種 2 個個體		
		彩面山魈	3		松鼠科	歐亞小鼯鼠	3
		豬尾猴	3		5 種 16 個個體	大赤鼯鼠	3
		紅猴	3			白面鼯鼠	3
		截尾猴 (胭脂猴)	1			北美土撥鼠	3
		黑白疣猴	1			赤腹松鼠	4
	侏儒狐猴科	粗尾侏儒狐猴	2		巨水鼠科	美洲巨水鼠	3
					1 種 3 個個體		
	猩猩科	平地金剛猩猩	1		豚鼠科	天竺鼠	3
		西部金剛猩猩	3		1 種 3 個個體		
		黑猩猩	2		倉鼠科	高山田鼠	4
		人猿	2		1 種 4 個個體		
	長臂猿科	大長臂猿	3		鼠科	巢鼠	2
		白手長臂猿	3		1 種 2 個個體		
		白頰黑長臂猿	1		刺鼠科	橙腰鼠	3
		灰長臂猿	3				
		金頰長臂猿	3				
		黑手長臂猿	3				
	狐猴科	褐狐猴	3				
		環尾狐猴	3				
		白頸狐猴	2				
	懶猴科	小懶猴	3				
		懶猴	2				
		普特懶猴	2				

目	科	中文俗名	個體	目	科	中文俗名	個體
蝟形目 1科 1種 3個個體	蝟科 1種3個 個體	白腹刺猬	3	雙門齒 目 2科 3種 8個個體	袋鼠科	灰袋鼠	3
					2種5個個 體	紅頸袋鼠	2
					無尾熊科	無尾熊	3
共計4目，20科，47種，122個個體							

二、實驗方法與步驟

本計畫利用 PCR 複製之結果評估直接 PCR 配合多重引子 PCR 複製之效率，並以萃取 DNA 作為對照組，直接 PCR 之商用試劑組為 Phire Tissue Direct PCR Master Mix (Thermo Scientific, U.S.A)。直接 PCR 之步驟可分為檢體前處理及直接聚合酶連鎖反應 (Direct Polymerase Chain Reaction)，不同類型的檢體將採用不同的前處理與不同的直接聚合酶連鎖反應條件。其操作步驟說明如下：

(一) 檢體前處理

1. 動物園之 DNA 檢體

由台北市立動物園抽取組織 DNA 以冷藏方式運送至本實驗室。

2. 肉類檢體

- (1) 檢體使用前存放於 -20 °C 冰箱。
- (2) 進行實驗時，切取一小塊用去離子水清洗乾淨。
- (3) 切取微量 (直徑約 1 mm 大小) 檢體至乾淨的 1.5 mL 微量離心管中。
- (4) 加入 20 µL dilution buffer (液面必需高於檢體)。
- (5) 加入 0.5 µL DNA Release buffer。
- (6) 充份混合均勻 10 秒。
- (7) 在室溫放置 2-5 分鐘。
- (8) 置於 98 °C 乾浴槽中以 800 rpm 轉速震盪 2 分鐘。
- (9) 若不馬上進行後續之分析，則經處理後之檢體可放置 -20 °C 冰箱保存。

(二) 引子序列設計

本研究中針對各基因之多重引子 PCR 複製所需引子進行設計，每個基因依長度至

少分別設計包含短、中片段之引子，甚至包含複製基因全長之引子。因哺乳類動物所含物種眾多，難以設計適合其 PCR 複製之通用引子，因此，本年度計畫中以哺乳類動物中之靈長目 (Primates)、齧齒目 (Rodentia)、蝟形目 (Erinaceomorpha) 及雙門齒目 (Diprotodontia) 物種為標的，建立其多重引子 PCR 複製系統。至於引子設計時使用之參考序列，除了採用本研究團隊(警大鑑識系及台大法醫所)多年來所建立之物種序列外，並下載 GenBank 中已登錄之靈長目、齧齒目、蝟形目及雙門齒目物種序列，利用 Primer3 V.0.4.0 軟體依其共通或相似之序列進行引子設計，也參考已發表論文設計 12S rRNA 之通用引子對(12S-UF/UR)【68】，依此設計所得之各種組合引子對，先以台北市立動物園提供之 DNA 檢體，分別進行各基因全長複製及多重引子 PCR 之條件測試與系統建立，然後再使用肉類組織樣態檢體，進行直接 PCR 之測試。引子序列經其適合性評估後，若有不適者，即針對需求重新設計引子。最後篩選出可複製全長（品質優）及 Duplex PCR（裂解）之引子組合。

(三)聚合酶連鎖反應

以直接 PCR 結合多重引子 PCR，分別進行 Cytb、COI、16S rRNA 及 12S rRNA 基因之全長及部分序列片段之複製；若為進行多重引子 PCR 之條件測試，則以標準 DNA 進行聚合酶連鎖反應。聚合酶連鎖反應之試劑組成為：2X Phire Tissue Direct PCR Master Mix 10 μ L、10 μ M 引子各 1~10ng 的 DNA 量或約 1 μ L 稀釋 10 到 100 倍的檢體前處理液，最後以無菌去離子水將反應總體積調整至 20 μ L。

將上述組成混合均勻並短暫離心後，放入 PCR 熱循環儀(GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystems, USA)中進行反應。反應條件為 98°C 使 DNA 變性 5 分鐘，接著進入循環程式，98°C 使 DNA 由雙股變為單股約 5 秒，再以各引子特定之黏合溫度進行黏合約 5 秒，接著以 72°C 延長 DNA 片段約 20 秒(如需複製的長度大於 1000 bp 則須要 30 秒以上)，將此條件進行 40 個循環，完成循環反應後以 72°C 作用 1 分鐘使反應完全，最後將產物保存於 4°C。所得到之 PCR 產物以洋菜膠體電泳進行分析。

(四)洋菜膠電泳分析

PCR 複製完成後進行洋菜膠電泳分析 PCR 產物，其詳細操作步驟與方法同項目“壹”中所述，電泳結果並拍照存檔。藉由比較各檢體其亮帶數目及強度呈現之狀況，以研判複製效率。

結果與討論

壹. 野生動物產製品鑑定

一、 野生動物產製品基因片段之複製

本計畫之分析流程為依照檢體 DNA 品質不同而選擇適合之引子對，由長片段至短片依序進行 PCR 複製之測試。但若檢體為肌肉組織則不進行 DNA 萃取，即採用直接 PCR 技術進行複製。以下分別介紹各基因之引子對組合與其複製策略：

(一) 細胞色素 b (Cytochrome b, Cytb) 基因：

當檢體較佳時，首先使用可複製 Cytb 全長之引子對組合(L14724/H15915)進行複製（基因全長），若以 L14724/H15915 無法複製成功，則使用引子對組合(L14724/H15149)或是引子對組合(L14724/RA200)及(L14735/H1488)等進行較短片段之 PCR 複製，並進行 DNA 定序。本計畫中複製 Cytb 之引子對組合與複製長度如表五所示，各引子間相對位置如圖一所示。

(二) COI (Cytochrome c oxidase subunit I, COI) 基因：

當檢體品質較佳時，使用複製 COI 全長之引子對 COI-F1/COI-R1 進行複製，若 PCR 無法複製成功，則依複製長度由長片段至短片之策略進行試驗，如引子對 COI-F1/HCO2198D，其次為引子對 COI-F1/RA300。其他相關引子對組合如表五，各引子間之相對位置如圖二所示。

(三) 16S rRNA

本計畫中使用引子對 16S-F2/16S-R 或 16S-F/16S-R 進行 16S rRNA 基因之複製。引子對組合如表五所示，各引子之相對位置如圖三所示。

(四) 12S rRNA

本計畫中使用引子對 12S-L1091/12S-H1478 進行 12S rRNA 基因之複製，亦依複製長度由長片段至短片之策略進行試驗。引子對組合如表五所示，各引子之相對

位置如圖四所示。

二、 植物產製品基因片段之複製

本年度鑑定案中，關於疑似虎骨藥酒檢體，因成分標示無法成功複製動物 DNA 產物，且藥酒成份標示中發現含有植物成分，因此以複製植物葉綠體基因之引子組合作為其複製策略，本計畫中使用植物葉綠體基因之引子對組合與複製長度如表六所示，其引子間相對位置如圖五所示，以下分別介紹各基因之引子對組合：

(一) psbA-trnH IGS 基因：

以植物葉綠體基因之引子對組合(psbA/trnH)進行該基因位之 PCR 複製，並進行 DNA 定序。

(二) trnL intron 基因：

以植物葉綠體基因之引子對組合(C/D)進行該基因位之 PCR 複製，並進行 DNA 定序。

(三) trnL-trnF IGS 基因：

以植物葉綠體基因之引子對組合(E/F)進行該基因位之 PCR 複製，並進行 DNA 定序。。

(四) rbcL 基因：

以植物葉綠體基因之引子對組合(rbcL-F/rbcL-R)進行該基因位之 PCR 複製，並進行 DNA 定序。

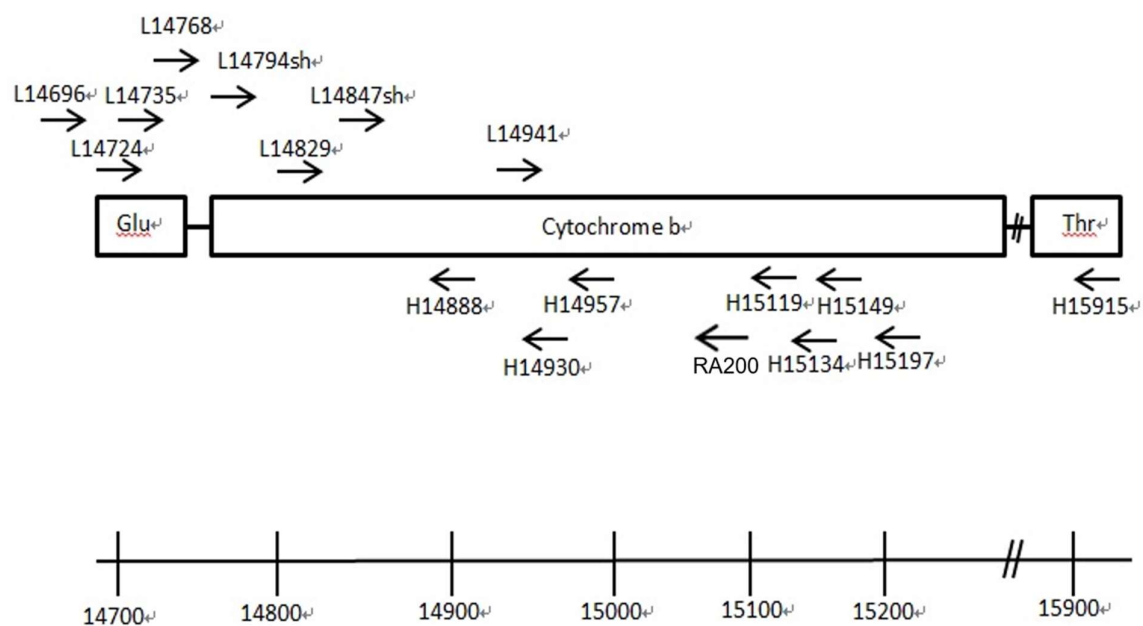
表五、本計畫複製各基因片段之引子對組合與進行 PCR 複製之黏合溫度及分析長度

		引子對組合	黏合溫度	產物長度(bp)	分析長度(bp)
Cytb	第 1 組	L14724/H15915	50°C	1246	1168
	第 2 組	L14696/H15197	50°C	540	450
	第 3 組	L14735/H15149	50°C	466	402
	第 4 組	L14724/H15197	50°C	520	450
	第 5 組	L14724/H15149	50°C	486	402
	第 6 組	L14829/H15149	50°C	373	319
	第 7 組	L14768/H15134	50°C	405	365
	第 8 組	L14794sh/H15119	50°C	364	324
	第 9 組	L14724/H14957	50°C	280	210
	第 10 組	L14724/H14930	50°C	253	189
	第 11 組	L14724/RA200	58°C	248	184
	第 12 組	L14735/H14930	50°C	234	183
	第 13 組	L14735/H14888	50°C	192	141
COI	第 1 組	COI-F1/COI-R1	47°C	1772	1538
	第 2 組	LCO1490/COI-R1	47°C	1533	1538
	第 3 組	COI-F1/HCO2198D	47°C	947	706
	第 4 組	HCO2198D rev/COI-R1	47°C	851	817
	第 5 組	LCO1490/HCO2198D	52°C	708	660
	第 6 組	HCO2198D rev/HCO1128R	47°C	432	397
	第 7 組	COI-F1/RA300	47°C	485	244
	第 8 組	LCO1490/RA300	47°C	246	198
	第 9 組	LCO529/HCO2198D	47°C	203	178
16S rRNA	第 1 組	16S-F2/16S-R	50°C	516	478
	第 2 組	16S-F/16S-R	50°C	450	410
12S rRNA	第 1 組	12S L1091/12S H1478	50°C	455	413
	第 2 組	12S-UF/12S-UR	54°C	453	413
	第 3 組	12S-5/12S-2	50°C	407	368
	第 4 組	12S-UF/12S-2	54°C	166	128
	第 5 組	12S-1/12S-2	50°C	165	128

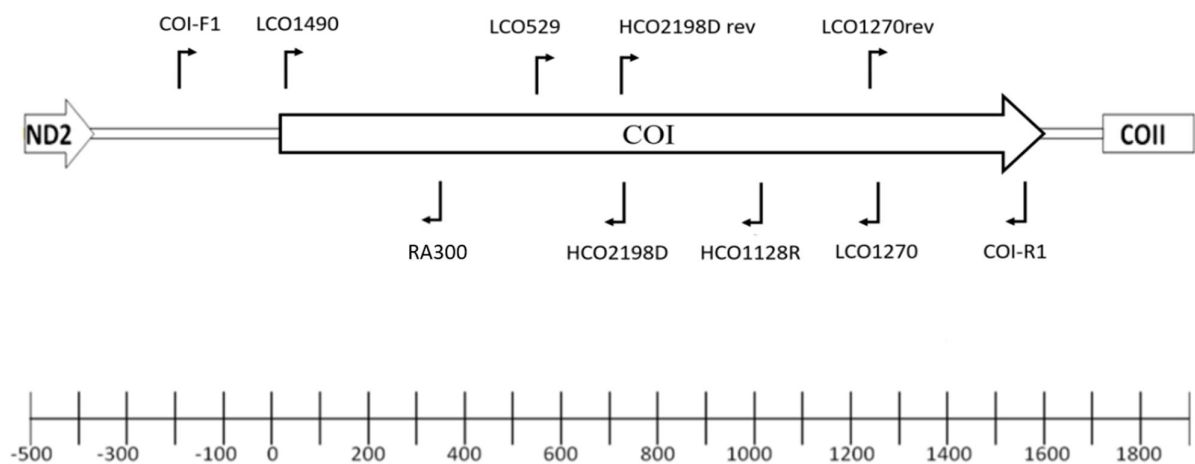
黏合時間除了複製 COI 之片段為 60 秒外，其餘基因片段之複製其黏合時間皆為 45 秒。

表六、本計畫複製各基因片段之引子對組合與進行 PCR 複製之黏合溫度及分析長度。

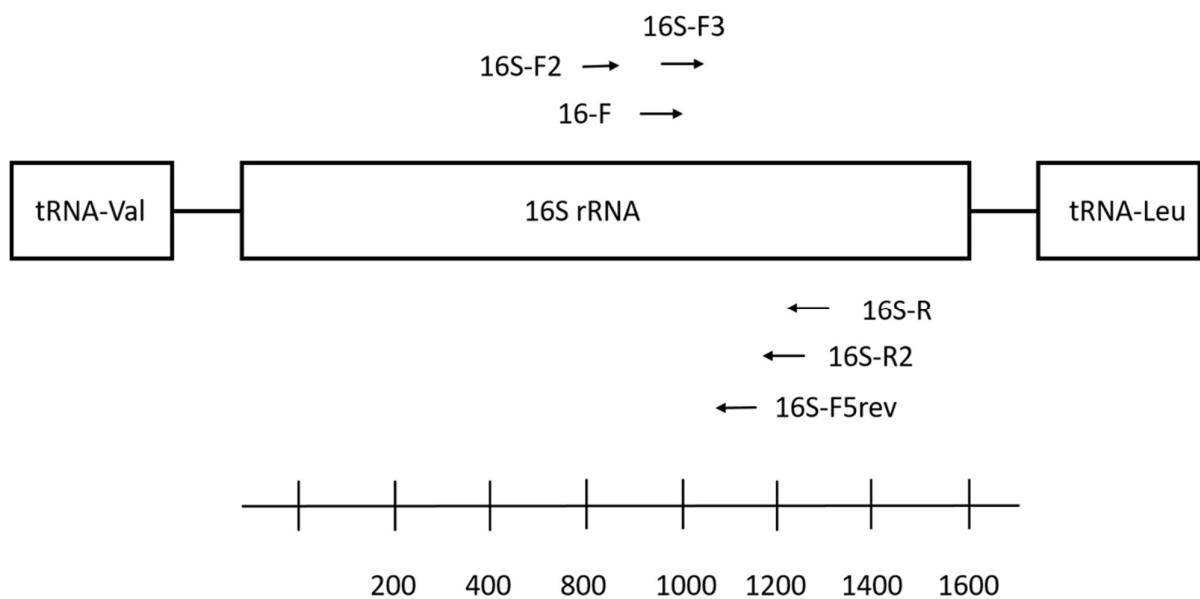
	引子對組合	黏合溫度	產物長度(bp)	分析長度(bp)
psbA-trnH(IGS)	psbA/trnH	55°C	440	395
trnL intron	C/D	52°C	544	504
trnL-trnF (IGS)	E/F	52°C	413	373
rbcL	rbcL-F/rbcL-R	52°C	724	684



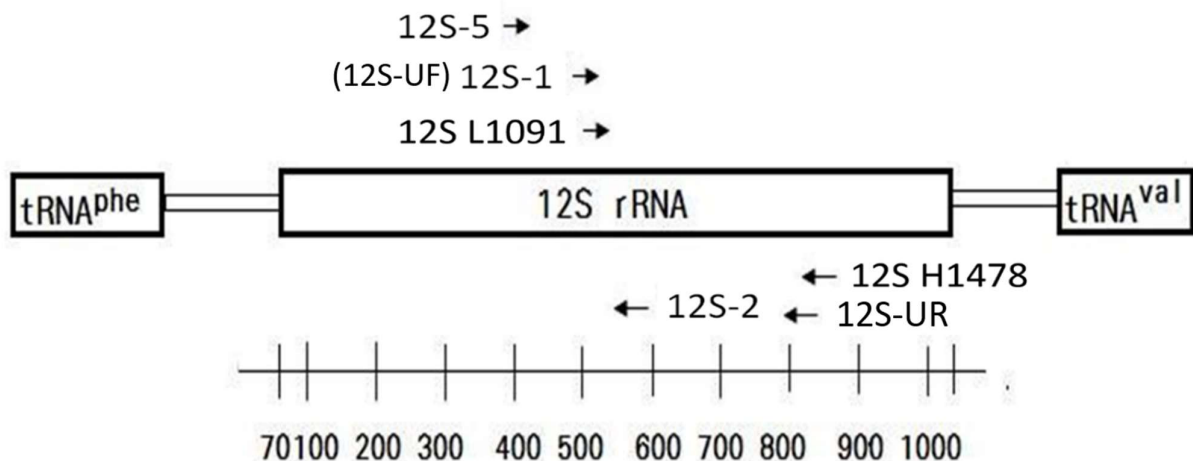
圖一、複製 Cytb 基因各片段之引子及相對位置圖。



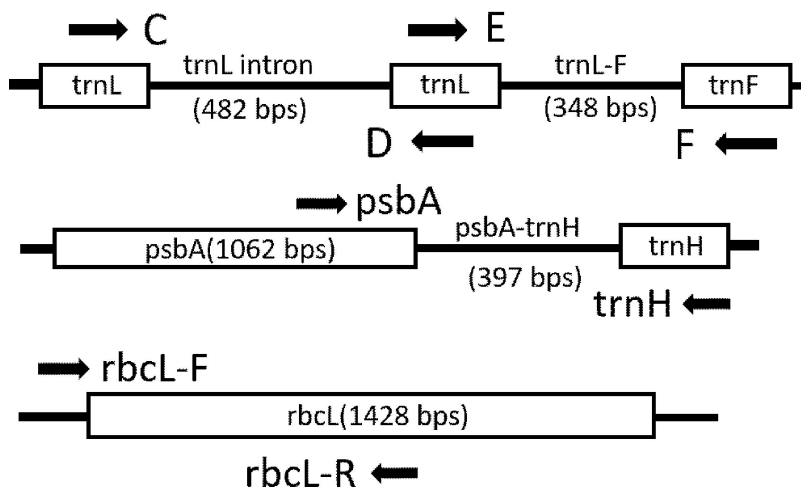
圖二、複製 COI 基因各片段之引子及相對位置圖。



圖三、複製 16S rRNA 基因各片段之引子及相對位置圖。



圖四、複製 12S rRNA 基因各片段之引子及相對位置圖。



圖五、複製植物 trnL intron、trnL-trnF(IGS)、psbA-trnH(IGS)及 rbcL 等基因各片段之引子及相對位置圖。

三、野生動物及植物產製品各基因片段之序列分析

利用上述所設計之 PCR 複製引子及策略，針對本年度所送鑑之檢體 (如表一所示) 進行鑑定。本年度共受理 2 個鑑定案，合計分析 22 個檢體，依上述之 PCR 複製策略進行複

製，共成功獲得 18 個龜板檢體 PCR 產物之定序結果，疑似虎骨藥酒檢體則無法獲得動物 DNA 之 PCR 產物，但根據商品成分標示發現其含有植物成分，故本案另使用植物基因引子組合進行葉綠體基因之複製，其所使用之引子對及序列比對結果分述如下：

(一) 成功複製 Cytb 基因之檢體有 17 個，送鑑龜板貨樣之 21 個檢體中，其中 6 個檢體可以引子對組合 L14724/H15149 進行 PCR 複製並獲得產物，經定序並刪除雜訊後發現，編號 109COA2-1、109COA2-5、109COA2-11、109COA2-13、109COA2-17 及 109COA2-18 之 PCR 複製產物均具相同之序列型(395bp)；另 11 個檢體可以引子對組合 L14735/H14888 進行 PCR 複製並獲得產物，經定序並刪除雜訊後發現，編號 109COA2-3、109COA2-4、109COA2-6、109COA2-7、109COA2-8、109COA2-9、109COA2-10、109COA2-12、109COA2-14、109COA2-16 及 109COA2-19 之 PCR 複製產物均具相同之序列型(144bp)。上述序列如附錄二所示。

(二) 成功複製 16S rRNA 基因之檢體有 14 個，送鑑龜板貨樣 21 個檢體中，其中 12 個檢體可以引子對組合 16S-F2/16S-R1 進行 PCR 複製並獲得產物，經定序並刪除雜訊後發現，編號 109COA2-1、109COA2-3、109COA2-4、109COA2-5、109COA2-7、109COA2-9、109COA2-10、109COA2-11、109COA2-12、109COA2-13、109COA2-17 及 109COA2-18 之 PCR 複製產物均具相同之序列型(456bp)；另有 2 個檢體可以引子對組合 16S-F2/16S-F5rev 進行 PCR 複製並獲得產物，經定序並刪除雜訊後發現，編號 109COA2-2 及 109COA2-16 之 PCR 複製產物具有 2 種序列型，長度分別是 310bp 及 267bp。上述序列如附錄二所示。

(三) 成功複製疑似虎骨藥酒檢體萃取 DNA 之 psbA-trnH IGS、trnL intron、trnL-trnF IGS 及 rbcL 等植物葉綠體基因，使用的引子對分別為 C/D、E/F、psbA/trnH 及 rbcL-F/rbcL-R，均可獲得其 PCR 產物，經定序並刪除雜訊後，其序列如附錄三所示。

將上述各基因位之序列分別與美國 NCBI 基因庫(GenBank)中所有 DNA 序列進行比對，以搜尋其最相似之物種。比對結果如表七、表八及表九所示。

表七、Cytb 基因分析之鑑定結果

類別	最相似物種	相似度(%)	保育 動物	CITES	檢體 數量
龜板貨樣	<i>Mauremys sinensis</i> (斑龜)	99.49-100.00	否	是	6
109COA2-1	<i>Mauremys reevesii</i> (金龜)	98.72-99.23	是	是	
109COA2-5	<i>Mauremys megaloccephala</i> (大頭烏 龜)	98.72-98.98	否	是	
109COA2-11					
109COA2-13					
109COA2-17	<i>Mauremys nigricans</i> (黑頸烏龜)	98.21	是	是	
109COA2-18	<i>Mauremys caspica</i> (里海烏龜)	97.19	否	否	11
龜板貨樣					
109COA2-3	<i>Mauremys sinensis</i> (斑龜)	98.61-100.00	否	是	
109COA2-4					
109COA2-6					
109COA2-7	<i>Mauremys nigricans</i> (黑頸烏龜)	99.31	是	是	
109COA2-8					
109COA2-9					
109COA2-10	<i>Mauremys reevesii</i> (金龜)	98.61-99.31	是	是	
109COA2-12					
109COA2-14	<i>Mauremys megaloccephala</i> (大頭烏 龜)	98.61-99.31	否	是	
109COA2-16					
109COA2-19					
合計					17

註：相似度指與 GenBank 中登錄之序列比對後所得之結果。

表八、16S rRNA 基因分析之鑑定結果

類別	最相似物種	相似度(%)	保育 動物	CITES	檢體 數量
龜板貨樣	<i>Mauremys sinensis</i> (斑龜)	99.34-100.00	否	是	12
109COA2-1					
109COA2-3	<i>Mauremys nigricans</i> (黑頸烏 龜)	98.91	是	是	
109COA2-4					
109COA2-5					
109COA2-7	<i>Mauremys japonica</i> (日本石龜)	97.59	是	是	
109COA2-9					

109COA2-10					
109COA2-11	<i>Mauremys reevesii</i> (金龜)	97.37-97.59	是	是	
109COA2-12					
109COA2-13	<i>Mauremys megaloccephala</i> (大頭				
109COA2-17	烏龜)	97.37	否	是	
109COA2-18					
龜板貨樣 109COA2-2	<i>Trachemys scripta</i> (彩龜)	100.00	否	否	1
	<i>Malaclemys terrapin</i> (鑽紋龜)	96.77	是	是	
	<i>Chrysemys picta</i> (錦龜)	94.52	否	否	
龜板貨樣 109COA2-16	<i>Mauremys sinensis</i> (斑龜)	98.89-100.00	否	是	1
	<i>Mauremys nigricans</i> (黑頸烏龜)	98.50	是	是	
	<i>Mauremys reevesii</i> (金龜)	97.38	是	是	
合計					14

註：相似度指與 GenBank 中登錄之序列比對後所得之結果。

表九、psbA-trnH IGS、trnL intron、trnL-trnF IGS 及 rbcL 序列比對結果

檢體基因	相似物種學名	序列一致比例 (bp/bp)	相似度 (%)
psbA-trnH IGS	<i>Chaenomeles sinensis</i> (木瓜)	262/262	100.00
	<i>Docynia delavayi</i> (雲南移)	262/262	100.00
trnL intron	<i>Chaenomeles sinensis</i> (木瓜)	537/538	99.81
	<i>Docynia delavayi</i> (雲南移)	537/538	99.81
trnL-trnF IGS	<i>Chaenomeles sinensis</i> (木瓜)	404/404	100.00
	<i>Docynia delavayi</i> (雲南移)	404/404	100.00
rbcL	<i>Chaenomeles sinensis</i> (木瓜)	694/694	100.00
	<i>Docynia delavayi</i> (雲南移)	694/694	100.00

註：相似度指與 GenBank 中登錄之序列比對後所得之結果。

(三) 野生動物產製品鑑定結果之綜合討論

本年度野生動物產製品之鑑定案共計 2 件，分析之檢體共 22 個，其中可獲得 PCR 複製產物並成功定序者共 18 個，各檢體於各基因分析所得之序列如附錄二及附錄三所示，鑑定結果如表七及表八所示。其中 17 個龜板貨樣檢體其序列相似度最高之物種均為 *Mauremys sinensis*(斑龜)或 *Mauremys nigricans*(黑頸烏龜)，前者不屬於行政院農業委員會公告陸域保育

類野生動物名錄之物種，但屬於 CITES 附錄中之物種；後者屬於行政院農業委員會公告陸域保育類野生動物名錄及 CITES 附錄中之物種，1 個為 *Trachemys scripta*(彩龜)不屬於行政院農業委員會公告陸域保育類野生動物名錄及 CITES 附錄中之物種。

貳、以直接 PCR 結合多重引子 PCR 複製技術建立哺乳類動物產製品種屬鑑定之標準操作流程

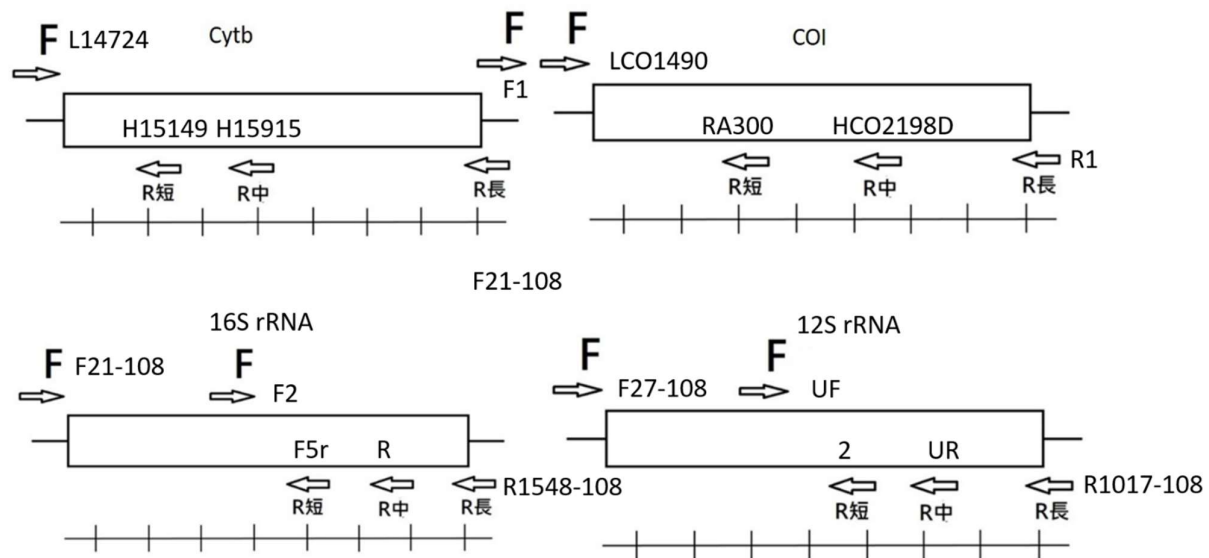
本年度計畫中針對哺乳類動物之靈長目、齧齒目、蝟形目及雙門齒目，發展以直接 PCR 結合多重引子 PCR 技術進行其種屬鑑定之系統，及建立其標準操作流程。本計畫中使用來自台北市立動物園之標準物種 DNA，靈長目 8 科(蜘蛛猴科 2 種、彌猴科 4 種、捲尾猴科 6 種、侏儒狐猴科 1 種、猩猩科 4 種、長臂猿科 6 種、狐猴科 3 種及懶猴科 3 種)；齧齒目 9 科(豪豬科 2 種、河狸科 1 種、毛絲鼠科 1 種、松鼠科 5 種、巨水鼠科 1 種、豚鼠科 1 種、倉鼠科 1 種、鼠科 1 種及刺鼠科 1 種)；蝟形目 1 科(蝟科 1 種)；雙門齒目 2 科(袋鼠科 2 種及無尾熊科 1 種)；合計 47 個物種共 122 個 DNA 檢體，檢體資訊如附錄一所示，其中 6 個為肉塊組織，選擇 4 個不同物種之肉塊組織作為本計畫中針對直接 PCR 測試之檢體，以評估本研究所建立之系統進行直接 PCR 複製的適用性以下分別說明其研究結果。

(一) 靈長目、齧齒目、蝟形目及雙門齒目進行 4 個基因全長之複製

1. 針對較新鮮檢體進行基因全長之 PCR 複製

本研究中包括針對 Cytb、COI、16S rRNA 及 12S rRNA 基因，分別設計通用引子對，以應用於各物種之 PCR 複製。若檢體為較新鮮的組織(如肉類組織)，則直接使用可複製全長之引子組合進行複製得到較完整的序列。

本研究建立之基因全長 PCR 複製系統，包括 Cytb、COI、16S rRNA 及 12S rRNA 基因全長片段之複製，其複製範圍與引子資訊如圖六及表十所示，複製結果如圖七至圖十所示。Cytb、COI、16S rRNA 及 12S rRNA 在 47 個物種全部皆可被成功複製。圖七至圖十中檢體編號對應物種資訊如表十一所示。



圖六、全長及多重引子 PCR 複製使用全長引子與多重引子之相對位置示意圖。

表十、多重引子 PCR 複製中使用之通用引子(Cytb、COI 基因、16S rRNA 及 12S rRNA 基因)

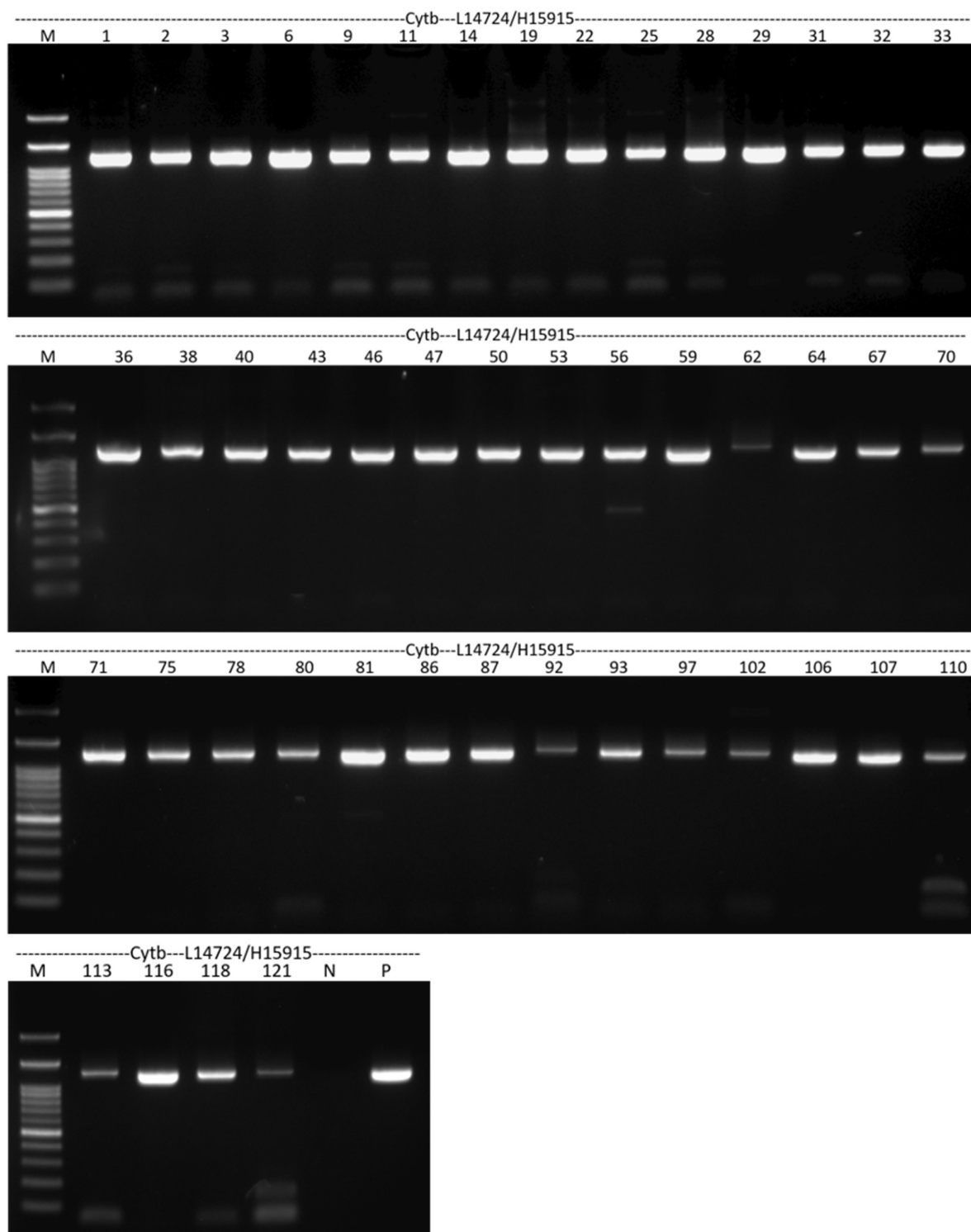
基因位	引子名稱	引子序列(5'-3')	黏合溫度(°C)	PCR 產物(bp)	反應濃度(μM)
Cytb	多重引子	L14724 (F 端) CGAAGCTTGATATGAAAAACCATCGTTG	58		0.5
		RA200(R 端) DATDGADGCTCCGTTTGCAT		308	0.4
		H15149(R 端) TAACTGTAGCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA		486	0.1
	全長	H15915(R 端) AACTGCAGTCATCTCCGGTTTACAAGAC	50	1246	0.5
COI (a)	多重引子	F1(F 端) RNHYTTAGTTAACAGCTAA	45		0.5
		RA300(R 端) GGDGCDCCDATTATHARNGG		485	0.45
		HCO2198D(R 端) TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA		947	0.05
	全長	R1(R 端) RGGTTCRANTCCTTCCTTT	47	1772	0.5
COI (b)	多重引子	LCO1490 GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	45		0.05
		RA300(R 端) GGDGCDCCDATTATHARNGG		246	
		HCO2198D(R 端) TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA		708	
	全長	R1(R 端) RGGTTCRANTCCTTCCTTT	47	1533	0.5
16S rRNA	多重引子	16-F2(F 端) CCGCCTGTTTACCAAAAACA	58		0.5
		16S-5r(R 端) TCCGAGGTCACCCCAACC		340	0.15
		16S-R(R 端) TGTCTGATCCAACATCGAG		516	0.35
	全長	F21-108(F 端) AAAGCAYYYRGYYTACRCCY	50		0.5
		R1548-108(R 端) YTCTKDTCCCTTCGTACTRG		1528	0.5
12S rRNA	多重引子	12S-UF(F 端) ATAAACGAAAGTTTGACTAAG	58		0.5
		12S-2(R 端) TAGAACAGGCTCCTCTAG		147	0.25
		12S-UR(R 端) GAGGGTGACGGGCGGTGTGT		431	0.25
	全長	F27-108(F 端) GYAYTGAAAATGCYTAGATG	50		0.5
		R1017-108(R 端) CCAAGYRCACYTTCCRGTA		991	0.5

*引子序列中鹼基之表示方式為依據 IUPAC 所提出之命名原則。

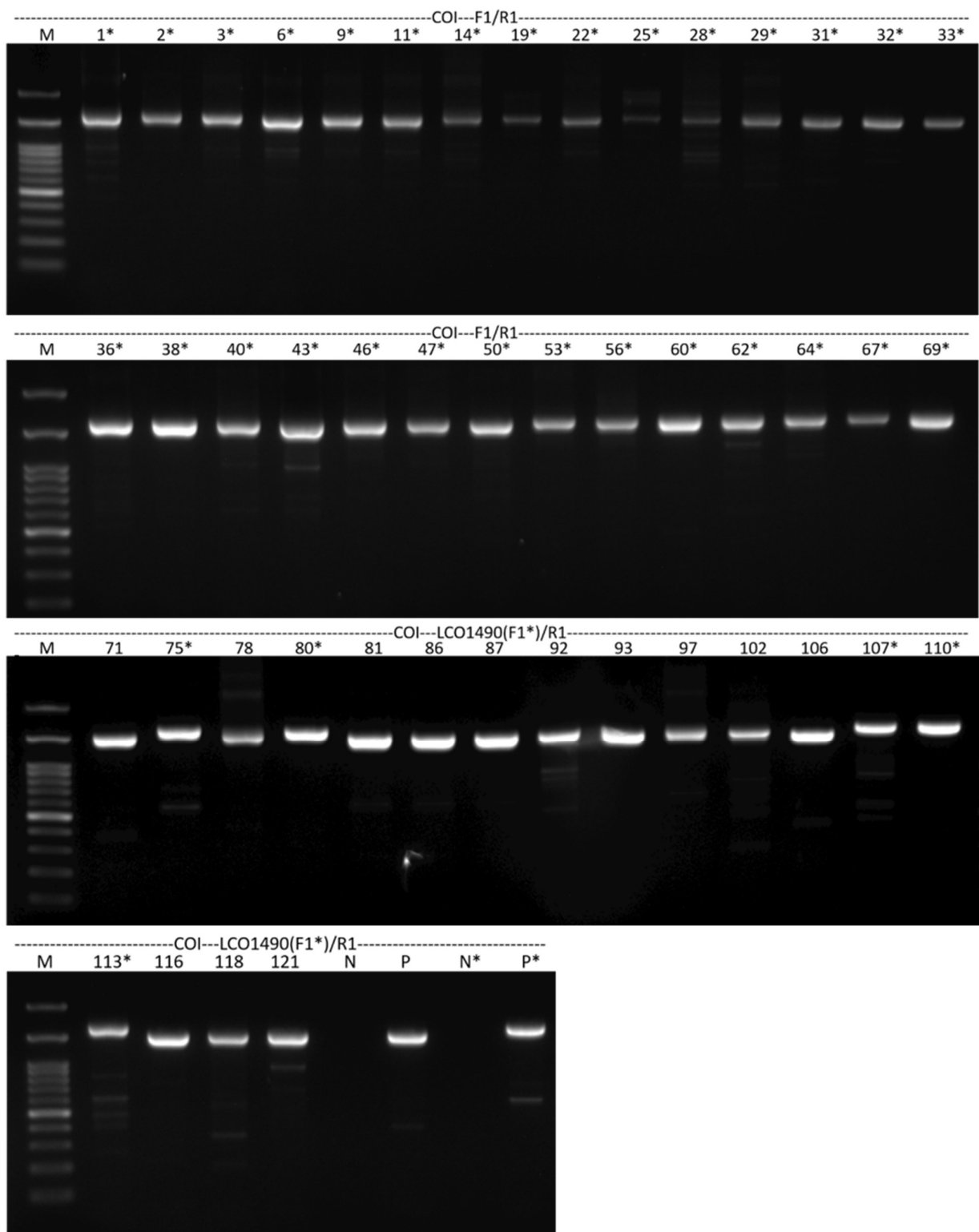
表十一、電泳圖中之檢體編號對應表

檢體編號	物種名稱	檢體編號	物種名稱
1	黑蜘蛛猴	59	環尾狐猴
2	黑掌蜘蛛猴	62	白頸狐猴
3	松鼠猴	64	小懶猴
6	黑冠松鼠猴	67	懶猴
9	阿氏夜猴	69(70)*	普特懶猴
11	馬來猴	71	冠豪豬
14	臺灣獼猴	75	馬來豪豬
19	彩面山魈	78	加拿大河狸
22	豬尾猴	80	絨鼠
25	紅猴	81	歐亞小鼯鼠
28	截尾猴(胭脂猴)	86	大赤鼯鼠
29	黑白疣猴	87	白面鼯鼠
30(31)*	粗尾侏儒狐猴	92	北美土撥鼠
32	平地金剛猩猩	93	赤腹松鼠
33	西部金剛猩猩	97	美洲巨水鼠
36	黑猩猩	102	天竺鼠
38	人猿	106	高山田鼠
40	大長臂猿	107	巢鼠
43	白手長臂猿	110	橙腰鼠
46	白頰黑長臂猿	113	白腹刺猬
47	灰長臂猿	116	灰袋鼠
50	金頰長臂猿	118	紅頸袋鼠
53	黑手長臂猿	121	無尾熊
56	褐狐猴		

*標示為相同物種之不同個體編號

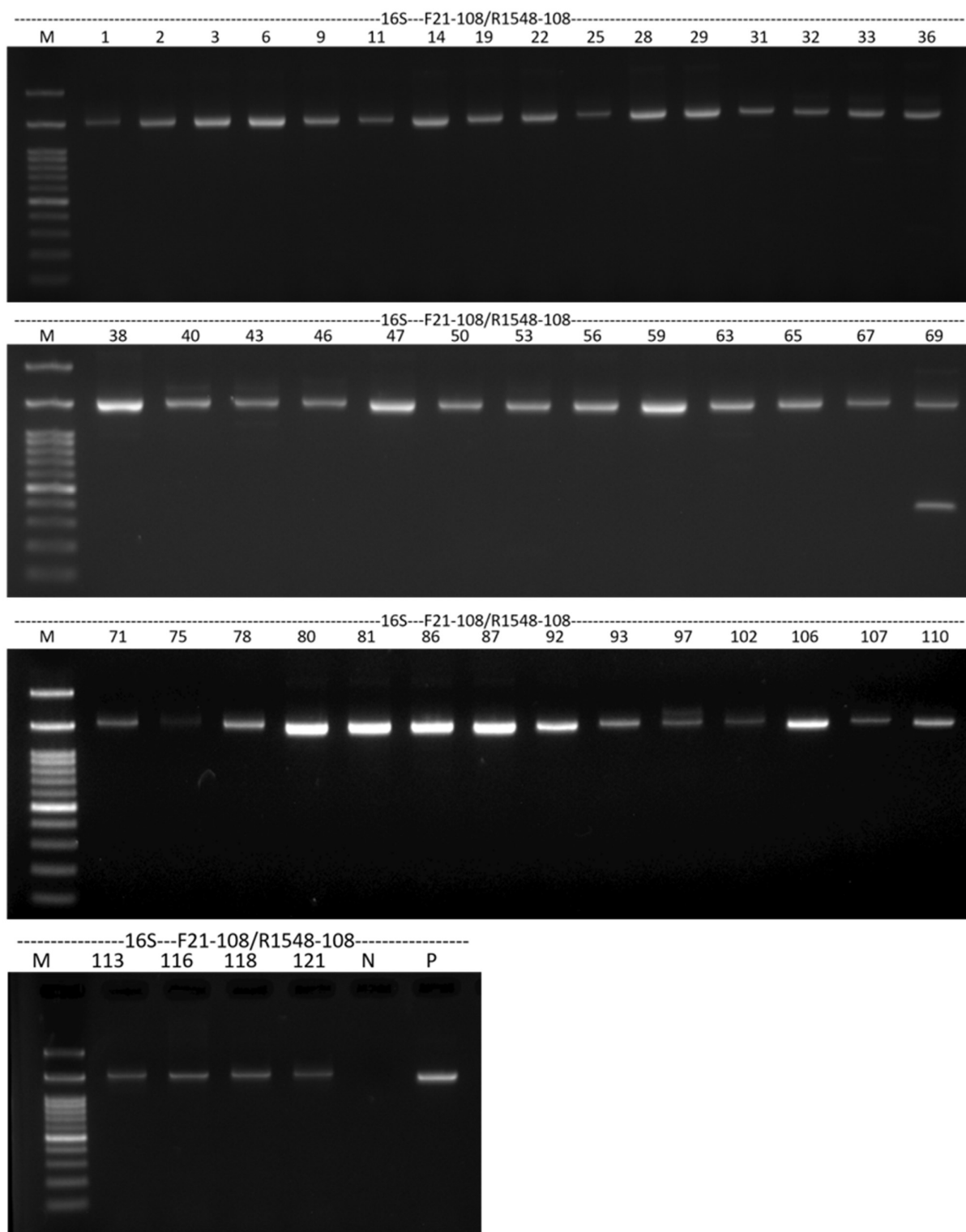


圖七、Cytb 基因全長複製之測試結果。

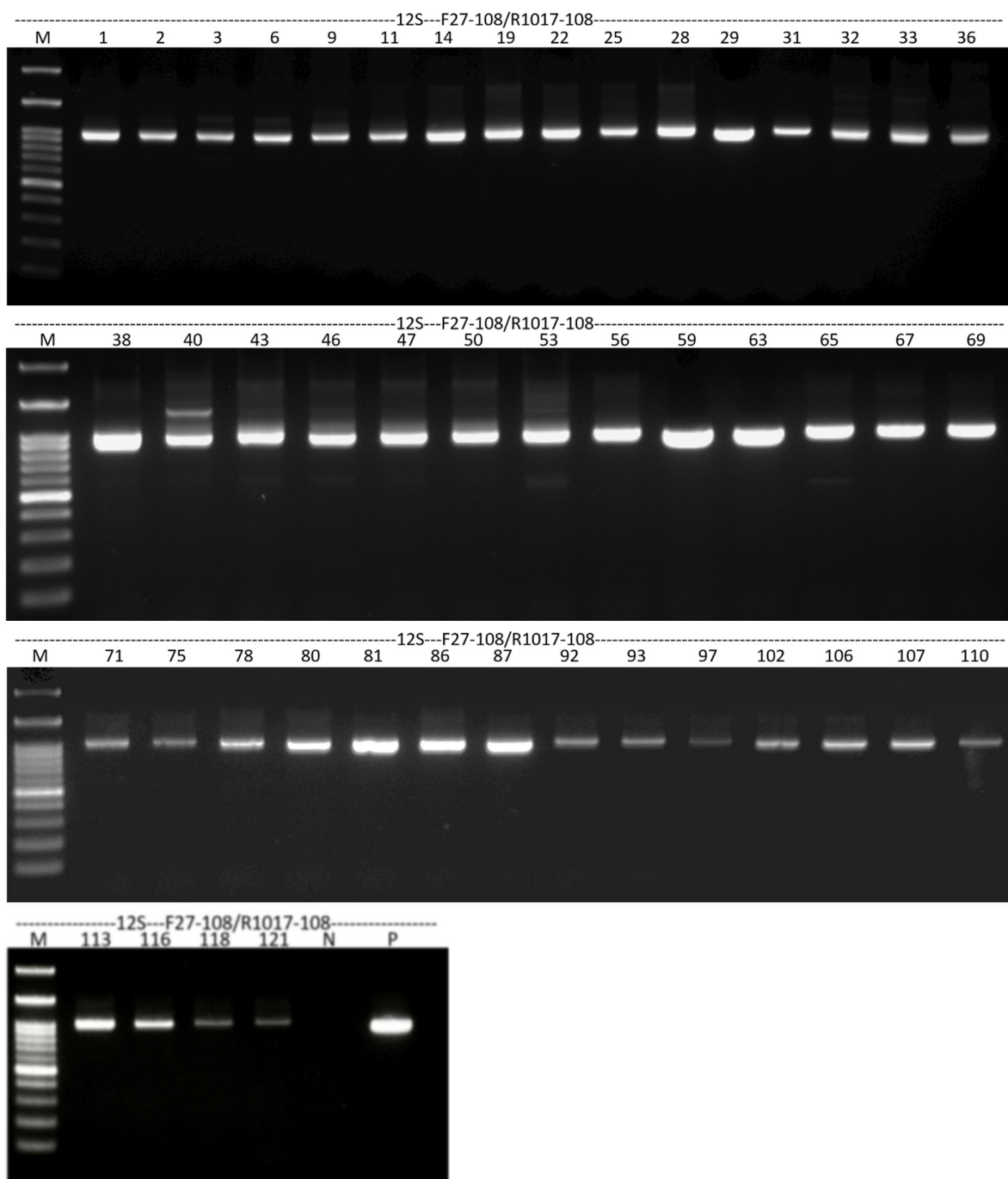


圖八、COI 基因全長複製之測試結果。

*為使用 COI(a)之引子對組合，其餘為 COI(b) 之引子對組合，如表十所示。



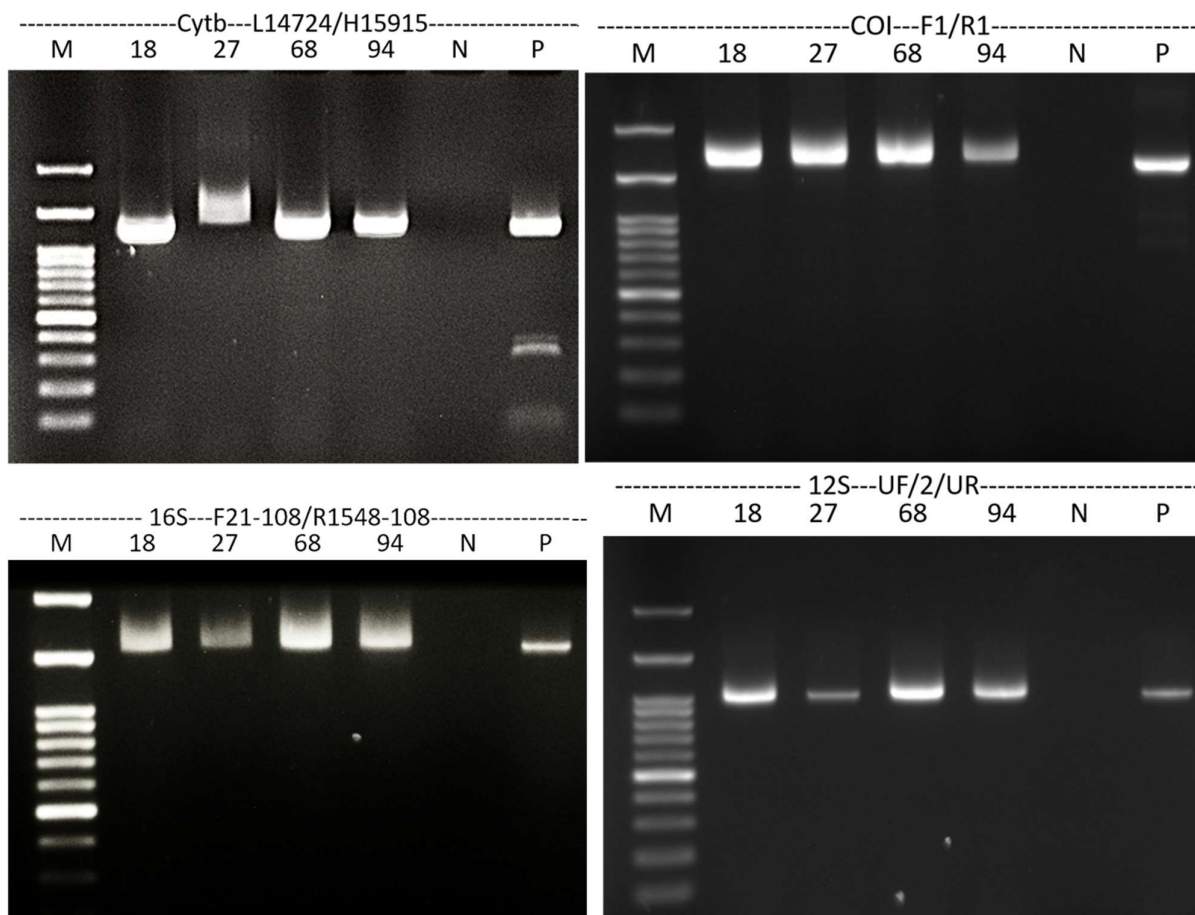
圖九、16S rRNA 基因全長複製之測試結果。



圖十、12S rRNA 基因全長複製之測試結果。

2.以直接 PCR 進行基因全長之 PCR 複製

依上述所建立之全長基因引子 PCR 複製系統，針對本研究中靈長目、齧齒目、蝟形目及雙門齒目所蒐集之組織以直接 PCR 技術進行系統測試，惟蝟形目及雙門齒目取得動物組織檢體困難而無法進行測試。以靈長目 2 個物種(編號 18 及編號 27)及齧齒目 2 個物種(編號 68 及編號 94)的動物組織進行系統之測試，Cytb、COI、16S rRNA 及 12S rRNA 全長片段複製之結果如圖十一所示，顯示此 4 個物種均可成功的以直接 PCR 技術獲得此四個基因全長之 PCR 產物。



圖十一、以直接 PCR 進行 Cytb、COI、16S rRNA 及 12S rRNA 基因全長複製之結果。

(二) 靈長目、齧齒目、蜆形目及雙門齒目於 4 個基因進行多重引子 PCR 之複製

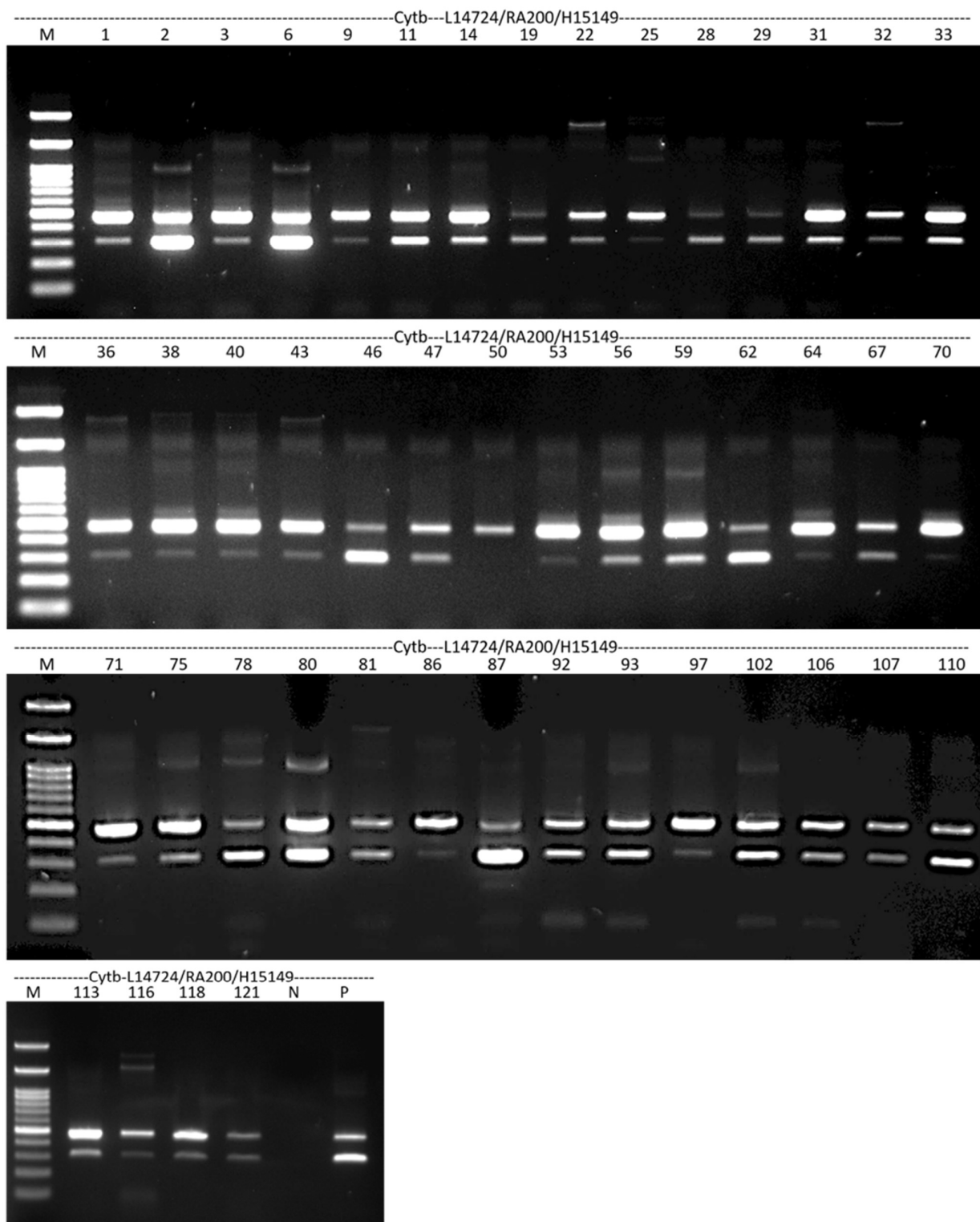
1. 適用於裂解檢體設計之多重引子 PCR 複製測試結果

本研究中針對 Cytb、COI、16S rRNA 及 12S rRNA 基因，分別設計通用引子，以應用於裂解較為嚴重檢體的多重引子 PCR 複製，可同時複製二段較短的基因片段。

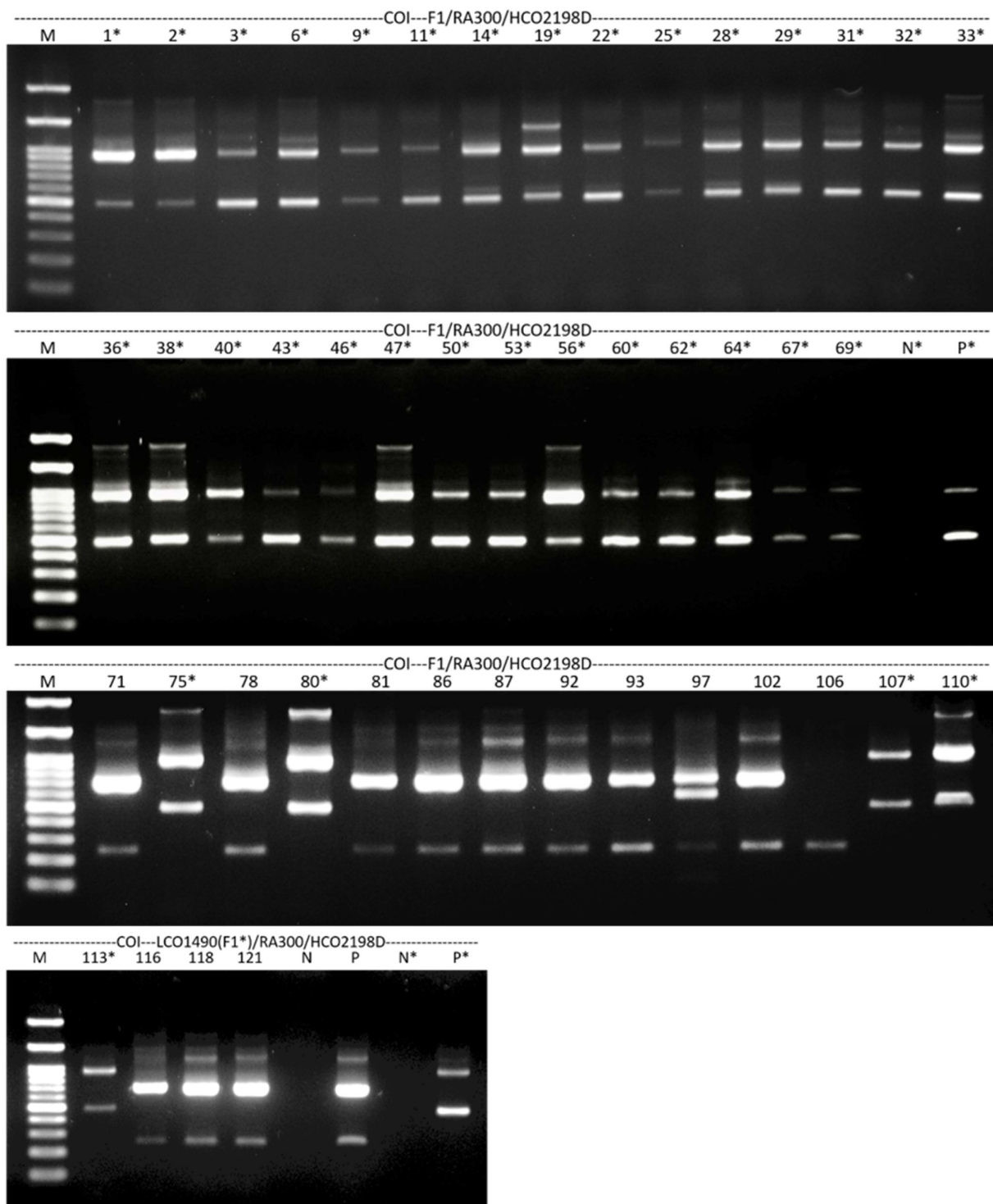
本研究建立之多重引子 PCR 複製系統，包括 Cytb、COI、16S rRNA 及 12S rRNA 基因多重片段之複製，其複製範圍與引子資訊如圖六及表十所示，其複製結果如圖十二至圖十六所示，其中 Cytb 基因之複製結果發現 47 個物種中僅有編號 50(金頰長臂猿)之短片段無法成功複製；在 COI 基因之複製結果發現編號 106(高山田鼠)之中片段無法成功複製；16S rRNA 及 12S rRNA 基因之複製結果發現 47 個物種皆可被成功複製；此四個基因的多重引子 PCR 在某些檢體其 PCR 複製會產生非特異性產物，研判可能為 PCR 循環次數過高或尚未調整至最佳反應條件所致。詳細物種對應資訊如表十一所示；PCR 複製成功率統計表如表十二所示。

表十二、本研究 47 個物種於 Cytb、COI、16S rRNA 及 12S rRNA 各不同長度片段複製之結果統計。

片段	Cytb	COI	16S rRNA	12S rRNA
長	47/47(100.00%)	47/47(100.00%)	47/47(100.00%)	47/47(100.00%)
中	47/47(100.00%)	46/47(97.87%)	47/47(100.00%)	47/47(100.00%)
短	46/47(97.87%)	47/47(100.00%)	47/47(100.00%)	47/47(100.00%)

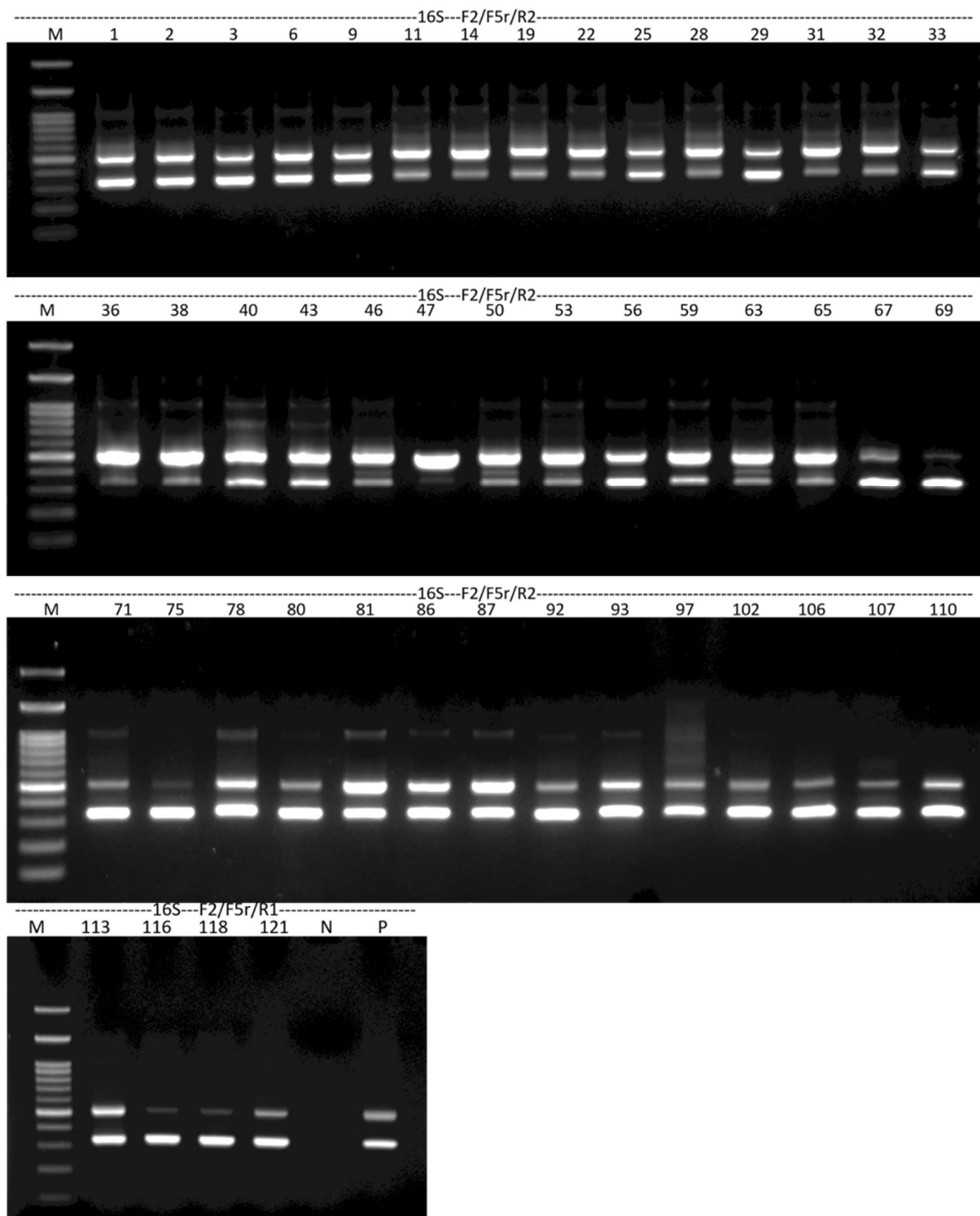


圖十二、多重引子 PCR 於 Cytb 基因之複製結果。

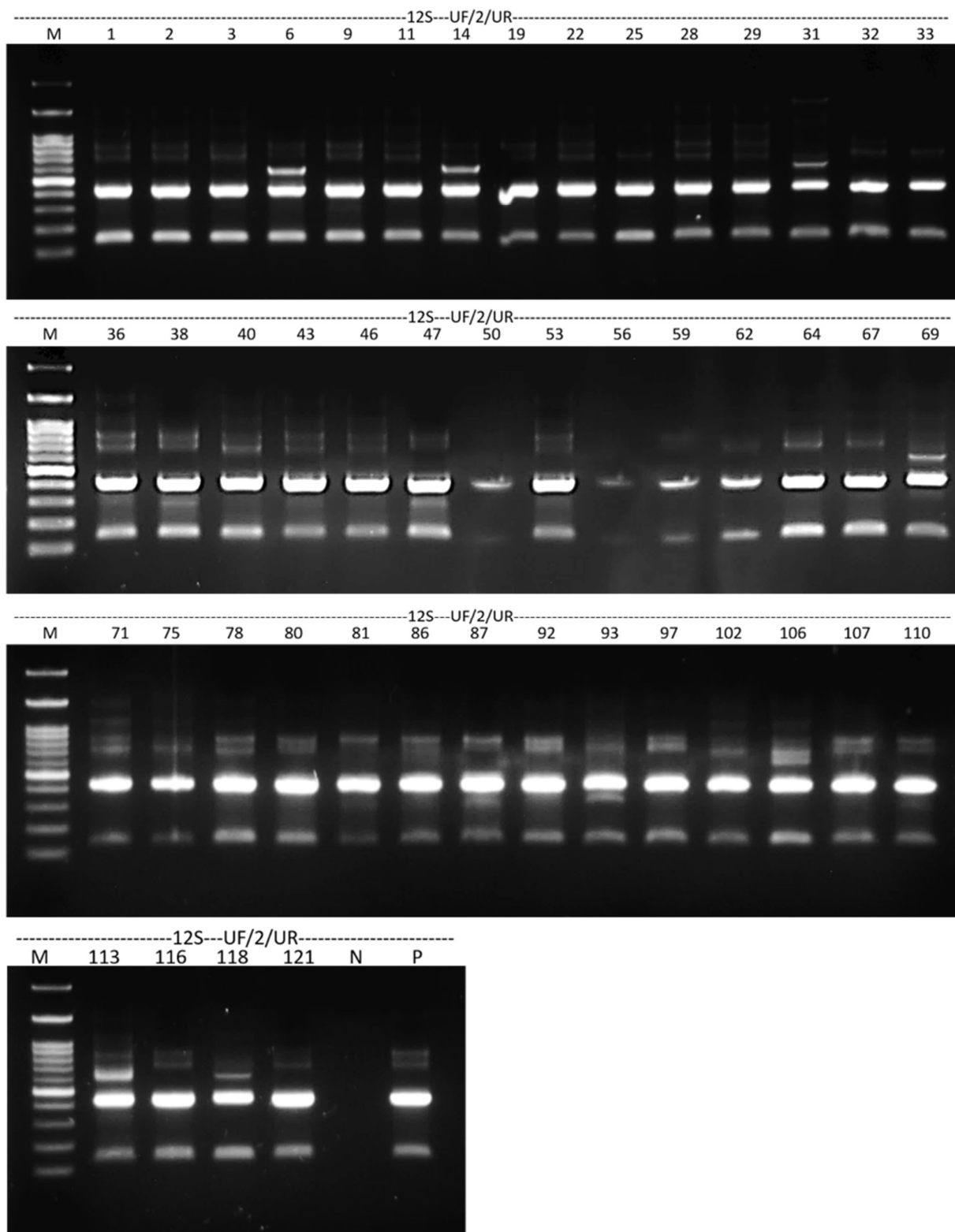


圖十三、多重引子 PCR 於 COI 基因之複製結果。

*為使用 COI(a)之引子對組合，其餘為 COI(b) 之引子對組合，如表十所示



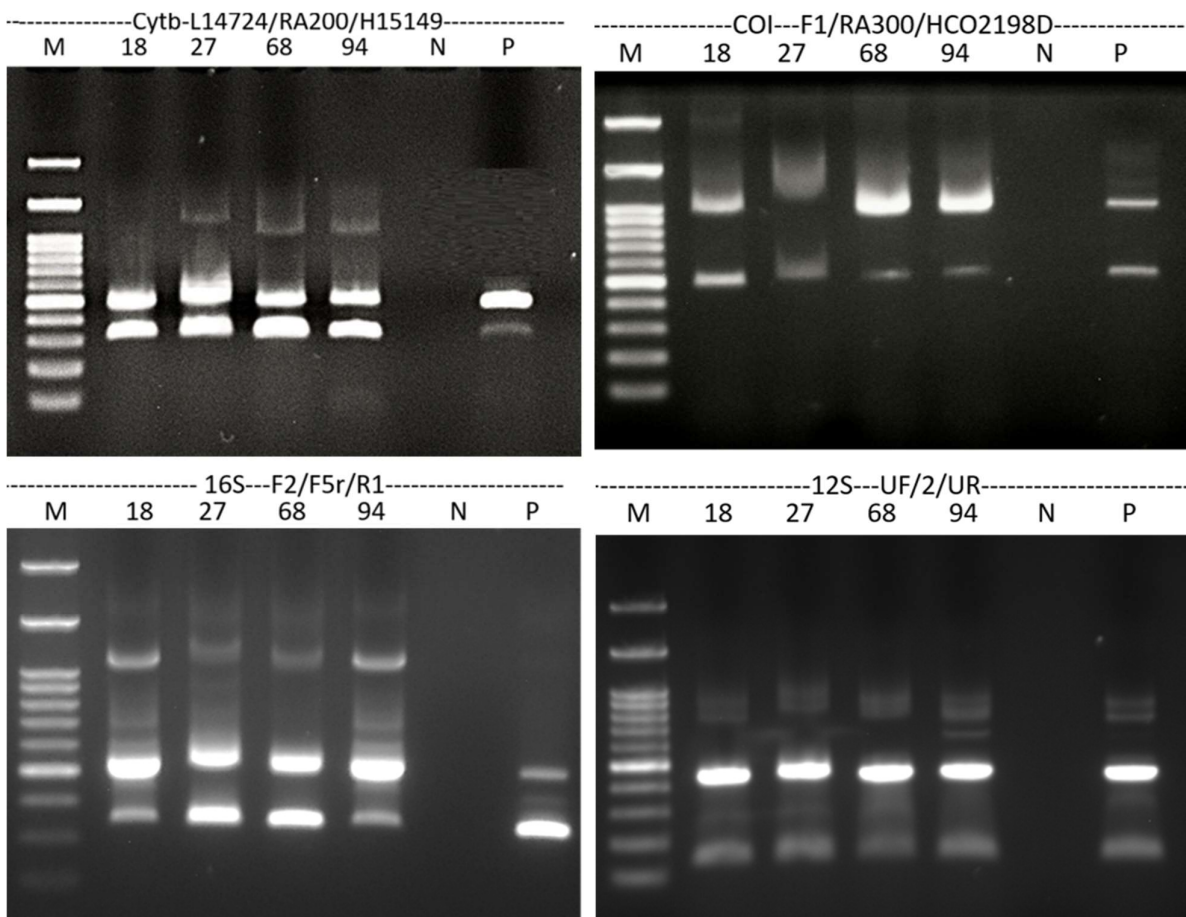
圖十四、多重引子 PCR 於 16S rRNA 基因之複製結果。



圖十五、多重引子 PCR 於 12S rRNA 基因之複製結果。

2. 直接 PCR 結合多重引子 PCR 技術進行之動物檢體之 PCR 複製

依上述所建立之多重引子 PCR 複製系統，針對本研究中所蒐集之靈長目、齧齒目、蝟形目及雙門齒目所蒐集之組織以直接 PCR 技術進行系統測試，惟蝟形目及雙門齒目取得動物組織檢體困難而無法進行測試。以靈長目 2 個物種(編號 18 及編號 27)及齧齒目 2 個物種(編號 68 及編號 94)的動物組織進行系統之測試，Cytb、COI、16S rRNA 及 12S rRNA 各片段複製之結果如圖十六所示，顯示此 4 個物種均可成功的以直接 PCR 技術獲得 PCR 產物，但需要留意會出現非特异性產物之情形，可能要減少 PCR 循環數或者是減少 DNA 模板之濃度。



圖十六、以直接 PCR 進行 Cytb、COI、16S rRNA 及 12S rRNA 基因多重片段複製之結果。

結論

本計畫中利用可複製粒線體 Cytb、COI、16S rRNA 及 12S rRNA 等基因之各種不同長度片段之引子對組合，應用於鑑定案中可視野生動物產製品之 DNA 品質，選擇複製各種不同長度之片段組合並加以定序，定序之結果與 GenBank 或本實驗室及國立臺灣大學醫學院法醫學研究所李俊億教授實驗室所建立之資料庫進行比對，並利用至少兩個不同基因之序列比對結果進行雙重確認，以增加種屬研判之準確性及可信度。本年度計畫中以此 PCR 複製策略及序列分析系統，並配合近年所建立之直接 PCR 系統，進行 2 件野生動物產製品鑑定案之鑑定，22 個檢體經 Cytb 及 COI 基因之序列分析，可成功鑑定種屬之野生動物產製品共計 18 個，這些檢體其中 17 個皆屬於 CITES 附錄或臺灣地區保育類野生動物之物種。

為節省鑑定所需時間及檢體量，本計畫中亦以直接 PCR 結合多重引子 PCR 技術，應用於靈長目、齧齒目、蜆形目及雙門齒目動物檢體鑑定系統建立之研究，並建立其標準操作流程，如附錄四所示

未來展望

本年度成功鑑定了 18 個野生動物產製品之種屬，未來希望能利用本實驗室與國立臺灣大學法醫學研究所李俊億教授實驗室所建立之粒線體 DNA 分析系統，配合本計畫中所得之研究成果，能夠持續協助各縣市政府、農政單位、警政單位及司法執行機關等所查扣之疑似野生動物產製品之種屬鑑定，以達到正確並快速鑑定其種屬或追查檢體來源之目標。此外，在直接 PCR 結合多重引子 PCR 技術建立哺乳類動物產製品種屬鑑定之標準操作流程方面，本年度中針對哺乳類動物中之靈長目、齧齒目、蝟形目及雙門齒目進行系統之建立。未來擬逐年建立臺灣野生動物粒線體基因組中 Cytb、COI、12S rRNA 及 16S rRNA 等四個基因之 DNA 序列資料庫，並將這些物種序列登錄於臺灣野生動物遺傳物質冷凍儲存庫及 GenBank 中，未來將可提供其他實驗室進行台灣動物種屬鑑定、系統分類、生態、演化及族群遺傳相關研究之參考，以達到與全球學者共享 DNA 資料庫之目的。

參考文獻

1. 陳佳萱、楊琇雅、顏念慈、朱賢斌、陳坤照、吳明哲及黃木秋。豬種的粒線體細胞色素 b 基因序列鑑定及親緣關係。中畜會誌(增刊)。2006。4(1): 101-107.
2. 楊超、汪青雄、黃原及肖紅。利用線粒體 Cytb 基因全序列探討部分鷗類的系統發育關係。動物分類學報。2013。38(2): 225-238.
3. RL. Gundry, MW. Allard, TR. Moretti, RL. Honeycutt, MR. Wilson, KL. Monson and DR. Foran. Mitochondrial DNA analysis of the domestic dog: control region variation within and among breeds. 2013 Journal of Forensic Science. 2007. 52(3): 562-572.
4. 梁宏彥及蕭聖代。臺灣產八種梭子蟹類粒線體 DNA 中 COI 及 16S rRNA 之類緣關係研究。水產研究。2008。16(2): 29-39.
5. 鄭濤、費榮梅及吳孝兵。從 12S rRNA 和 Cytb 基因部分序列研究 13 種貓科動物的分子系統關係。動物學報。2005。51(4): 630-639.
6. 姚維、劉楚吾及劉麗。基於粒線體 COI 及 Cytb 基因的 7 種龍蝦類分子系統關係。基因組學與應用生物學。2012。31(5): 473-480.
7. 秦峰、付文博及周善義。基於 COI 和 Cytb 基因序列的鳳蝶科六屬分子系統學研究。昆蟲學報。2011。54(3): 339-351.
8. 許麗、郝家勝、朱國萍、殷先兵、潘鴻春、黃敦元及張小平。基於粒線體 COI 及 Cytb 基因的粉蝶亞科及黃粉蝶亞科(粉蝶科)部分類群的分子系統發生。動物分類學報。2007。32(4): 842-850.
9. C. Ames, B. Turner and B. Daniel. The use of mitochondrial cytochrome oxidase I gene(COI) to differentiate two UK blowfly species —Calliphora vicina and Calliphora vomitoria. Forensic Science International. 2006, 164(2-3): 179-182.
10. 劉連為、許強華及陳新軍。基於粒線體 COI 和 Cytb 基因序列的北太平洋柔魚種群遺傳結構研究。水產學報。2012。36(11): 1675-1684.
11. 於俊琦、伍錦姑、周志明、曾國權、單樂州及劉偉成。基於線粒體 12S rRNA 基因部分序列的 6 種浙南海域舌鰷屬魚類系統進化研究。科技通報。2012。28(3): 43-48.
12. 吳文珊、陳友鈴、孫伶俐、毛建萍、楊問新及王愛芳。基於 28S、COI 和 Cytb 基因序列

- 的薜荔和愛玉子傳粉小蜂分子遺傳關係研究。生態學報。2013。33(19): 6049-6057.
13. 李莉好、喻達輝、黃桂菊、郭奕惠、梁沛文、江世貴及賈曉平。三種海豚線粒體 COI 基因的序列分析。動物學雜誌。2007。42(3): 20-27.
 14. 李莉好、郭奕惠、黃桂菊、江世貴、賈曉平及喻達輝。瓶鼻海豚、中華白海豚和糙齒海豚線粒體 16S rRNA 基因的序列分析。南方水產。2007。3(4): 38-45.
 15. 洪東奇、賴淑雅、黃獻文、梁佑全及歐柏榮。臺灣長鬃山羊個體間粒線體 DNA 之 12S rRNA 及 Cytochrome b 序列分析比較。特有生物研究。2001。3: 37-48.
 16. 劉夢俠、王麗娟、孔令怡、劉洪軍、吳志昊、辛夢嬌、張偉及尤鋒。榮成灣孔鰻群體線粒體 DNA Cytb 部分序列的遺傳多樣性分析。海洋科學。2012。10: 85-92.
 17. Y. Ma, ZQ. Yue, YR. Zhao, CG. Liang, B. Xu and DF. Wang. The Sequence Analysis of Mitochondrial Cytochrome b Gene and Identification of *Trachidermus fasciatus* Heckel. Biotechnology Bulletin. 2012, 8: 119-124.
 18. YF. Lu, ZH. Cai, Q. Li, Y. Zhang, Q. Zhang and Y. Zhang. Genetic Variation and Phylogeny of Jianghuai Buffalo Based on Mitochondrial DNA D-loop and Cytb Gene. Acta Veterinaria et Zootchnica Sinica. 2012, 43(5): 701-707.
 19. 徐龍鑫、楊勝林、李愛萍、乜玉麗、楊海兵及戴焰。中國矮馬群體 mtDNA Cytb 基因遺傳多樣性及系統進化研究。中國農業科學。2013。46(3): 623-629.
 20. 楊慧榮、劉麗、龔世園、趙會宏、孫際佳及陳彥珍。利用 CR 和 Cytb 基因序列組合評價珠江和長江水系赤眼鱒的遺傳多樣性。華中農業大學學報。2013。32(4): 84-91.
 21. H. Somura, H. Hori, and Y. Manome. Sequence Analysis of Mitochondrial DNAs of 12S rRNA, 16S rRNA, and Cytochrome Oxidase Subunit 1(COI) Regions in Slow Lorises (Genus *Nycticebus*) May Contribute to Improved Identification of Confiscated Specimens. ISRN Zoology. 2012, Article ID 498731, 8.
 22. 馬牧、祝茜、李響、孫玉苗、劉瑩瑩、劉亞楠及陶翠花。利用 Cytb 基因由未知鯨骨鑑定出大村鯨。獸類學報。2007。27(03): 288-292.
 23. NV. Morf, KL. Wood, R. Köppel, N. Felderer, M. Daniels, B. Tenger, A. Kratzer. A multiplex PCR method to identify bushmeat species in wildlife forensics. Forensic Science International. 2013, 4(1): 202-203

24. A. Cutarelli, MG. Amoroso, AD. Roma, S. Girardi, G. Galiero, A. Guarino, F. Corrado. Federica Corrado Italian market fish species identification and commercial frauds revealing by DNA sequencing. *Food Control*. 2014, 37(1): 46-50.
25. DS. In, ES. Choi, JD. Yoon, JH. Kim, JI. Min, SG. Baek, MH. Jang. Cytochrome oxidase subunit I (COI) DNA sequence divergence between two cryptic species of *Oryzias* in South Korea. *Journal of Ecology & Environment*. 2013, 36(3): 159-166.
26. N. Rajput, AB. Shrivastav, SNS. Parmar, R. Ranjan, S. Singh and E. Joseph. Characterization of 12S rRNA gene for meat identification of common wild and domestic small herbivores as an aid to wildlife forensic. *Original Research*. 2013, 6(5): 254-259.
27. A. Pesarakloo, E. Rastegar-Pouyani, N. Rastegar-Pouyani, H. Kami, M. Najibzadeh, A. Khosravani, H. Oraie. The first taxonomic reevaluation of the Iranian water frogs of the genus *Pelophylax* (Anura: Ranidae) using sequences of the mitochondrial genome. *Mitochondrial DNA*. 2016, 5:1-7.
28. T. Kitpipit, P. Thanakiatkrai, K. Penchart, K. Ouithavon, C. Satasook, A. Linacre. Ivory species identification using electrophoresis-based techniques. *Electrophoresis*. 2016, 37(23-24):3068-3075.
29. Y. Muangkram, W. Wajjwalku, A. Amano, M. Sukmak. The novel primers for mammal species identification-based mitochondrial cytochrome b sequence: implication for reserved wild animals in Thailand and endangered mammal species in Southeast Asia. *Mitochondrial DNA Part A*. 2016, 1-11
30. Vipin, V. Sharma, CP. Sharma, VP. Kumar, SP. Goyal. Pioneer identification of fake tiger claws using morphometric and DNA-based analysis in wildlife forensics in India. *Forensic Science International*. 2016, 266:226-233.
31. G. Khedkar, SB. Abhayankar, D. Nalage, SN. Ahmed, CD. Khedkar. DNA barcode based wildlife forensics for resolving the origin of claw samples using a novel primer cocktail. *Mitochondrial DNA*. 2014, 1-4.
32. S.Verheij, J. Harteveld, T. Sijen. A protocol for direct and rapid multiplex PCR amplification on forensically relevant samples. *Forensic Science International: Genetics*. 2012, 6(2): 167-175.

33. YC. Swaran, L. Welch. A comparison between direct PCR and extraction to generate DNA profiles from samples retrieved from various substrates. *Forensic Science International: Genetics*. 2012, 6(3):407-412.
34. A. Linacre, V. Pekarek, YC. Swaran, SS. Tobe. Generation of DNA profiles from fabrics without DNA extraction. *Forensic Science International: Genetics*. 2010, 4(2):137-141.
35. J. Tie, S. Unchigasaki. Detection of short tandem repeat polymorphisms from human nails using direct polymerase chain reaction method. *Electrophoresis*. 2014, 35(21-22):3188-3192.
36. R. Ottens, D. Taylor, A. Linacre. DNA profiles from fingernails using direct PCR. *Forensic science, Medicine, and Pathology*. 2015, 11(1):99-103.
37. T. Kitpipit, K. Sittichan, P. Thanakiatkrai. Are these food products fraudulent? Rapid and novel triplex-direct PCR assay for meat identification. *Forensic Science International*. 2013, 4(1): e33–e34.
38. T. Kitpipit, K. Sittichan, P. Thanakiatkrai. Direct-multiplex PCR assay for meat species identification in food products. *Food chemistry*. 2014, 15;163:77-82.
39. T. Kitpipit, W. Chotigeat, A. Linacre, P. Thanakiatkrai. DNA analysis using economical two-step direct PCR. *Forensic science, medicine, and pathology*. 2014, 10:29–38
40. SS. Tobe, YC. Swaran, L. Dennany, U. Sibbing, KS. Johann, L. Welch, M. Vennemann. A proof of principal study on the use of direct PCR of semen and spermatozoa and development of a differential isolation protocol for use in cases of alleged sexual assault. *International journal of legal medicine*. 2017, 131(1):87-94
41. A. Sorensen, C. Berry, D. Bruce, ME. Gahan, S. Hughes-Stamm, D. McNevin. Direct to PCR tissue preservation for DNA profiling. *International journal of legal medicine*. 2016, 130(3):607-13.
42. JE. Templeton, D. Taylor, O. Handt, P. Skuza, A. Linacre. Direct PCR Improves the Recovery of DNA from Various Substrates. *Journal of Forensic Sciences*. 2015, 60(6):1558-1562.
43. R. Blackie, D. Taylor, A. Linacre. Successful direct amplification of nuclear markers from single dog hairs using DogFiler multiplex. *Electrophoresis*. 2015, 36(17):2082-2085.
44. SE. Cavanaugh, AS. Bathrick. Direct PCR amplification of forensic touch and other challenging

- DNA samples: A review. *Forensic Science International: Genetics*. 2018, 32:40-49.
45. RA. Gibbs, PN. Nguyen, A. Edwards, AB. Civitello, CT. Caskey. Multiplex DNA deletion detection and exon sequencing of the hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene in Lesch-Nyhan families. *Genomics*. 1990, 7(2):235-244.
 46. AK. Bej, MH. Mahbubani, R. Miller, JL. DiCesare, L. Haff, RM. Atlas. Multiplex PCR amplification and immobilized capture probes for detection of bacterial pathogens and indicators in water. *Molecular and Cellular Probes*. 1990, 4(5):353-365.
 47. T. Wei, F. Liao, Y. Wang, C. Pan, C. Xiao, D. Huang. A novel multiplex assay of SNP-STR markers for forensic purpose. *PLoS One*. 2018; 13(7):e0200700.
 48. N. Ishida, M. Sakurada, H. Kusunoki, Y. Ueno. Development of a simultaneous identification method for 13 animal species using two multiplex real-time PCR assays and melting curve analysis. *Leg Med (Tokyo)*. 2018; 30:64-71.
 49. M. Alikord, J. Keramat, M. Kadivar, H. Momtaz, MN. Eshtiaghi, A. Homayouni-Rad. Multiplex-PCR as a rapid and sensitive method for identification of meat species in halal-meat products. *Recent Patents Food Nutrition Agriculture*. 2017; 8(3):175-182.
 50. W. Yan. Multiplex PCR primer design for simultaneous detection of multiple pathogens. *Methods in Molecular Biology*. 2015; 1275:91-101.
 51. HM. Hsieh, LH. Huang, LC. Tsai, HH. Meng, YC. Kuo, A. Linacre, JCI. Lee. Species identification of rhinoceros horns using the cytochrome b gene. *Forensic Sci Int Forensic Science International*. 2003, 136(1-3): 1-11.
 52. HM. Hsieh, LH. Huang, LC. Tsai, CL. Liu, YC. Kuo, CT. Hsiao, A. Linacre, JCI. Lee. Species Identification of *Kachuga tecta*. Using the Cytochrome b Gene. *Journal of Forensic Science*. 2006, 51(1): 52-56.
 53. HM. Hsieh, SP. Liao, CT. Hsiao, LH. Huang, YC. Kuo, ACY. Lin, JCI. Lee, LC. Tsai. Species identification of fragmented turtle shells by cytochrome b gene. *Forensic Science Journal*. 2008, 7(1): 45-47.
 54. JCI. Lee, LC. Tsai, SP. Liao, A. Linacre, HM. Hsieh. Species identification using the cytochrome b gene of commercial turtle shells. *Forensic Science International: Genetics*. 2009, 3(2): 67-73.

55. JCI. Lee, LC. Tsai, CY. Yang, CL. Liu, LH. Huang, A. Linacre, HM. Hsieh. DNA profiling of shahtoosh. *Electrophoresis*. 2006, 27(17): 3359-3362.
56. JCI. Lee, HM. Hsieh, LH. Huang, YC. Kuo, JH. Wu, SC. Chin, AH. Lee, A. Linacre, LC. Tsai. Ivory identification by DNA profiling of cytochrome b gene. *International Journal of Legal Medicine*. 2009, 123(2): 117-121.
57. HM. Hsieh, JCI. Lee, JH. Wu, CA. Chen, YJ. Chen, GB. Wang, SC. Chin, LC. Wang, A. Linacre, LC. Tsai. Establishing the pangolin mitochondrial D-loop sequences from the confiscated scales. *Forensic Science International: Genetics*. 2011, 5(4): 303-307.
58. HM. Hsieh, HL. Chiang, LC. Tsai, SY. Lai, NE. Huang, A. Linacre and JCI. Lee. Cytochrome b gene for species identification of the conservation animals. *Forensic Science International*. 2001, 122(1):7-18.
59. HM. Hsieh, CC. Tsai, LC. Tsai, HL. Chiang, NE. Huang, RTP. Shih, A Linacre, JCI Lee. Species identification of meat products using the cytochrome b gene. *Forensic Science Journal*. 2005, 4(1): 29-36.
60. LC. Tsai, MT. Huang, CT. Hsiao, ACY. Lin, SJ. Chen, JCI. Lee, HM. Hsieh. Species identification of animal specimens by cytochrome b gene. *Forensic Science Journal*. 2007, 6(1): 63-65.
61. JCI. Lee, LC. Tsai, YY. Kuan, WH. Chien, KT. Chang, CH. Wu, A. Linacre, HM. Hsieh. Racing pigeon identification using STR and chromo-helicase DNA binding gene markers. *Electrophoresis*. 2007, 28(23): 4274- 4281.
62. LC. Tsai, JCI. Lee, SP. Liao, LH. Weng, A. Linacre, HM. Hsieh. Establishing the mtDNA D-loop structure of *Columba livia*. *Electrophoresis*. 2009, 30(17): 3058-3062.
63. JCI. Lee, LC. Tsai, SP. Liao, A. Linacre, HM. Hsieh. Evaluation of the polymorphic D-loop of *Columba livia* in forensic applications. *Electrophoresis*. 2010, 31(23-24): 3889-3894.
64. JCI. Lee, LC. Tsai, MT. Huang, JA. Jhuang, CT. Yao, SC. Chin, LC. Wang, A. Linacre, HM. Hsieh. A novel strategy for avian species identification by cytochrome b gene. *Electrophoresis*. 2008, 29(11): 2413-2418.

65. JCI. Lee, LC. Tsai, PY. Hwa, CL. Chan, A. Huang, SC. Chin, LC. Wang, JT. Lin, A. Linacre, HM. Hsieh. A novel strategy for avian species and gender identification using the CHD gene. *Molecular and Cellular Probes*. 2010, 24(1): 27-31.
66. HM. Hsieh, JCI. Lee, YL. Yang, YN. Chen, LC. Tsai. Species identification of the suspected bear palms by the genes of cytb and COI. *Forensic Science Journal*. 2017, 16(1), 13-20.
67. LC. Tsai, JCI. Lee, LL. Shen, HM. Hsieh. Identification of the seized meat products for suspected Cetacea. *Forensic Science Journal*. 2013, 12(1), 9-14.
68. Li Yang, Zongqing Tan , Daren Wang , Ling Xue, Min-xin Guan , Taosheng Huang & Ronghua Li. Species identification through mitochondrial rRNA genetic analysis. *Scientific Reports*. 2014. 13;4:4089.

附錄一、木柵動物園DNA採樣檢體資訊

序號	樣本編號	中文俗名	性別	呼名	保育類利用核准文號
1	20190118D20	黑蜘蛛猴	母	黑妞	農授林務字第1061700466號
2	20090215D10	黑掌蜘蛛猴	母	C1379(Mako)	農授林務字第0980108575號
3	20100672D10	松鼠猴	公	43一梔子	農授林務字第0991603072號
4	20100671D10	松鼠猴	公	A08#20010820	農授林務字第0991603072號
5	20080141D10	松鼠猴	母	A12#20070803	農授林務字第0970110626號
6	20191297D10	黑冠松鼠猴	母	黑松#5 (D1946)	農授林務字第1061700466號
7	20191287D10	黑冠松鼠猴	母	黑松#6 (D1947)	農授林務字第1061700466號
8	20191288D10	黑冠松鼠猴	母	黑松#7 (D1948)	農授林務字第1061700466號
9	20140468D10	阿氏夜猴	母	阿三(小君)	農授林務字第1031700533號
10	20140443D10	阿氏夜猴	公	阿五	農授林務字第1031700533號
11	20180207D10	馬來猴	公	羅賓	農授林務字第1061700466號
12	20130423D10	馬來猴	公	20130317	農授林務字第1021610837號
13	20130422D10	馬來猴	母	五月花	農授林務字第1021610837號
14	20180355D10	臺灣獼猴	公	1070831動保	農授林務字第1061700466號
15	20180200D10	臺灣獼猴	公	1070624園內	農授林務字第1061700466號
16	20180199D10	臺灣獼猴	母	D1860	農授林務字第1061700466號
17	20180133D10	臺灣獼猴	母	D1838水蜜桃	農授林務字第1061700466號
18*	20191354M40	臺灣獼猴	母	大屁(A55)	非保育類
19	20080576D10	彩面山魈	公	彩祥	農授林務字第0970110626號
20	20070617D10	彩面山魈	母	彩華	農授林務字第0961701136號
21	20040096D10	彩面山魈	公	彩暉	農授林務字第0961701136號
22	20050132D10	豬尾猴	公	湯姆	農授林務字第0961701136號
23	20050131D10	豬尾猴	公	朱菲	農授林務字第0961701136號
24	20050130D10	豬尾猴	母	朱莉	農授林務字第0961701136號
25	20190558D20	紅猴	母	D1873	農授林務字第1061700466號
26	20191380D40	紅猴	母	梅男	農授林務字第1061700466號
27*	20191381M50	紅猴	母	梅男	農授林務字第1061700466號
28	20100567D10	截尾猴	公	紅面	農授林務字第0991603072號
29	20040101D10	黑白疣猴	公	疣憲	農授林務字第0961701136號
30	20120306D10	粗尾侏儒狐猴	母	#29	農授林務字第1011700515號
31	20180345D10	粗尾侏儒狐猴	母	#56	農授林務字第1061700466號
32	20050388D10	平地金剛猩猩	公	寶寶	農授林務字第0961701136號
33	20110058D10	西部金剛猩猩	公	黑皮	農授林務字第1000116384號
34	20191338D10	西部金剛猩猩	母	Tayari	農授林務字第1061700466號

35	20191339D10	西部金剛猩猩	母	Iriki	農授林務字第1061700466號
36	20190348D10	黑猩猩	母	咪覺	農授林務字第1061700466號
37	20140077D10	黑猩猩	公	娃昊	農授林務字第1031700533號
38	20100217D10	人猿	母	20100423	農授林務字第0991603072號
39	20150016D10	人猿	公	乙森Eason	農授林務字第1041700584號
40	20060391D10	大長臂猿	母	大芳	農授林務字第0961701136號
41	20060392D10	大長臂猿	母	大莉	農授林務字第0961701136號
42	20090522D10	大長臂猿	公	大樹	農授林務字第0980108575號
43	20090364D10	白手長臂猿	公	C1110	農授林務字第0980108575號
44	20040083D10	白手長臂猿	公	久久	農授林務字第0961701136號
45	20100654D10	白手長臂猿	母	文旦	農授林務字第0991603072號
46	20040186D10	白頰黑長臂猿	公	Happy	農授林務字第0961701136號
47	20090308D10	灰長臂猿	公	張大千紀念館	農授林務字第0980108575號
48	20070128D10	灰長臂猿	母	春花之子	農授林務字第0961701136號
49	20040290D10	灰長臂猿	母	春花	農授林務字第0961701136號
50	20050487D10	金頰長臂猿	公	冠倫(小名阿諾)	農授林務字第0961701136號
51	20050486D10	金頰長臂猿	母	冠美(小名佳佳)	農授林務字第0961701136號
52	20040289D10	金頰長臂猿	公	C874	農授林務字第0961701136號
53	20050292D10	黑手長臂猿	母	LISA	農授林務字第0961701136號
54	20050293D10	黑手長臂猿	公	Michael	農授林務字第0961701136號
55	20060466D10	黑手長臂猿	公	DaDy	農授林務字第0961701136號
56	20190894D10	褐狐猴	公	蘭生	農授林務字第1061700466號
57	20170274D10	褐狐猴	母	妮樂	農授林務字第1061700466號
58	20150417D10	褐狐猴	公	菊子	農授林務字第1041700584號
59	20190856D20	環尾狐猴	母	瑩芝	農授林務字第1061700466號
60	20100358D10	環尾狐猴	公	環言	農授林務字第0991603072號
61	20100062D10	環尾狐猴	公	陸帥	農授林務字第0991603072號
62	20140067D10	白頸狐猴	母	依語	農授林務字第1031700533號
63	20140066D10	白頸狐猴	公	依倫	農授林務字第1031700533號
64	20170126D10	小懶猴	母	#41	農授林務字第1061700466號
65	20150142D10	小懶猴	公	#43	農授林務字第1041700584號
66	20170125D10	小懶猴	公	#40	農授林務字第1061700466號
67	20070441D10	懶猴	公	#14	農授林務字第0961701136號
68*	20170347M60	懶猴	公	#14	農授林務字第1061700466號
69	20060390D10	普特懶猴	公	#1	農授林務字第0961701136號
70	20040140D10	普特懶猴	公	#6	農授林務字第0961701136號
71	20090026D10	冠豪豬	公	#1	非保育類

72	20070817D10	冠豪豬	母	#2	非保育類
73	20090549D10	馬來豪豬	母	#1-豪豪	非保育類
74	20090550D10	馬來豪豬	公	大公	非保育類
75	20090551D10	馬來豪豬	公	小公	非保育類
76	20120164D10	加拿大河狸	母	岡市	非保育類
77	20180359D10	加拿大河狸	母	羅娜2018仔1	非保育類
78	20140329D10	加拿大河狸	公	娜涼	非保育類
79	20190860D10	絨鼠	公	20140116#2	農授林務字第1061700466號
80	20170360D10	絨鼠	公	20171012#2	農授林務字第1061700466號
81	20070031D10	歐亞小鼯鼠	母	#9	非保育類
82	20060055D10	歐亞小鼯鼠	公	#8	非保育類
83	20050509D10	歐亞小鼯鼠	公	#4	非保育類
84	20180360D10	大赤鼯鼠	公	卡卡西 (D1836)	非保育類
85	20100418D10	大赤鼯鼠	母	Wendy	非保育類
86	20140142D10	大赤鼯鼠	公	1030326園內	非保育類
87	20180087D10	白面鼯鼠	公	1070305高雄	非保育類
88	20120103D10	白面鼯鼠	母	#2(小白)	非保育類
89	20090530D10	白面鼯鼠	公	C1390	非保育類
90	20140083D10	北美土撥鼠	公	土蛋#1	非保育類
91	20110050D10	北美土撥鼠	公	公06F11D95	非保育類
92	20110051D10	北美土撥鼠	母	母06F10DD1	非保育類
93	20140320D10	赤腹松鼠	公	1030518園內救傷	非保育類
94*	20140320M10	赤腹松鼠	公	1030518園內救傷	非保育類
95	20120476D10	赤腹松鼠	公	1011113大門	非保育類
96	20120058D10	赤腹松鼠	母	1010213園內	非保育類
97	20070304D10	美洲巨水鼠	母	#6灰-31017	非保育類
98	20070305D10	美洲巨水鼠	母	#8小小黃	非保育類
99	20060454D10	美洲巨水鼠	公	♂ #7白	非保育類
100	20140308D10	天竺鼠	母	#5	非保育類
101	20130433D10	天竺鼠	母	#10	非保育類
102	20130250D10	天竺鼠	母	#9	非保育類
103	20110591D10	高山田鼠	公	C1221-20	非保育類
104	20110592D10	高山田鼠	公	F1003	非保育類
105*	20110592M10	高山田鼠	公	F1003	非保育類
106	20110121D10	高山田鼠	母	F1004	非保育類
107	20070425D10	巢鼠	公	C1167-1	非保育類
108*	20070425M10	巢鼠	公	C1167-1	非保育類

109	20080500D10	橙腰鼠	母	#35	非保育類
110	20060030D10	橙腰鼠	母	#9	非保育類
111	20050327D10	橙腰鼠	母	#37	非保育類
112	20150249D10	白腹刺猬	母	深深	非保育類
113	20130392D10	白腹刺猬	母	20090827-1	非保育類
114	20120290D10	白腹刺猬	母	20080716-3	非保育類
115	20080559D10	灰袋鼠	母	灰38	非保育類
116	20070698D10	灰袋鼠	公	灰38之子	非保育類
117	20070358D10	灰袋鼠	公	灰順	非保育類
118	20130094D10	紅頸袋鼠	母	德6	非保育類
119	20120112D10	紅頸袋鼠	母	德2	非保育類
120	20190347D20	無尾熊	母	Pearl(Nessa)	非保育類
121	20190754D10	無尾熊	公	Ted	非保育類
122	20180351D10	無尾熊	公	CHIP(奇奇)	非保育類

*註：標示為肉類組織檢體

附錄二、鑑定案動物 DNA 序列

1. Cytb 部分序列：

編號 109COA2-1、109COA2-5、109COA2-11、109COA2-13、109COA2-17 及 109COA2-18 之 PCR 複製產物均具相同之序列型，其 DNA 序列型如下所示(395bp)：

```
10      20      30      40      50      60      70      80
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
ATGACCACAAATCTACGAAAAACTCACCCAAATAATAAAATCATCAACAACATTCATCGATCTCCCAAGCCCCCTCTAA
90      100     110     120     130     140     150     160
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
TATCTCTGCTTTATGAAACTTCGGATCACTACTAGGCACCTGCCTAATCCTACAAATCACTACCAGGAATCTTCCTAGCAA
170     180     190     200     210     220     230     240
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
TACACTACTCACCAGACATCTCACTAGCATTCCTCATCAGTAGCCCATATCACCCGAGACGTACAATACGGATGACTTATC
250     260     270     280     290     300     310     320
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
CGCAATATACATGCTAACGGGGCTCCATTTTCTTCATATGCATTTACCTCCACATTGGCCGAGGACTTTACTATGGCTC
330     340     350     360     370     380     390
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
ATACTTATACAAAGAAACCTGAAACACAGGAATCATCCTACTATTCCCTAACTATAGCCACTGCATTTCGTAGGATA
```

編號 109COA2-3、109COA2-4、109COA2-6、109COA2-7、109COA2-8、109COA2-9、109COA2-10、109COA2-12、109COA2-14、109COA2-16 及 109COA2-19 之 PCR 複製產物均具相同之序列型，其 DNA 序列型如下所示(144bp)：

```
10      20      30      40      50      60      70      80
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
ATGACCACAAATCTACGAAAAACTCACCCAAATAATAAAATCATCAACAACATTCATCGATCTCCCAAGCCCCCTCTAA
90      100     110     120     130     140
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
TATCTCTGCTTTATGAAACTTCGGATCACTACTAGGCACCTGCCTAATCCTACAAATCACTACC
```

2. 16S rRNA 部分序列：

編號 109COA2-1、109COA2-3、109COA2-4、109COA2-5、109COA2-7、109COA2-9、109COA2-10、109COA2-11、109COA2-12、109COA2-13、109COA2-17 及 16109COA2-18 之 PCR 複製產物均具相同之序列型，其 DNA 序列型如下所示(456bp)：

```
10      20      30      40      50      60      70      80
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
```

```

CTGCCAGTGACATTGTTAAACGGCCGCGGTATCCTAACCGTGCAAAGGTAGCGTAATCAGTTGTCTTTTAAATAAAGAC
    90      100      110      120      130      140      150      160
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
TAGAATGAATGGCCAAACGAGGTTCTACCTGTCTCTTACAAATAATCAGTGAAATTGATCTTCCCGTGCAAAGCAGGAA
    170      180      190      200      210      220      230      240
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
TAACATTATAAGACGAGAAGACCCGTGTGGAACCTTCAAATACAAATCAACTATCACCATTACCCGCCCTACGGGCCCATATC
    250      260      270      280      290      300      310      320
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
AAACTAGCATATGATTTATATTTTCGGTTGGGGCGACCTCGGAGTAAATATAAACCTCCGAAAAAAGAATTCTCTCTAAA
    330      340      350      360      370      380      390      400
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
CCTAGACCTACCACCCAAAGTGCTTCCGGCAAAACGATCCAATATAATTGATCAACGAACCAAGCTACCCCAGGGATAAC
    410      420      430      440      450
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
AGCGCAATCCCATCCTAGAGTTCCATCGACGATGGAGTTTACGACCTCGATGTTG

```

編號 109COA2-2 及 109COA2-16 之 PCR 複製產物具有 2 種序列型，DNA 序列型如下所示。109COA2-2(310bp)：

```

    10      20      30      40      50      60      70      80
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
AAAACATAGCCCCTAGCAACACACAAGTATTGGGGGTAAATGCCTGCCAGTGACACTGTTTTAAACGGCCGCGGTATCCT
    90      100      110      120      130      140      150      160
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
AACCGTGCAAAGGTAGCGTAATCAGTTGTCTTCTAAATAAAGACTAGAATGAATGGCCAAACGAGGTTCTACCTGTCTCT
    170      180      190      200      210      220      230      240
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
TACAGATAATCAGTGAAATTGGTCTCCCGTGCAAAGCGAGGATAATCCTATAAGACGAGAAGACCCGTGTGGAACTTTA
    250      260      270      280      290      300      310
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
AACACAAATCAACTACCATCAAACCCAAACTAAGGATTTATGACCAACTAGTATATGATCCACGTTTTTC

```

109COA2-16(267bp) :

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
GCGTGGCCAGTGACATTGTTAAACGGCCGCGGTATCCTAACCCTGCAAAGGTAGCGTAATCAGTTCCTTTTAAATAAAG
      90     100     110     120     130     140     150     160
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
ACTAGAATGAATGGCCAAACGAGGTTCTACCTGTCTCTTACAAATAATCAGTGAAATTGATCTTCCCGTGCAAAGCAGG
     170     180     190     200     210     220     230     240
....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
AATAACATTATAAGACGAGAAGACCCTGTGGAACTTCAAATACAAATCAACTATCACCATTACCCGCCTACGGGCCCATTA
     250     260
....|....|....|....|....|....|....
TCAAAC TAGCATATGATTTATATTTTC
```

附錄三、鑑定案植物 DNA 序列

1. psbA-trnH IGS 部分序列：

該疑似含虎骨成分藥酒檢體之 PCR 複製產物，其 DNA 序列如下所示(262bp)：

```
10      20      30      40      50      60      70      80
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
ACAAATTAATAATTTTTTCGCCATTTATCATTACTTGTAAAGATAAAATACAACCTAAATTGAAAACTTTATTCTTTTTTTT
90      100     110     120     130     140     150     160
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
TTTTTTTTTTACTAAAAAAAAAAAAAGAAATAAAACAAATAGTTAAGTAATAACTAAAAAATACTAAACATAAATAGTAA
170     180     190     200     210     220     230     240
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|

AGGAGCAATAACAAACCTCTTGATATAACAAGAAATTTTTTATTACTCCTTTACTTTCAAGAACTAATATATATTAAGAC
250     260
...|...|...|...|...|..
CAAAGCTTATCCATTACAGA
```

2. trnL intron 部分序列：

該疑似含虎骨成分藥酒檢體之 PCR 複製產物，其 DNA 序列如下所示(538bp)：

```
10      20      30      40      50      60      70      80
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
TGAGCCTTGGTATGGAACCTTACCAAGTGAGAACTTTCAAATTCAGAGAAACCTGGAATTAAAAATGGGCAATCCTGAG
90      100     110     120     130     140     150     160
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
CCAAATCCTGTTTTATGAAATAAACAAGGGGTTTCTATAACGAAAAATAAAAAAGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAG
170     180     190     200     210     220     230     240
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
CTGTTCTAACAAATGGAGTTGGCTGCATTGTGTAGTAAAGGAATCCTTCCATCGAACTTCAGAAAGGATGAAGGATAA
250     260     270     280     290     300     310     320
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
ACCTATATACATACGTATAGTACTGAAATACTATCTCAAAATGATTAAATGACGACCCCAATCTGTATTTTTTTATATTTA
330     340     350     360     370     380     390     400
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
TATGAAAAATGAAAGACTTGTGTGAATCGATTCAAATTTGAAAAAGAATCGAATATTCATTGATCAAACCATTCACATC
410     420     430     440     450     460     470     480
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
CACCGTAGTCTGATAGATCTTTTTAATAATTGATTAATCGGACGAGAAATAAGATAGAGTCCCATTATACATGTTAATAT
490     500     510     520     530
```

.....
 CGACAACAATGAAATTTATAGTAAGAGGAAAAATCCGTCGACTTTAGCAAAATCGTGAGG

3. trnL-trnF IGS 部分序列：

該疑似含虎骨成分藥酒檢體之 PCR 複製產物，其 DNA 序列如下所示(404bp)：

10 20 30 40 50 60 70 80

 TGACTCCCTAATTATTTATTTTCATTTTATCATTTTGTTAGCGATTCAAAATCAAATTCGTTATATTTATCATTCATTTT
 90 100 110 120 130 140 150 160

 CATTTCGACTCTTTTCTTTCACAAATGGATCTGAGCGAAAAATTTTTTCTTATCACAAGACTTGTGTGTGATATATATGAT
 170 180 190 200 210 220 230 240

 ACGCGTACAGTACAAATGATTTGAGCAAGGAATCCATTAAATTTGAATAATTAACAATACGTATCATTACTTGTACTGTA
 250 260 270 280 290 300 310 320

 CTGAAACTTTGAAATTTTTTTTTTTGAAGATCCAAGAAATTCATTAGATCCTGTATAATACTTTGTAATACTTTTTTCGTT
 330 340 350 360 370 380 390 400

 TTTCTAATTGACATAGACCCAAGTCCATATTTAAATAAATGAGGATGATGCGTCGTGAATGGTCGGGATAGCTCAGCT

 GGTA

4. rbcL 基因部分序列：

該疑似含虎骨成分藥酒檢體之 PCR 複製產物，其 DNA 序列如下所示(694bp)：

10 20 30 40 50 60 70 80

 CTGCAGTAGCGTTTAAGTAATGCCCTTTGATTTTACCTGTTTCAGCCTGTGCTTTAAAAAGTGCTTCGGCACAAAATAG
 90 100 110 120 130 140 150 160

 AAACGGTCTCTCCAACGCATAAATGGTTGGGAATTAACATTCCTCATCATCTTTGGTAAAAATCAAGTCCACCGCGTAGACA
 170 180 190 200 210 220 230 240

 TTCATAAACTGCTCTACCGTAATTCCTAGCGGATAACCCCAATTTTGGTTTTATAGTACATCCCAATAGAGGGCGGCCAT
 250 260 270 280 290 300 310 320

 ACTTGTTCAATTTATCTCTCTCAACTTGGATACCATGAGGCGGGCCCTGGAAAGTTTTAACATAAGCAGTAGGGATTGCG
 330 340 350 360 370 380 390 400

AAATCCTCCAGACGTAGAGCGCGCAGGGCCTTGAACCCAAACACATTACCTACAATGGAAGTAAACATGTTAGTAACAGA
 410 420 430 440 450 460 470 480
|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
 ACCTTCTTCAAAAAAGGTCTAAGGGGTAAGCTACATAAGCAATAAAATTGACTTTCTTCTCCAGCAACAGGCTCGATGTGGT
 490 500 510 520 530 540 550 560
|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
 AGCATCGACCTTTGTAACGATCAAGACTGGTAAGACCGTCAGTCCATACAGTTGTCCATGTACCAGTAGAAGATTCAGCA
 570 580 590 600 610 620 630 640
|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
 GCTACCGCGGCCCCTGCTTCCTCAGGTGGAACTCCAGGTTGAGGAGTTACTCGAAATGCTGCCAAAATATCAGTATCTTT
 650 660 670 680 690
|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
 GGTTTCTAGTCTCAGGAGTATAATAAGTCAATTTATAATCTTTAACACCAGCTTT

附錄四、以直接 PCR 結合多重引子 PCR 技術進行靈長目、齧齒目、蝸形目及雙門齒目動物種屬鑑定之標準操作流程

一、檢體前處理

(一)肉類檢體

- (一) 檢體使用前存放於-20 °C 冰箱。
- (二) 進行實驗時，切取一小塊用去離子水清洗乾淨。
- (三) 切取微量(直徑約 1 mm 大小)檢體至乾淨的 1.5 mL 微量離心管中。
- (四) 加入 20 μ L dilution buffer (液面必需高於檢體)。
- (五) 加入 0.5 μ L DNA Release buffer。
- (六) 充份混合均勻 10 秒。
- (七) 在室溫放置 2-5 分鐘。
- (八) 置於 98 °C 乾浴槽中以 800 rpm 轉速震盪 2 分鐘。
- (九) 若不馬上進行後續之分析，則經處理後之檢體可放置-20 °C 冰箱保存。

(二)毛髮檢體

1. 檢體使用前置於室溫中保存。
2. 進行實驗時，將毛髮用去離子水洗淨並風乾。
3. 將毛髮剪碎後放至乾淨的 1.5 mL 微量離心管中。
4. 加入 20 μ L dilution buffer (液面須高於檢體，必要時可增加為 40 μ L)。
5. 加入 0.5 μ L DNA Release buffer (若 dilution buffer 為 40 μ L，則加入 1 μ L 之 DNA Release buffer)。
6. 充份混合均勻 10 秒。

7. 在室溫放置 5 分鐘
 8. 置於 98 °C 乾浴槽中以 800 rpm 轉速震盪 2 分鐘。
- (十) 若不馬上進行後續之分析，則可放置於-20 °C 冰箱保存。

(三)角質類、骨頭

1. 檢體使用前置於室溫中保存。
2. 進行實驗時，將角質類、骨頭類以去離子水洗淨並風乾。
3. 用滅菌之銼刀將檢體磨成粉末狀並取約 50 mg 至乾淨的 1.5 mL 微量離心管中。
4. 以鹽/氯仿(Salt/Chloroform) 法或 gSYNC™ DNA Extraction Kit (Geneaid, Taiwan)進行 DNA 萃取。

二、PCR 複製

(一)肉類組織

聚合酶連鎖反應之試劑組成為：2X Phire Tissue Direct PCR Master Mix 10 µL、引子(濃度如表七所示)及 1 µL(視需要調整)之檢體前處理液，最後以無菌去離子水將反應總體積調整至 20 µL。

將上述組成混合均勻並短暫離心後，放入 PCR 熱循環儀(GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystems, USA) 中進行反應。反應條件為 98°C 使 DNA 變性 5 分鐘，接著進入循環程式，98°C 使 DNA 由雙股變為單股約 5 秒，再以各引子特定之黏合溫度(如表七所示)進行黏合約 5 秒，接著以 72°C 延長 DNA 片段約 20 秒，將此條件進行 33 個循環，完成循環反應後以 72°C 作用 1 分鐘使反應完全，最後將產物保存於 4°C。所得到之 PCR 產物以洋菜膠體電泳進行分析。

(二)毛髮、角質類檢體

聚合酶連鎖反應之試劑組成為：2X Phire Tissue Direct PCR Master Mix 10 µL、引子(濃度如表七所示)及 3 µL(視需要調整)之檢體前處理液，最後以無菌去離子水將反應

總體積調整至 20 μ L。(象牙及其產製品則以萃取之 DNA 取代前處理液)

將上述組成混合均勻並短暫離心後，放入 PCR 熱循環儀 (GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystems, USA) 中進行反應。反應條件為 98°C 使 DNA 變性 5 分鐘，接著進入循環程式，98°C 使 DNA 由雙股變為單股約 5 秒，再以各引子特定之黏合溫度 (如表七所示) 進行黏合約 5 秒，接著以 72°C 延長 DNA 片段約 20 秒，將此條件進行 40 個循環，完成循環反應後以 72°C 作用 1 分鐘使反應完全，最後將產物保存於 4°C。所得之 PCR 產物以洋菜膠體電泳進行分析。

三、洋菜膠電泳分析

以 1X TBE Buffer 配製 2% 之洋菜膠 (Agarose Gel) 含有 5% SafeView™ (Arrowtec, Taiwan) 染劑。5 μ L 之 PCR 產物加到膠體中，以 100 V 進行電泳，電泳完成後將膠體置於 UV 燈 (450 nm) 下觀察並拍照存檔。

四、PCR 產物純化

使用 DNA Clean/ Extraction Kit (GeneMark, Taiwan) 進行 PCR 產物之純化，其步驟如下：

1. 將已萃取出之 DN 9 置於一乾淨微量離心管。
2. 加入 DNA 溶液三倍體積之 Binding Solution 於 Tube 中，混合均勻。
3. 將 Spin Column 放入 Collection Tube，將溶液移至 Spin Column 中以 12,000-14,000 g 離心 1 分鐘，去除濾液。
4. 加入 Washing Solution 700 μ L 以 12,000-14,000 g 離心 1 分鐘，去除濾液，重覆此步驟兩次。
5. 以 12,000-14,000 g 離心 3 至 5 分鐘去除多餘酒精。
6. 放入 45-60°C 之烘箱中烘乾 5 分鐘去除多餘酒精。
7. 將 Spin Column 移至新微量離心管中並加入 30 ~ 100 μ L 之 Elution Solution 或預熱至

70°C之無菌去離子水(pH 7.0-8.5)，放置 1~2 分鐘。

8. 再以 12,000-14,000 g 離心 1 分鐘，洗脫出 DNA，保存於-20°C。

五、DNA 定序

定序方法為以 Big Dye™ Termination Kit(Applied Biosystems, USA)進行循環定序反應(Cycle Sequencing)，以臺灣大學醫學院之 ABI-3730(Applied Biosystems, USA)或本實驗室之 ABI-3130 (Applied Biosystems, USA)自動化螢光電泳定序儀進行反應產物之分離。

六、序列分析

將上述所得序列與 GenBank 資料庫進行比對，以搜尋最相似之物種。此外，亦與國立臺灣大學李俊億教授實驗室建立之資料庫進行比對。

(一) 利用 NCBI (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 網站，進行與 GenBank 資料庫之搜尋比對，步驟如下：

1. 開啟 NCBI 網頁
(http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome)
2. 點選 Nucleotide Blast 選項，將序列複製後貼入 NCBI 網頁 Query 方格中。
3. 將 Others 及 Highly Similar Sequences (megablast)選項選取。
4. 點下 BLAST 即可看到比對結果。

(一) 利用 BioEdit 軟體，將序列與本實驗室或國立臺灣大學法醫學研究所李俊億教授實驗室之資料庫進行自動化搜尋比對，步驟如下：

1. 開啟 BioEdit 7.0 軟體，由工具列 Accessory Application 中選取 BLAST，再選擇 Local BLAST 指令，於 Nucleotide Database 中選擇欲比對之資料庫名稱。
2. 加入欲比對之序列有兩種方法，一為直接於 Query 方格中貼上未知序列，或是由 Load From File 選項中選擇欲與資料庫比對之未知序列檔案，最後執行 Do Search 即可搜尋比對之結果。