

对几起疑似野生动物肉食品的分子遗传学分析

叶汪薇¹ 朱彤¹ 胡超超¹ 张晨岭² 万霞¹ 周立志¹ 常青² 张保卫^{1*}

(1 安徽大学生命科学学院, 合肥 230039) (2 南京师范大学生命科学学院, 南京 210097)

关键词: 物种鉴定; 细胞色素 *b* 基因; 分子遗传学; 小鹿

中图分类号: Q75

文献标识码: A

文章编号: 1000–1050 (2008) 04–0434–06

A molecular genetic approach for species identification of several forensic animal samples

YE Wangwei¹, ZHU Tong¹, HU Chaochao¹, ZHANG Chenling², WAN Xia¹, ZHOU Lizhi¹, CHANG Qing², ZHANG Baowei^{1*}

(1 College of Life Science, Anhui University, Hefei 230039, China)

(2 College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 241000, China)

Abstract: For a long time, illegal poaching was a big challenge in wildlife conservation. In some cases, in which unambiguous morphological evidence was absent, it was difficult to identify the correct species, so the judicial process was impeded. In the present study, identification of species is possible by DNA sequencing of the material, especially a partial DNA sequence of the cytochrome *b* gene. Four cooked muscle samples that were suspected as coming from wildlife were collected from four different cities. DNA was extracted from the muscle samples, then a fragment of cytochrome *b* was amplified with the universal primers L14724 and H15149. PCR products were purified and sequenced, and four sequences of 393 to 405 bp were determined. They shared the same haplotype. After blasting, sequences were compared with the sequences of eight related species registered in GenBank, and the phylogenetic tree was constructed by the neighbor-joining method. The results of genetic distance (K2P) analysis showed that the genetic distance between the unknown species and different species ranged from 0.00 (unknown samples vs *Muntiacus reevesi*) to 0.106 (vs *Cervus nippon*). At the same time, these unknown samples of animal remains were identified by phylogenetic analysis with neighbor-joining tree, which shows that the samples and *Muntiacus reevesi* were clustered together in the system. On the basis of the case, some discussion was carried out on the key steps in the molecular genetic approach such as the choice of molecular markers and operational technique for molecular genetic diagnostic approach, and additionally, some conservation suggestions are put forward.

Key words: Cytochrome *b* gene; Molecular genetics; *Muntiacus reevesi*; Species identification

长期以来, 非法捕猎是威胁物种多样性及保护的一个国际性难题。由于偷猎对象往往涉及一些国家保护的物种, 因此在执法过程中需要对偷猎对象进行准确的物种鉴定, 以作为执法的依据。在此类事件的物种鉴定中, 一般尽可能地使用形态学特征来完成, 如皮张、毛发、骨骼特征、角、蹄等 (杨淑慧, 2006)。但在以捕食为目的的偷猎事件中, 野生动物往往已经过深度加工, 难以保证获得完整、充足的形态特征 (如皮毛和骨骼等), 因而给物种鉴定带来一定难度。近年来, 分子遗传学手段

也越来越多地被应用于生物种的鉴定之中。如杨光等 (2002) 利用 DNA 控制区 (Control region) 和细胞色素 *b* 基因 (Cytochrome *b*, Cyt *b*) 的序列分析, 确认一头误入内河搁浅死亡的鲸为小布氏鲸 (*Balaenoptera edeni*)。王加连等 (2003) 通过类似的研究途径, 发现中国水域分布的真海豚在分类地位上应属于长喙真海豚 (*Delphinus capensis*)。由于捕猎野生动物往往出于肉食消费目的, 所以在饮食行业中经常有类似的事件发生。如杨小军和周开亚 (2004) 利用线粒体 12S rRNA 序列分析的方法, 发

基金项目: 安徽大学人才队伍建设项目: “211” 硕博队伍设计计划基金资助 (02203/04/04)

作者简介: 叶汪薇 (1986–), 生物科学 2005 级学生, 主要从事分子遗传学研究。

收稿日期: 2008–02–25; 修回日期: 2008–05–26

* 通讯作者, corresponding author, E-mail: zhangbw@ahu.edu.cn

现从饭店收缴的冷冻肌肉块涉及几种国家保护动物：中国穿山甲（*Manis pentadactyla*）、黑熊（*Ursus thibetanus*）及孟加拉巨蜥（*Varanus bengalensis*）。有研究者利用类似方法，发现一家餐馆中的肌肉残渣来自国家一级保护动物——黑麂（*Muntiacus reevesi*）（贺培建等，2004）。在国际上，类似的研究工作也广泛开展（Bellisa *et al.*，2003），涉及的物种也多为一些保护或濒危物种，如犀牛科（*Rhinocerotidae*）的物种（Hsieh *et al.*，2003）、虎等猫科动物（Mills *et al.*，2000；Wan and Fang，2003）、龟类（Moore *et al.*，2003）、鲑类（Greig *et al.*，2002）、鲨类（Hoelzel，2001；Shivji *et al.*，2002；Chapman *et al.*，2003）等。然而，一些涉案野生动物往往已经加工成成品，经历了诸如爆炒、焖烧等诸多复杂的烹调过程，同时还与多种香料、调味品等在高温下一起作用。在此情况下，最终餐饮成品还能否利用分子遗传学手段进行鉴定还值得进行探讨。在本研究中，我们对几起可能涉及野生动物的肉食成品，使用 DNA 序列分析的方法，通过分子系统学途径，明确地鉴定出确切物种来源，从而为该类样品的物种识别提供了一条可行的技术路线，进而亦为打击非法捕猎和保护野生动物等提供关键性的技术储备。

1 材料和方法

1.1 材料

本实验共采集到 4 个样品，分别来自泾县（代号 Bin，采自 2005 年 2 月）、合肥市（HF，2006 年 5 月）、安庆（AN，2006 年 3 月）、池州（Chi，2006 年 6 月）。研究中的样品均为各地餐馆中经过红烧或其他方式加工后的菜肴成品。研究中选取肌肉组织，置于 50 ml 的离心管中，加入 2~3 倍体积的乙醇（95% 以上）保存。

1.2 DNA 提取

每一样品剪取 0.5 g 左右的肌肉组织，使用手术剪、刀等尽量将其破碎后置于 2 ml 的离心管中，使用适量的 95% 乙醇清洗 2~3 次；后用 75% 的乙醇清洗 2 次；再使用 1 ml 的双蒸水浸泡 2 h，期间换水 1~2 次。浸泡结束后，向样品管中加入 500 μ l TNE 裂解液（10 mmol/L Tris-Cl，1.0% SDS，1 mmol/L CaCl_2 ）和 10 μ l Proteinase K（20 mg/ml），55 $^{\circ}\text{C}$ 水浴消化过夜或将肌肉组织全部消化为止。

消化后样品消化液先后经 2 次等体积的酚 -

氯仿 - 异戊醇（25:24:1，和 1 次氯仿 - 异戊醇（24:1）抽提。抽提上清液中加入无水乙醇（2.5 倍体积）及醋酸钠（1/10 体积）沉淀 DNA。沉淀经真空干燥后溶于适量 TE 缓冲液（10 mM Tris - HCl，1 mM EDTA，pH = 8.0）。抽提产物经 1.2 % EB - 琼脂糖凝胶电泳后，使用紫外凝胶成像系统检测成像。

研究中从抽提步骤始即使用灭菌后的滤纸作为阴性对照组，以避免污染发生。

1.3 PCR 扩增、产物纯化及测序

我们采用扩增哺乳动物 Cyt b 部分序列的通用引物 L14724（5' - GAT ATG AAA AAC CAT CGT TG - 3'）和 H15149（5' - CTC AGA ATG ATA TTT GTC CTC A - 3'）（Koehler *et al.*，1989；Irwin *et al.*，1991），对抽提到的 DNA 模板进行扩增。扩增反应在 50 μ l 标准体系下进行，扩增的反应条件为：TaKa a Pre mix Taq（含 TaKa a Ex Taq 1.5 U dNTP Mixture 0.1 mM Buffer 2，4mM Mg^{2+} ）25 μ l，引物（10 μ mol/L）各 1 μ l，DNA 模板 3~5 μ l，使用双蒸水将反应总体积补至 50 μ l。PCR 反应循环设置：95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min，然后 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s，55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 40 s，72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 60 s，反应 35 个循环后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。

扩增产物经 1.2 % EB - 琼脂糖凝胶 120 V 电泳 30 min 后，使用凝胶成像仪检测。PCR 产物经 E. Z. N. A. Cycle - pure Kit（Omega 公司）纯化后，使用 PE 公司 ABI310 型遗传分析仪及配套的 Big-DyeTM 试剂盒进行双向测序。

1.4 DNA 序列数据的分析

将测定的线粒体 Cyt b 基因片段的序列在 GenBank 中进行 BLAST 搜索，取得与其序列相似度较高的同源区序列后，将研究测定的序列与其合并，用 Clustal W 软件进行比对。比对后使用 MEGA 软件（4.0 版本）按 Kimura 双参数法（Kimura-2-Parameter，K-2-P）计算各 DNA 序列间的遗传距离，并根据此距离矩阵以邻接法（Neighbor-Joining，NJ）建系统发生树。研究中同时还使用最大简约法（Maximum parsimony，MP）构建序列间的系统发生关系。系统树分支处的置信水平平均用自引导法重复检验（bootstrap test）来估计，重复次数为 1 000 次。

2 结果

实验结果显示 4 个样品的 DNA 均存在强烈的

降解（照片未展示），但是使用引物 L14724 和 H15149 在上述 4 个 DNA 模板中均得到阳性的扩增产物（图 1）。研究中的阴性对照无扩展片段表明研究过程未受到外源 DNA 的污染。

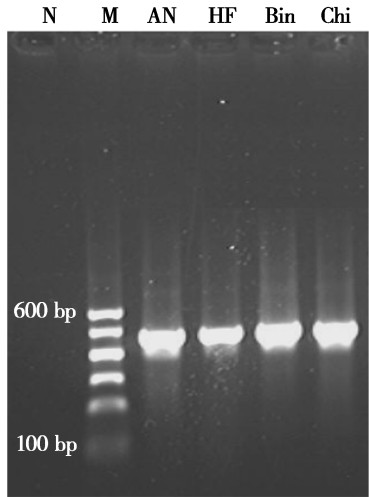


图 1 研究中 4 个待鉴定样品 Cyt *b* 基因部分片段扩增结果的电泳图谱。M：100 bp 梯度（100–600 bp）；N：阴性对照；AN、HF、Bin、Chi 为研究中的 4 个样品。

Fig. 1 The PCR products of Cyt *b* gene from the four unknown individuals in present study. M: 100bp Ladder (100–600 bp); N: Negative comparison; AN, HF, Bin, Chi refer to the four samples detected in present study.

在待检测的 4 个样品的测序结果中，去除一些不明确的数据峰以及结尾引物部分后，获得明确序列长度为 393~405 的碱基。经 Clustal W 比对后发现它们之间并无变异位点，说明这 4 个样品应来自同一物种。将 405 bp 的序列在 NCBI 数据库内进行 blast 比较后（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>），选取与之序列同源性较高的 8 个物种：黑麂（*Munticus crinifrons*）Genbank 序列登录号：DQ445734）、小鹿（*M. reevesi*, AF042719）、越南大麂（*Megamuntiacus vuquangensis*, AF042720）、赤麂（*M. muntjak*, AF042715）、麋鹿（*Elaphurus davidianus*, AF423194）、梅花鹿（*Cervus nippon*, AB021091）、坡鹿（*C. eldi*, AY607037）、马鹿（*C. elaphus*, AF423197）进行遗传距离及系统发生分析（表 1）。遗传距离分析结果显示，未知物种和上述物种遗传距离为 0.0（未知物种 vs 小鹿）~0.106（未知物种 vs 梅花鹿）。这一结果提示研究中的样品可能是来自小鹿。系统发生分析也给出相同的结果，图 2 是采用 K-2-P 距离以邻接法构建的 8 个物种及待检测的物种的系统发生关系树，树中研究样品和小鹿聚在一起，并取得了非常高的置信度（100）。同时使用 MP 法的建树结果也取得相同的拓扑结构（结果未展示）。

表 1 待检测物种的细胞色素 *b* 序列与几种鹿科动物同源区序列之间的遗传距离矩阵

Table 1 Matrix of genetic distances among the unknown sequences and Cyt *b* sequences of several Cervidae species

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1 待鉴定物种 Unknown samples		0	20	16	22	32	33	35	39
2 小鹿 <i>Muntiacus reevesi</i>	0.000		20	16	22	32	33	35	39
3 越南大麂 <i>Megamuntiacus vuquangensis</i>	0.052	0.052		22	22	40	41	43	49
4 赤麂 <i>Muntiacus muntjak</i>	0.041	0.041	0.058		19	35	35	40	40
5 黑麂 <i>M. crinifrons</i>	0.057	0.057	0.057	0.049		35	38	37	36
6 麋鹿 <i>Elaphurus davidianus</i>	0.085	0.085	0.109	0.094	0.094		18	23	25
7 坡鹿 <i>Cervus eldi</i>	0.088	0.088	0.112	0.094	0.102	0.046		23	25
8 马鹿 <i>C. elaphus</i>	0.094	0.094	0.119	0.109	0.100	0.060	0.060		20
9 梅花鹿 <i>C. nippon</i>	0.106	0.106	0.137	0.109	0.097	0.066	0.066	0.052	

注：左下方为使用 Kimura 双参数距离模型计算出的序列间的遗传距离，右上方为序列间的碱基差异数。
Note: The lower triangle was the genetic distance based on kimura-2-paramter model, and the upper triangle was the nucleotides difference among sequences

3 讨论

在涉及野生动物盗猎的案件中，物证往往已经被加工成菜肴，因此一般不易找到有力的形态学证据。但是，分子遗传学研究途径仍然可以为类似案件提供明确的证据。我们的研究表明，尽管食物经历了水煮、高温、高压、与多种调味品作用等加工过程，组织中的 DNA 分子有一定程度的降解，但

是仍有可以提供相当长度的 DNA 片段，使得对其进行遗传学分析成为可能。此前也有研究表明，在食品加工过程的高温、高压条件下，DNA 分子能保持相对的稳定（刘中权和王义权，2000；Hoelzel，2001；Girisha *et al.*，2004；Martín *et al.*，2007），因此从样品角度而言，此类经过加工后的肉食类成品都应该可以通过 DNA 途径进行分子遗传学方向的分析。不过，有一点是值得注意的：由于肌肉组

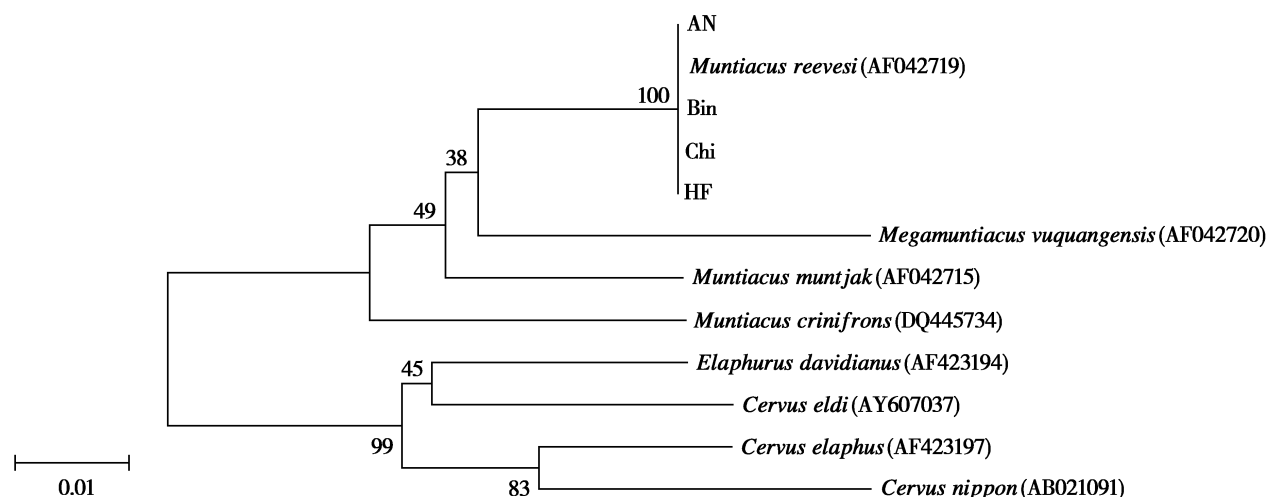


图2 基于细胞色素 *b* 基因部分序列以邻接法构建的系统发生树

Fig. 2 The Neighbor-Joining phylogenetic tree of unknown species and eight Cervidae animals based on Cyt *b* gene partial sequences.

织在加工过程中混杂油脂等多种成分，尽管不会对DNA的抽提造成明显的影响，但是抽提得到的模板DNA往往会存在一定未知成分的杂质，溶液会有不同程度的黄色。因此对于此类模板，最好是经过纯化后再转入下游的扩增工作。这一过程并不复杂，常用的DNA纯化试剂盒或者PCR产物纯化试剂盒即可胜任。

目前已被应用于物种鉴定的分子标记，常见于报道的有限制性片段长度多态性标记（Restriction fragment length polymorphism, RFLP）（Moore *et al.*, 2003）；扩增片段长度多态性标记（Amplified fragment length polymorphism, AFLP）（Sasazaki *et al.*, 2007）；序列分析（Girish *et al.*, 2004）；特异性引物鉴别（Hoelzel, 2001；Greig *et al.*, 2002；Yan *et al.*, 2004）等，利用这些标记技术的分析，在线粒体基因组和核基因组水平均有报道（Rastogi *et al.*, 2007）。近年来微卫星（Microsatellite）也见于在物种鉴定分析中的报道（Poetsch *et al.*, 2001；Singh *et al.*, 2004）。就工作原理而言，RFLP、AFLP、特异性引物法和微卫星都需要对研究对象遗传背景作较完整的前期准备，寻找目标物种特异性的位点，相对而言，此类方法所能处理的对象范围较狭窄，往往是在既定的几个选择之中进行物种确认，或者就具体的目标物种作“是”或“否”（Y/N）的判断。而序列分析则不受此限制，如果能获得待测物种的某个基因的序列，就可以依托NCBI Genbank这样有巨量内容的数据库进行检索分析。但是由此带来的是新的问题：即如何在没有任何分子遗传学信息的背景下获得其基因序列？相

对于核基因而言，由于线粒体基因组具有拷贝数多的优势，因此物种鉴定分析中更有优势，尤其在对一些痕量、易降解的检材的鉴定分析中。在线粒体基因组中，有多个基因被应用于物种的鉴定中，如控制区、细胞色素 *b*、16S rRNA、12S rRNA、COI等基因（Yan *et al.*, 2004；杨小军和周开亚, 2004；贺培建等, 2004；Cai *et al.*, 2005；刘辉和吴孝兵, 2006；马牧等, 2007）。这其中，细胞色素 *b* 是物种鉴定中最为常用的目的片段（Hsieh *et al.*, 2001）。细胞色素 *b* 的广泛的成功来自两个重要的方面。其一，由于细胞色素 *b* 基因进化速度适中，因此该基因序列是在种一级的分类阶元系统演化中最常使用的分子标记，因此对绝大多数的高等脊椎动物来说，均可以在NCBI Genbank检索到该物种Cyt *b* 的基因序列。因此，使用Cyt *b* 作为目标基因也就等于为物种鉴定中的序列分析提供了强大的数据支持。其二，选择Cyt *b* 还在于该目标基因拥有几个非常成功的通用引物，如L14724、H15149、H15915等（Kocher *et al.*, 1989；Irwin *et al.*, 1991），这些引物在脊椎动物中的大部分类群均可以成功使用，这就解决了前文提出的问题，为鉴定分析中的序列获得提供了技术支持。因此，正是由于有了上述两方面的优势，使得通过Cyt *b* 的基因序列测定结合聚类分析法的技术路线，成为物种鉴定中最为出色的分子遗传学研究途径之一。

小鹿又名黄猄等，属于鹿科（Cervidae），麂属，是一种小型鹿类，IUCN将其列为低危等级（LR）。小鹿分布于我国南方各省，如江苏、浙江、江西、福建、广西、云南、贵州、四川和湖南等地

(张荣祖, 1997)。在安徽省境内, 小鹿分布于皖南山区和大别山区(王岐山, 1990), 为安徽省二级重点保护动物。小鹿肉嫩鲜美, 同时鹿皮也是制革的优质原料, 具有重要的经济价值。近年来, 由于对该物种的重视程度不够, 小鹿成为偷猎者猎取的主要对象之一。本文的研究结果提示, 在安徽省内有小鹿分布的不同地区(安庆市、宣城市泾县、池州)、甚至没有分布的地区(合肥市)都有小鹿的餐饮成品的广泛存在。由于目前国内对小鹿大规模的人工饲养未见报道, 由此可知, 本文的鉴定结果同时还说明: 目前至少在局部地区, 小鹿的野生种群可能承受着比较严重的盗猎的压力, 而且很可能在小鹿的整个分布区范围内都存在有类似的问题。因此, 建议各地林业部门应加大对小鹿的保护力度, 严防偷猎等类似案件的发生。

致谢: 感谢王彬兵、沈菲菲、解文利、谢召勇等在实验过程中给予的帮助。

参考文献:

- Bellisa C, Ashtona K J, Freneyb L, Blairb B, Griffiths L R. 2003. A molecular genetic approach for forensic animal species identification. *Forensic Science International*, **134** (2), 99 - 108.
- Cai J, Liu M, Ying B W, Deng R L, Dong J G, Zhang L, Tao T, Pan H F, Yan H T, Liao Z G. 2005. The availability of mitochondrial DNA Cytochrome Oxidase I gene for the distinction of forensically important flies in China. *Acta Entomologica Sinica*, **48** (3), 380 - 385.
- Chapman D D, Abercrombie D L, Douady C J, Pritchard D K, Stanhope M J, Shivji M S. 2003. A streamlined, bi-organelle, multiplex PCR approach to species identification: application to global conservation and trade monitoring of the greatwhite shark, *Carcharodon carcharias*. *Conservation Genetics*, **4** (4), 415 - 425.
- Grish P S, Anjaneyulu A S R, Viswasb K N, Anand M, Rajkumar N, Shivakumar B M, Bhaskar S. 2004. Sequence analysis of mitochondrial 12S rRNA gene can identify meat species. *Meat Science*, **66** (3), 551 - 556.
- Greig C, Robertson J M, Banks M A. 2002. Rapid PCR-based species tests for threatened sympatric salmonids. *Conservation Genetics*, **3** (1), 81 - 84.
- He P J, Ruan X D, Fang S G. 2004. Application of 12S rRNA in the identification of *Muntiacus crinifrons* and *Muntiacus reevesi*. *Acta Theriologica Sinica*, **24** (4): 350 - 352. (in Chinese)
- Hoelzel A R. 2001. Shark fishing in fin soup. *Conservation Genetics*, **2** (1), 69 - 72.
- Hsieh H M, Chiang H L, Tsai L C, Lai S Y, Huang N E, Linacre A, Lee J C I. 2001. Cytochrome *b* gene for species identification of the conservation animals. *Forensic Science International*, **122** (1), 7 - 18.
- Hsieh H M, Huang L H, Tsai L C, Kuo Y C, Meng H H, Linacre A, Lee J C I. 2003. Species identification of rhinoceros horns using the cytochrome *b* gene. *Forensic Science International*, **136** (3), 1 - 11.
- Irwin D M, Kocher T D, Wilson A C. 1991. Evolution of the cytochrome *b* gene of mammals. *Journal of Molecular Evolution*, **32** (2), 128 - 144.
- Kocher T D, Thomas W K, Meyer A, Edwards S V, Paabo S, Villablanca F X, Wilson A C. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceeding National Academy of Sciences*, **86** (6), 6196 - 6200.
- Liu Z Q, Wang Y Q, Zhou K Y. 2000. Extraction and amplification of DNA from autoclaved Chinese soft-shelled Turtle (*Trionyx sinensis*) shell and bone. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, **31** (5): 343 - 345. (in Chinese)
- Liu H, Wu X B. 2006. Identification of pharmaceutical monkey skeleton samples based on 12S rRNA and Cyt *b* gene partial sequences. *Acta Laser Biology Sinica*, **15** (2): 184 - 190. (in Chinese)
- Ma M, Zhu Q, Li X, Sun Y M, Liu Y Y, Liu Y N, Tao C H. 2007. Identification of Balaenoptera omurai from an unknown whale vertebra based on Cyt *b* gene sequence. *Acta Theriologica Sinica*, **27** (3): 288 - 292. (in Chinese)
- Martín I, García Y, Fajardo V, López-Calleja I, Rojas M, Hernández P E, González I, Martín R. 2007. Mitochondrial markers for the detection of four duck species and the specific identification of Muscovy duck in meat mixtures using the polymerase chain reaction. *Meat Science*, **76** (4), 721 - 729.
- Mills L S, Pilgrim K L, Schwartz M K, McKelvey K. 2000. Identifying lynx and other north American felids based on mtDNA analysis. *Conservation Genetics*, **1** (3), 285 - 288.
- Moore M K, Bemiss J A, Rice S M, Quattro J M, Woodley C M. 2003. Use of restriction fragment length polymorphisms to identify sea turtle eggs and cooked meats to species. *Conservation Genetics*, **4** (1), 95 - 103.
- Poetsch M, Seefeldt S, Maschke M, Lignitz E. 2001. Analysis of micro-satellite polymorphism in red deer, roe deer, and fallow deer-possible employment in forensic applications. *Forensic Science International*, **116** (1), 1 - 8.
- Rastogi G, Dharne M S, Walujkara S, Kumar A, Patole M S, Shouche Y S. 2007. Species identification and authentication of tissues of animal origin using mitochondrial and nuclear markers. *Meat Science*, **76** (4), 666 - 674.
- Sasazaki S, Mutoh H, Tsurifune K, Mannen H. 2007. Development of DNA markers for discrimination between domestic and imported beef. *Meat Science*, **77** (2), 161 - 166.
- Shivji M, Clarke S, Pank M, Natanson L, Kohler N, Stanhope M. 2002. Genetic identification of pelagic shark body parts for conservation and trade monitoring. *Conservation Biology*, **16** (4), 1036 - 1047.
- Singh A, Gaur A, Shailaja K, Bala B S, Singh L. 2004. A novel micro-satellite (STR) marker for forensic identification of big cats in India.

- Forensic Science International*, **141** (2), 143 - 147.
- Wan Q H, Fang S G. 2003. Application of species-specific polymerase chain reaction in the forensic identification of tiger species. *Forensic Science International*, **131** (1), 75 - 78.
- Yan P, Wu X B, Shi Y, Gu C M, Wang R P, Wang C L. 2004. Identification of Chinese alligators (*Alligator sinensis*) meat by diagnostic PCR of the mitochondrial cytochrome *b* gene. *Biological Conservation*, **121** (1): 45 - 51.
- Wang J L, Yang G, Liu H, Zhou K Y, Wei F W. 2003. Application of mitochondrial DNA sequences in the species identification of common dolphins (*Genus Delphinus*) in Chinese Waters, *Acta Theriologica Sinica*, **23** (2): 120 - 126. (in Chinese)
- Yang X J, Zhou K Y. 2004. DNA identification of animal samples. *Chinese Journal of Zoology*, **39** (1): 89 - 92. (in Chinese)
- Yang G, Liu H, Zhou K Y, Ji G Q. 2002. Identification of a balae-noptera edeni specimen by using mitochondrial DNA sequences. *Chinese Journal of Zoology*, **37** (4): 35 - 38. (in Chinese)
- Yang S H, Xu Y C, Zhang W. 2006. A key for species identification of staple fur animals in China. *Journal of Northeast Forestry University*, **34** (4): 111 - 113. (in Chinese)
- 马牧, 祝茜, 李响, 孙玉苗, 刘莹莹, 刘亚楠, 陶翠花. 2007. 利用 Cyt *b* 基因由未知鲸骨鉴定出大村鲸. 兽类学报, **27** (3): 288 - 292.
- 王加连, 杨光, 刘海, 周开亚, 魏辅文. 2003. 线粒体 DNA 序列分析在中国水域真海豚物种鉴定中的初步应用. 兽类学报, **23** (2): 120 - 126.
- 王岐山. 1990. 安徽兽类志. 合肥: 安徽科技出版社.
- 刘中权, 王义权, 周开亚. 2000. 从高温高压蒸煮过的中华鳖甲和骨骼中提取及扩增 DNA. 中草药, **31** (5): 343 - 345.
- 刘辉, 吴孝兵. 2006. 根据 12S rRNA 和 Cyt *b* 基因部分序列鉴定药用猴骨样品. 激光生物学报, **15** (2): 184 - 190.
- 张荣祖. 1997. 中国哺乳动物分布. 北京: 中国林业出版社.
- 杨小军, 周开亚. 2004. 几种野生动物样品的 DNA 分子鉴定. 动物学杂志, **39** (1): 89 - 92.
- 杨光, 刘海, 周开亚, 季国庆. 2002. 用 mtDNA 序列鉴定一头小布氏鲸标本. 动物学杂志, **37** (4): 35 - 38.
- 杨淑慧, 徐艳春, 张伟. 2006. 中国主要野生毛皮物种识别检索表. 东北林业大学学报, **34** (4): 111 - 113.
- 贺培建, 阮向东, 方盛国. 2004. 12S rRNA 在黑鹿和小鹿物种鉴定中的应用. 兽类学报, **24** (4): 350 - 352.