

行政院及所屬機關出國報告
(九十二年度公務人員出國專題研究)

保育類野生動物產製品 DNA 鑑定技術

服務機關：法務部調查局

出國人 職 稱：調查員

姓 名：姜恩威

出國地區：美國

出國期間：中華民國九十二年五月二日至六月三十日

報告日期：中華民國九十二年十二月十二日

44/
/009201586

保育類野生動物產製品 DNA 鑑定技術

法務部調查局 姜恩威

研究內容：

野生動物產製品 DNA 鑑定技術、DNA 比對技術、DNA 證物採集技術。

行程說明：

- 一、 九十二年五月二日啓程赴美國康涅狄克州紐哈芬大學 (University of New Haven)，進行專題研究，至六月十六日，期間並由校方及李昌鈺博士安排，前往康涅狄克州州警實驗室與鑑識專家就實際案例實施研討。

專題研究係採研閱資料，專題討論及實驗操作同步進行，由李昌鈺博士，Dr. Albert Harper， Dr. Peter Bilus 及 Dr. Harry Morris 就生物多樣性、DNA 鑑定技術、DNA 比對技術等課目實施指導。

- 二、 六月十六日至六月二十一日於科羅拉多州丹佛市動物園

參加野生動物研討會，該會議主題係野生動物保育教育，但內容較偏向地區性的觀念推廣，除野生動物保育概念及一般知識介紹外並未探討鑑定技術。

- 三、 六月二十二日至六月二十九日赴加州舊金山市應用生命系統公司總部實驗室，與該公司專家討論生物多樣性之應用及進行 DNA 鑑定應用實驗。

應用生命系統公司生產自動定序儀器系列及多種專利試劑套件，為大多數實驗室採用，在生命科學研究範疇內堪稱領導品牌，該公司專家在 DNA 鑑定應用方面亦頗具經驗，在一週的鑑定應用實驗操作中習得極寶貴的經驗。

心得報告：

自地球上有生命以來，生物受氣候及地形等環境變化的影響，以及生物間的生存競爭，在整個生態系的演變過程中，族群的消長、消長增減是必然的。但是野生動物快速絕跡的現象並非自然演化的結果，而是人類行為所導致。

野生動物一般是指所有非經人工飼養而生活於自然環境下的動物。野生動物對人類來說具有下列五大功能：

- 一、 野生動物在物質循環及食物鏈上扮演重要角色，有助於維持自然生態平衡。
- 二、 野生動物是人類生存的必需品，可以做為食物、衣料、醫藥的來源。
- 三、 野生動物是人類精神文明及野外休閒，欣賞大自然的對象，可以豐富人類的生活。
- 四、 野生動物在遺傳工程及基因移植等方面的發展，具有未可限量的潛力。
- 五、 野生動物為人類最寶貴的自然資產之一。

人類無法脫離地球生態體系的範疇而獨立生存，卻又擁有破壞生態秩序的巨大力量，經常毫不在意的摧殘同為生態要素之一的野生動

物。我們必須體會到，一旦某種動物絕滅了，人類將無法使牠們再度出現。

國內自民國二十一年訂定狩獵法、六十一年全面禁獵、七十一年公布實施文化資產保存法至七十八年公布實施野生動物保育法，對於推展保育工作全面法制化，系統化的推動，但仍面臨以下保育問題：

- 一、 野生動物棲息地遭受破壞及改變：包括開路、築壩、採礦、觀光遊憩、工業用地、伐木等未經評估對野生動物影響的開發計畫，進行工程時也未將生態因素考慮在內，因而造成不必要及不可挽回的傷害。
- 二、 保育觀念仍未建立：食補觀念盛行，到處可見陳列販賣、甚至公開當眾宰食野生動物；獸夾、陷阱、鳥網等捕獵工具隨處可見，亟待遏止。
- 三、 國外保育類野生動物及產製品走私入國內：例如象牙作為裝飾品及印材；熊掌作為食材；虎鞭、虎骨、犀牛角等作為藥材；鸚鵡、猿類、紅龍及蜥蜴等活體作為寵物。不但對於國家形象損害至鉅，引起國際指責及經貿制裁行動；更對國內生態體系產生許多未可預知的衝擊。

中國人一向標榜自己是愛護野生動物的民族，孔孟學說為數千年

來國人生活言行的準則，亦以仁民愛物為中心思想。但是近年來因為以上的保育問題，我們好像突然間變成一個完全不懂得尊重生命、不愛護野生動物、見棄於國際保育思潮的野蠻地區。

今天我們應該認知並且警覺到：人類只是大自然的一部份，依賴著大自然中的資源維繫生存，若其它所有動植物消失，人類也將不復存在，因此生命、自然與生態應當隨著經濟發展受到更多的重視。

臺灣由於地狹人稠，過度開發下，已經造成生態系統的破碎化及棲地的劣質化，嚴重影響了島上的生物多樣性，再加上部份國人錯誤的觀念或炫耀的心理作祟，認為愈稀有愈名貴，造成國內市場的需求，因此盜獵保育類野生動物的事件層出不窮，而國人出國觀光人數增加，也經常會買一些野生動物產製品回國，由於野生動物產製品利潤不錯，不法集團也因此鋌而走險，以致於境外攜入或走私進口之野生動物產製品多樣性逐年提高。野生動物產製品多係由保育類野生動物製成，近年來成為影響國家形象至鉅的問題。除以教育方式導正不當消費習慣外，加強查緝保育類野生動物產製品，亦屬於有效遏阻使用、收藏保育類野生動物產製品的手段。

境外攜入或走私進口之野生動物產製品以蛇製品、玳瑁製品、虎類製品、象牙製品最為普遍。而其來源多屬東南亞國家，該地區許多

場所或商店可以買到此類產製品，部份產製品甚至有中文說明，這也是先進國家對我國產生維護保育類野生動物不力印象的重要原因之一。另外，來自於東南亞國家的野生動物產製品，其中不乏偽製品，以虎鞭為例，泰國、越南均有販賣，惟大多為牛筋混充之偽製品，眼鏡蛇膽可供入藥，價格高，經常有以其它蛇膽或雞鴨膽混充之情形。經常有消費糾紛發生。

我國自執行野生動物保育法以來常面臨野生動物或其產製品鑑定上的困擾。傳統鑑定物種的方法為進行蛋白質電泳、免疫及高效能液相層析（HPLC）等分析，主要係針對蛋白質特性進行鑑定，但因為蛋白質的存在並不具普遍性（非所有細胞一致，常隨細胞分化而有所不同），通常在動物死亡後即產生分解或變性，致無法進一步正確鑑別檢體的種屬。

近來，運用分子生物學技術進行物種辨識，已能有效解決上述問題。對生物個體而言，每一個細胞中去氧核糖核酸（deoxyribonucleic acid；DNA）所攜帶的遺傳訊息皆相同，並不因細胞種類而有差異，故不論檢體是血液、肌肉、骨骼、毛皮、甚或加工製品，鑑定結果均有一致性。此外，鑑定 DNA 所需檢體量亦較鑑定蛋白質為少，微量 DNA 經由複製特定片段，即可由此一片段的特徵遂行 DNA 鑑定。

DNA 分子的化學特性相當穩定，可經較長時間保存，只要其化學鍵結未產生嚴重斷裂情形，都可以運用分子生物技術分析鑑定。由於聚合^α連鎖反應(polymerase chain reaction ; PCR)方法的建立，利用粒線體 DNA(mitochondrial DNA ; mtDNA)序列分析鑑定動物種屬的技術，已簡易可行。目前以聚合^α連鎖反應配合粒線體 DNA 限制內切酵素片段長度多型性(restriction fragment length polymorphism ; RFLP)分析或粒線體 DNA 定序分析，已成為種屬鑑定或親緣鑑定的主要方法。

高等動物的粒線體 DNA 分子量大約是 16.5Kb (1Kb 為 1000 鹼基對)，為由雙股 DNA 分子構成的環狀結構。其中一股含較多數量的嘌呤(purines)氮鹼基，即腺嘌呤(adenine ; A)與鳥糞嘌呤(guanine ; G)，這兩種鹼基的分子量較大，故稱為重股(heavy strand 或 H-strand)；另一股則含較多數量的嘧啶(pyrimidines)氮鹼基，即胸腺嘧啶(thymine ; T)與胞嘧啶(cytosine ; C)，這兩種鹼基的分子量較小，故稱為輕股(light strand 或 L-strand)。

粒線體 DNA 序列包含了許多遺傳碼信息，有數個保留密碼區(Conserved coding region)，編譯 22 個 tRNA、2 個 rRNA、及 13 個酵素蛋白次元；及一個非密碼區(non-coding region)，粒線體 DNA

(mtDNA) 具有下列與細胞核染色體 DNA (Genomic DNA) 不同之特性：

- 一、通常哺乳類動物的細胞內粒線體存在數百至一萬個 mtDNA 分子，雖然它僅佔細胞內 DNA 總量的 1%，但它卻有極高複製數 (copy number) 的基因，此與細胞核染色體 DNA (nucleus chromosomal DNA ; genomic DNA) 僅有兩個基因存在不同，這些較多的基因，有利於在抽取量有限或高度腐敗的生物檢品時，mtDNA 較細胞核染色體 DNA 得到更多有利於基因分析的抽提量，PCR 複製之後會有更高的檢出成功率。
- 二、粒線體 DNA 普遍存在於所有動物細胞內，且不因組織不同而有差異。
- 三、粒線體 DNA 分子為環狀雙股螺旋結構，不易遭外核酸酵素 (exonuclease) 的分解，即使陳舊腐敗的檢品中(細胞核染色體 DNA 已遭分解)仍可能含有完整的粒線體 DNA 分子。
- 四、粒線體 DNA 之基因組為單倍體基因組，很少有重組現象發生，且缺乏修補系統 (repair system)，經過分析比較不同物種顯示，其演化突變的多態型較細胞核染色體 DNA 演化的速度快上 5 至 10 倍，這種高突變率表現在不同的生物種屬上，具有生物演化上的特異性

五、 整個粒線體 DNA 分子在 D-Loop 有兩個高變異區段，及低變異區段，可依研究目的設計不同引子 (primer)，探討物種分化及族群遺傳。

六、 粒線體 DNA 係由母系遺傳子代，在受精卵中有 99.9% 的粒線體是來自卵子，因此兄弟姊妹間、母親及所有與母系血緣相關的親屬都有相同序列的粒線體 DNA 結構，在人類演化上估計需有 50 至 300 個世代遺傳，方有可能產生一次突變機會。

由於粒線體 DNA 具有上述特性，人類學學者以分析粒線體 DNA 探討人類的演化過程，動物學學者則以分析粒線體 DNA 來瞭解動物種屬間的親疏遠近。

在動物種屬鑑定，大多以分析細胞色素 b (cytochrome *b*; *Cytb*) 基因區部份 DNA 序列，因為細胞色素 b 之胺基酸序列較為保守，但因遺傳密碼之退化簡併現象 (degenerate，意即數個密碼子對應於相同的胺基酸，例如密碼 GGU、GGC、GGA、GGG 都編製甘胺酸)，使得此基因在極親近種屬間都至少會有數個鹼基之差異，因此可分析細胞色素 b 基因序列以作為動物種屬鑑定的依據。

DNA 序列差異的情形可以區分為：

六、 核^三酸鹼基轉換 (transition)：同位置鹼基由一個嘌呤置換為另

一個嘍呤，(腺嘍呤 A 置換為鳥糞嘍呤 G，鳥糞嘍呤 G 置換為腺嘍呤 A); 或由一個嘍啖置換為另一個嘍啖(胸腺嘍啖 T 置換為胞嘍啖 C，胞嘍啖 C 置換為胸腺嘍啖 T)。

七、核^羊酸鹼基顛換 (transversion): 同位置鹼基由嘍呤置換為嘍啖或由嘍啖置換為嘍呤 (A T, A C, G T, G C, T A, T G, C A, C G)。

八、插入 (insertion): 序列中插入核^羊酸。

九、缺失 (deletion): 序列中核^羊酸缺失。

由於粒線體 DNA 細胞色素 b 是細胞體中具有重要功能的蛋白質，是粒線體產生能量的呼吸作用鏈 (respiration chain) 中黃色素蛋白—細胞色素系統 (flavoprotein-cytochrome system) 中的重要角色，所以在胺基酸序列上的變化較為保守，鹼基序列中極少發現有插入或缺失的情形，不致因為遺傳密碼 (genetic code) 的改變而造成胺基酸順序的破壞，即所謂「架構移動突變」而影響細胞色素 b 的功能。

另外，粒線體 DNA 中 COI、ND6、rRNA 等基因之定序分析，亦可提供有利的判別參考。

對於一些動物產製品，如經過加工製造的肉品、皮毛等，因為其中之細胞核染色體 DNA 大多已遭分解破壞，粒線體 DNA 鑑定遂成

為有效可行的鑑定方法。

本研究係進行動物粒線體 DNA 序列分析，研究有效正確的技術方法，從而建立基因基準比對資料庫，以應用於野生動物產製品鑑定案件，預期對於如經加工處理致使蛋白質變性、外型無法以形態學辨識或不能檢出細胞核染色體 DNA 等檢體無法鑑別的困境可以有效突破。

DNA 序列分析是一項操作步驟繁複且條件極嚴謹的鑑定工作，在過程中除試藥及反應物（尤其 DNA 模板）必須精確量測添加外，尚應特別注意防範任何可能的污染，採取品質檢測控制，由檢體前處理、萃取檢體 DNA 至定序聚合^α連鎖反應操作等，各個程序均環環相扣，不能有絲毫差錯。

一般說來，進行蛋白質電泳分析所採用的檢體必須使用新鮮檢體，但以 DNA 聚合^α連鎖反應進行分析鑑定時，檢體品質的要求就比較低，因為通常送鑑檢體多為產製品，如骨骼、皮毛、肉類等，基本上已無法就「新鮮度」多作要求。

在萃取檢體 DNA 技術上，除有機溶劑萃取法（酚/氯仿萃取）外，以樹脂交換萃取法（Chelex resin extraction）亦屬可行，此二種 DNA 萃取方法在比較上，以有機溶劑萃取法所萃取的檢體 DNA 分子較完

整，純度較高，但易造成檢體 DNA 損失。以樹脂交換萃取法再以純化過濾管將檢體 DNA 濃縮過濾，可得到較多量 DNA，但所得到的 DNA 為單鏈結構，無法進行核酸光學濃度定量，而粒線體 DNA 亦無法以 DNA 反轉點漬（DNA reverse dot blot）濃度定量。

引子設計方面，部份保育類野生動物可能因物種粒線體 DNA 具特殊序列，必須設計專一引子，此問題尚有待參考相關文獻，考慮引子的適用性，方能解決。

建立並累積不同種屬之 DNA 序列基準比對基因庫，是須要持續的一項工作。建立此基因庫除了消極性的做為查緝及鑑定保育類野生動物產製品的依據外，尚可應用於生態調查、探討族群遷徙、分析族群遺傳結構等積極性的保育作為。

雖然依據野生動物保護法及文化資產保存法，對於保育類野生動物之獵捕、販售均可科以刑責，但在實務上對於保育類野生動物，尤其是產製品如毛皮、肉類製品或骨、牙、角類等，在辨識上較易產生盲點，以至於進入司法程序後，由於 證的困難經常不能落實以處罰懲戒而收嚇阻的效果。以粒線體 DNA 細胞色素 b 片段序列區分動物種屬的鑑定方法，鑑定結果明確可信，是支援野生動物保育相關法令之執法快速且有效的工具。

運用分子生物學技術進行物種鑑識，必須有完整的基準比對資料庫，方能夠提供有效的鑑定結果，為建立完整的資料庫，亟需充實物種種類，以擴大比對空間，另外，增加各物種樣本數量，用以比對資料多形性。同時藉由申請巨分子分析帳號，以計算物種間的序列差異、遺傳距離及群體遺傳多態度，以提高分析鑑定結果的正確性，亦是努力的方向。

附件一

實驗技術

壹、實驗步驟綱要

- 一、 動物檢體或動物產製品檢體前處理
- 二、 萃取檢體 DNA (酚/氯仿萃取)
- 三、 過濾、純化 DNA
- 四、 DNA 濃度定量
- 五、 聚合^酶連鎖反應，複製擴增粒線體 DNA 細胞色素 b 片段
- 六、 過濾聚合^酶連鎖反應中未結合之引子與 dNTPs，電泳檢查複製擴增產物
- 七、 複製擴增產物進行定序聚合^酶連鎖反應
- 八、 酒精沈降純化定序聚合^酶連鎖反應產物
- 九、 以自動定序分析儀毛細管電泳，進行聚合^酶連鎖反應產物定序
- 十、 分析檢體粒線體 DNA 細胞色素 b 片段序列

貳、實驗方法：

一、動物檢體或動物產製品檢體前處理：

各種動物產製品檢體如血液、肌肉、器官組織、骨骼、角、毛之 DNA 萃取，需經不同的前處理程序，以避免污染或殘存蛋白質干擾，經前處理後的檢體，用蛋白質分解酵素 (proteinase K) 分離細胞內蛋白質與核酸後，再以酚/氯仿 (phenol/ chloroform) 萃取 DNA。

前處理程序所使用的蛋白質分解酵素溶液濃度為 10mg/ml，DTT (dithiothreitol) 溶液濃度為 39mM。

1. 血液類檢體前處理：

- (2) 取檢體 200 μ l，加入 1X SSC 緩衝溶液 200 μ l，置於 1.5ml 離心管中，混合均勻。
- (3) 桌上型離心機 14000rpm，離心五分鐘。
- (4) 留下底部約 20-30 μ l 細胞碎片，抽去其餘上清液。
- (5) 加入萃取緩衝溶液 (extraction buffer) 200 μ l，混合均勻。
- (6) 桌上型離心機 14000rpm，離心五分鐘。
- (7) 留下底部約 20-30 μ l 細胞碎片，抽去其餘上清液。
- (8) 加入萃取緩衝溶液 400 μ l，proteinase K 溶液 40 μ l，混合均勻。

(9)置於 37°C 溫箱或水浴器至少二~八小時。

(10)進行酚/氯仿萃取。

2. 肌肉、器官、組織類檢體前處理：

(1)取檢體約 0.5g，以剪刀儘量剪碎，置於 1.5ml 離心管中，加入 1ml 水，以震盪器劇烈震盪後靜置十分鐘。

(2)桌上型離心機短暫離心，抽去上清液。

(3)重複步驟(1)、(2)二~三次。

(4)於離心管中，加入 1ml 乙醚，以震盪器劇烈震盪後靜置三十分鐘。

(5)將乙醚倒入廢液回收容器中，依次以 70%酒精和水沖洗檢體以除去乙醚。

(6)加入萃取緩衝溶液 500 μ l，proteinase K 溶液 30 μ l，30 μ l DTT 溶液。

(7)置於 37°C 溫箱或水浴隔夜。

(8)進行酚/氯仿萃取。

3. 骨骼、角類檢體：

(1)將檢體清洗，乙醚脫脂，乾燥後以液態氮急速冷凍研磨成粉狀

- (2) 加入萃取緩衝溶液 500 μ l，proteinase K 溶液 30 μ l，30 μ l DTT 溶液
- (3) 置於 37°C 溫箱或水浴隔夜
- (4) 以震盪器劇烈震盪
- (5) 以灼熱大頭針在微量離心管的上蓋和底部各穿一孔，將離心管套入另一已剪斷上蓋的離心管中
- (6) 桌上型離心機 7000rpm，離心三分鐘
- (7) 取收集到之溶液進行酚/氯仿萃取

4. 毛髮類檢體：

- (1) 將檢體用清潔劑和水清洗乾淨
- (2) 以剪刀將檢體剪約 0.3cm 小段，置於微量研鉢內，加入萃取緩衝溶液 200 μ l 與 22 μ l DTT 溶液，研磨至檢體全溶
- (3) 收集溶液移轉到 1.5ml 離心管中，加入 proteinase K 溶液 5 μ l
- (4) 置於 37°C 溫箱或水浴隔夜
- (5) 進行酚/氯仿萃取

二、萃取檢體 DNA (酚/氯仿萃取):

酚與氯仿對人體均有危害，操作時應戴護目鏡及手套，並嚴格要求應在化學抽氣櫃中進行

1. 於檢體溶液中加入 500 μ l 酚，混合均勻。
2. 桌上型離心機 14000rpm，離心三分鐘。
3. 將上清液移至另一乾淨離心管中，加入酚：氯仿=25：24 混合液 500 μ l，混合均勻。
4. 桌上型離心機 14000rpm，離心三分鐘。
5. 將上清液移至另一離心管中，加入氯仿 500 μ l，混合均勻。
6. 桌上型離心機 14000rpm，離心三分鐘。
7. 將上清液移至另一離心管中，加入 1ml 絕對酒精，將離心管上下翻轉數次，置於-20 $^{\circ}$ C 冷凍十五分鐘。
8. 桌上型離心機 14000rpm，離心十五分鐘。
9. 抽去絕對酒精，加入 70%酒精 750 μ l，短暫震盪。
10. 桌上型離心機 14000rpm，離心十五分鐘。
11. 抽去 70%酒精，置於真空乾燥機中至 DNA 完全乾燥。
12. 加入 30 μ l TE 緩衝溶液或純水，置於 56 $^{\circ}$ C 水浴中一小時。

三、過濾純化 DNA：

以 Centricon 100 純化過濾管純化 DNA，即可得到純化的 DNA 檢體備用。(Centricon 100 過濾純化管操作步驟參照產品說明書進行)

四、DNA 濃度定量：

以本局現有之儀器設備，可操作 DNA 濃度定量之方法為：

(一) 核酸光學濃度定量：

1. Hoefer DyNA Quant 200 DNA 濃度測定儀：以內插法測定檢體吸光值在空白組與標準濃度 ($100\text{ng}/\mu\text{l}$ 或 $1000\text{ng}/\mu\text{l}$) 間曲線位置，計算檢體 DNA 濃度，所測得 DNA 濃度為檢體中所有 DNA 的濃度，包括檢體細胞核染色體 DNA 濃度、mtDNA 濃度及其它微生物之 DNA 濃度之總和，故以 DyNA Quant 200 DNA 濃度測定儀所測定的濃度值，為操作細胞色素 b 段聚合^α連鎖反應時檢體濃度的參考值。(操作步驟參照產品說明書進行)
2. GeneQuant II 核酸濃度計算儀：測定檢體吸光值，以計算檢體內核酸濃度，可顯示 (1) A260/ A280 比值；(2) 所選定核酸種類 (dsDNA、RNA、oligo DNA、oligo RNA 或 ssDNA) 的濃度數值；(3) 檢體內雜質 (蛋白質) 濃度；(4) 回收率百分比等數據。(操

作步驟參照產品說明書進行)

(二) DNA 反轉點漬 (DNA reverse dot blot) 濃度定量：

QuantiBlot DNA 濃度定量：檢體 DNA 經適當稀釋，固定於帶有特定探針 (probe) 的尼龍膜 (Biodyne B Nylon membrane) 上，經雜交及呈色，與 DNA 濃度系列標準品 (濃度分別為 1、0.5、0.25、0.125、0.0625、0.03125ng/ μ l) 所呈色強度比較，再換算回檢體 DNA 未經稀釋的原始濃度。此 DNA 濃度定量方法適用於靈長類動物檢體細胞核染色體 DNA 濃度定量，所得濃度數據較為準確，但 mtDNA 濃度無法以此方法測定。(操作步驟參照產品說明書進行)

五、聚合^{Taq}連鎖反應 (複製擴增粒線體 DNA 細胞色素 b 片段)：

(一) 將備用 DNA 檢體依所測得濃度稀釋為 1ng/ μ l。

(二) 細胞色素 b 基因核^酸引子委託廠商合成，序列為：

Cytb L： 5'—CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA—3'

Cytb H： 5'—CCCCTCAGAATGATATTTGTCCTC—3'

(三) 反應物：

在反應試管中加入 DNA 聚合^{Taq} (DNA polymerase)、10X 擴增反應緩

衝溶液 (10X amplification buffer)、細胞色素 b 基因核醣酸引子 (Cytb L 及 Cytb H)、及 DNA 檢體，各反應物量如下：

DNA 檢體 (濃度：1ng/ μ l)	10 μ l
DNA 聚合酶 (使用 Ampli Taq Gold)	0.5 μ l
10X 擴增反應緩衝溶液 (含 dNTPs)	2.5 μ l
細胞色素 b 基因核醣酸引子 Cytb L (1 pmole/ μ l)	5 μ l
細胞色素 b 基因核醣酸引子 Cytb H (1 pmole/ μ l)	5 μ l
純水	2 μ l
<hr/>	
反應物總體積	25 μ l

(四) 熱循環擴增反應：

以美商應用生命系統公司 (Applied Biosystems) 所製 Gene Amp PCR System 9700 型熱循環擴增反應器進行擴增反應，反應程式分起始反應，熱循環擴增反應及後續延伸 (Final Extension) 等三階段，各階段反應條件列於下表：

反 應	溫 度	時 間	循 環 數
起始反應	95°C	10 分鐘	1
熱循環擴增反應：			
變性 (Denature)	94°C	45 秒	30
黏合 (Annealing)	50°C	45 秒	
延伸 (Extension)	72°C	90 秒	
後續延伸 (Final Extension)	72°C	5 分鐘	1

擴增反應全部完成後，將反應產物取出，或將熱循環擴增反應器設定於 4°C 保存。

六、過濾聚合^α連鎖反應中未結合之引子與 dNTPs，電泳檢查複製擴增產物：

(一) 過濾聚合^α連鎖反應中未結合之引子與 dNTPs：

使用美商安瑪法亞 (Amersham Pharmacia Biotech Inc.) 公司產製 MicroSpin S-200 HR Columns 過濾離心管，將聚合^α連鎖反應中未結合之引子與 dNTPs 濾去，以純化擴增反應產物。(操作步驟參照產品說明書進行)

(二) 電泳檢查複製擴增產物 (粒線體 DNA 細胞色素 b 片段):

取複製擴增產物 1 μ l, 使用 Phast System 電泳儀, 以安瑪法亞 8- 25 梯度預鑄膠 (Pharmacia Phast Gradient Gel 8- 25), 進行電泳, 電泳後將電泳膠片以銀染法 (silver staining) 染色, 檢查複製擴增產物。(電泳儀操作步驟參照產品說明書進行), 粒線體 DNA 細胞色素 b 片段分子量約為 360bp, 電泳時的分子量比對標準為 50bp. DNA ladder, 濃度為 100ng/ μ l, 除對照分子量外, 亦可評估粒線體 DNA 細胞色素 b 片段複製擴增產物之濃度。

七、複製擴增產物進行定序聚合酶連鎖反應:

評估粒線體 DNA 細胞色素 b 片段複製擴增產物之濃度, 視需要適當稀釋, 以此檢體進行定序聚合酶連鎖反應。

使用美商應用生命系統公司產品 DNA Sequencing Kit; 進行 BigDye Terminator Cycle Sequencing

(一) 反應物：

粒線體 DNA 細胞色素 b 片段複製擴增產物 $4 \mu\text{l}$

Terminator Ready Reaction Mix $4 \mu\text{l}$

細胞色素 b 基因核糖酸引子 Cytb L 或 Cytb H ($1 \text{ pmole}/\mu\text{l}$) $2 \mu\text{l}$

反應物總體積 $10 \mu\text{l}$

(二) 反應條件：

反 應	溫 度	時 間	循 環 數
變性 (Denature)	96°C	10 秒	25
黏合 (Annealing)	50°C	5 秒	
延伸 (Extension)	60°C	4 分鐘	

八、酒精沈降純化定序聚合^γ連鎖反應產物：

定序聚合^γ連鎖反應完成後，以酒精沈降純化反應物，去除未反應的細胞色素 b 基因核糖酸引子 Cytb L 或 Cytb H 及 dye terminators，操作步驟為：

- (一) 定序聚合^α連鎖反應產物 10 μ l 移至 1.5ml 微量離心管中，加入 3M NaOAc 2 μ l，水 16 μ l 及 95%酒精 64 μ l；翻轉離心管數次，使溶液混合均勻。
- (二) 靜置十五分鐘，桌上型離心機 13000rpm，離心十五分鐘。
- (三) 吸除上層溶液。
- (四) 加入 70%酒精 200 μ l，短暫震盪。
- (五) 靜置十分鐘，桌上型離心機 13000rpm，離心十分鐘。
- (六) 吸除上層溶液，真空乾燥十分鐘。

九、以自動定序分析儀毛細管電泳，進行聚合^α連鎖反應產物定序：

加入 25 μ l Template Suppression Reagent 於酒精沈降純化之定序聚合^α連鎖反應產物中，於 95°C 加熱三分鐘，讓 DNA 變性（由雙股打開成單股），取出後迅速置於 4°C 冷凍盒或碎冰上，進行定序分析前保持於 4°C。

以美商應用生命系統公司 PRISM 310 自動定序分析儀進行毛細管電泳，分析檢體粒線體 DNA 細胞色素 b 序列。（自動定序分析儀操作步驟參照產品說明書進行）

十、分析檢體粒線體 DNA 細胞色素 b 片段序列：

應用美商應用生命系統公司 ABI PRISM DNA Sequencing analysis 和 Sequence Navigator 軟體同時比對粒線體 DNA 細胞色素 b 基因核醱酸引子 *Cytb L* 及 *Cytb H* 定序反應分別產生的結果，即可正確讀出粒線體 DNA 細胞色素 b 基因核醱酸序列。

將檢體的粒線體 DNA 細胞色素 b 基因核醱酸序列與資料庫中所有的序列比對，即可確認檢體的物種。

附件二

鑑定實驗結果

(疑似熊膽及犀牛角之鑑定)

附件二

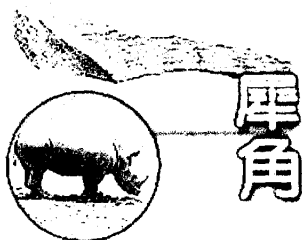
鑑定實驗結果

(疑似熊膽及犀牛角之鑑定)

農林字第0920137558號 (920713)



中藥圖鑑



分布： 分布尼泊爾、印度北部。同屬近緣動物亦供藥用，有爪哇犀（*R. sondaicus* DESMAREST）分布爪哇，蘇門犀（*R. sumaatrensis* (FISCHER) CUVIER）分布緬甸、泰國、馬來西亞、波羅洲等地，非洲犀（烏犀）（*R. bicornis* LINN.）分布非洲，白犀（*R. simus* BURCHELL）分布非洲。

來源： 本品為脊椎動物犀科印度犀（水犀）（*Rhinoceros unicornis* LINN.）及同屬近緣動物之角。

功用： 清熱，涼血，解毒，定驚。

主治： 傷寒瘟疫，驚狂譫語，發黃發斑，痘瘡黑陷，吐血，衄血，下血，癰疽腫毒。

貯藏： 置乾燥陰暗處，防生蟲及裂紋。

鑑別： 官能檢查--以色烏黑，光亮，完整無裂紋，鬚眼大，氣清香為佳。

藥理： 一.對心臟血管作用--本品水煎劑對正常及衰弱之離體蟾蜍心，兔心及蟾蜍在位心臟均有強心作用。

二.解熱作用--本品對因大腸菌發熱之家兔有解熱作用。



Healthnol.com

www.healthnol.com

[【返回上頁】](#)



Beautynol.com

Copyright © NetMedia Int'l Ltd. 2000




多年經驗盡分享
知識寶庫任君嘗



species profile

Reticulated python 網紋蟒
Python reticulatus
(Fitzinger, 1826)



aHERP.com

distribution : Southeast Asia;

Indonesia (*Ambon, Anambas Islands, Babi, Bacan, Banda Besar, Bangka, Bankak, Belitung, Boano, Buru, Butung, Enggano, Flores, Halmahera, Haruku, Java, Kalimantan, Krakatau, Lang, Lombok, Mentawai Archipelago, Natuna Archipelago, Nias, Obira, Riau Archipelago, Saparua, Seram, Simeulue, Sula Archipelago, Sulawesi, Sumatra, Sumba, Sumbawa, Tanimbar, Ternate, Timor, Verlate, We*),

Philippines (*Basilan, Bohol, Cebu, Leyte, Luzon, Mindanao, Mindoro, Negros, Palawan: Calamian Islands etc, Panay, Polillo, Samar, Tawi-Tawi, Sulu Archipelago*),




India (*Nicobar Islands*), Malaysia (*Malaya and East Malaysia*), Bangladesh, Brunei Darussalam, Cambodia, Laos, western Malaysia, Myanmar, Singapore, Thailand, Vietnam

biome :  **arboreal** 樹棲性
solitary;
rainforests

adult size : 20 - 25 feet; individuals exceed 35 feet;

the world's longest snake (the largest/heaviest is Green anaconda, Eunectes murinus - a 20-foot Green anaconda may overweigh a 35-foot Reticulated python)

hatchling size : 2 - 3 feet

temperatures :  31C  27C  24C

humidity : 70 - 80 %

diet :  **carnivorous** 肉食性

any fit-sized mammals and birds (e.g. rats, chickens, ducks, rabbits, cats, dogs, boars, pigs, goats, monkeys, donkeys, deers, cattles, and even humans)

appetite : excellent

circadian cycle :



Model 310
Version 3.0
Basecaller-310POP6.bcg920713-1 CyoB-L
BC 1.3.0.0

920713-1 CyoB-L8-6-03-#592.ab1
Signal GZ16 A:1464 T:951 C:1067
DT POP6IBD Set:AnyPrimer;.mob
seq-wtc.mtx
Points 1516 to 6880 Base 1: 1516

Page 1 of 2
Thu, Aug 7, 2003 10:08 AM
Wed, Aug 6, 2003 12:11 AM
Spacing: 11.77(11.77)

10230
N T T T C A A T A C T A A C N G T N T A G C T T A C A A G T A C T A A C C G G C T T T T T C C T A G C C G T C C A T T A C A C A G C A A A C A T T A A C C T A G C A T T T T C A T C C A T C C A C A T C

A C C C G A G A C G T C C C A T A C G G C T G A A T A T A C A A A A C C T T C A C G C T A T C G G A G C A T C C A T A T T C T T C A T C T G C A T C T A C A T C C A C A T C G C A G A G G C C T A T A C T A C G G

250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350
A T C A T A C C T C A A C A A A G A A A C C T G A A T A T C A G G C A T C A C C C T A C T C A T C A C A C T A A T A G C C A C C G C T T T T C G G T T A C G T C C T T C C A T G A G G A C A A A T A T A T T T G G

GGG

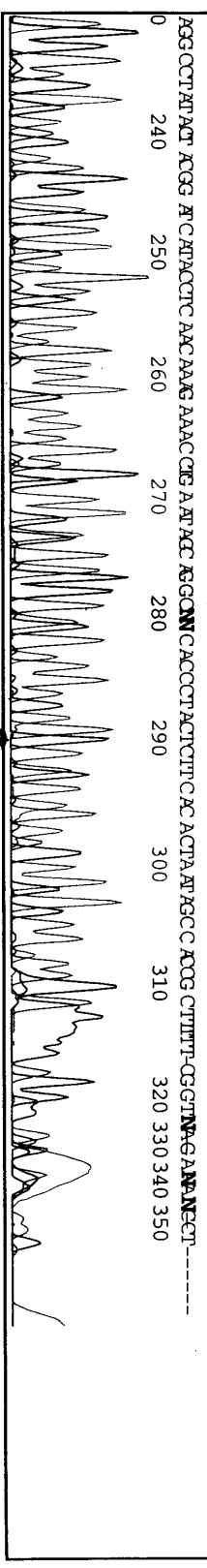
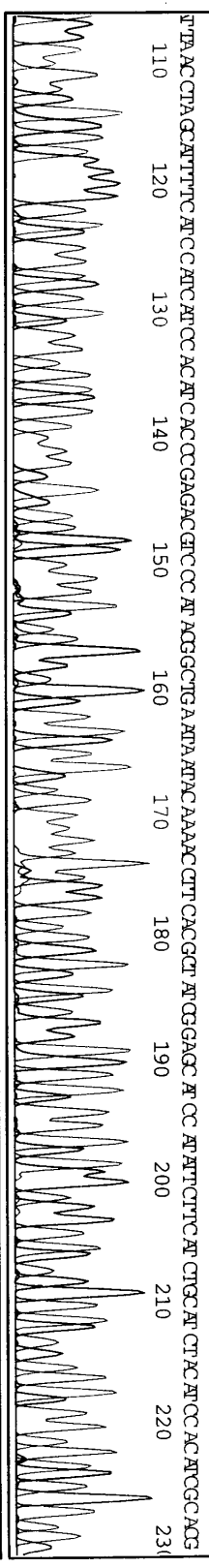
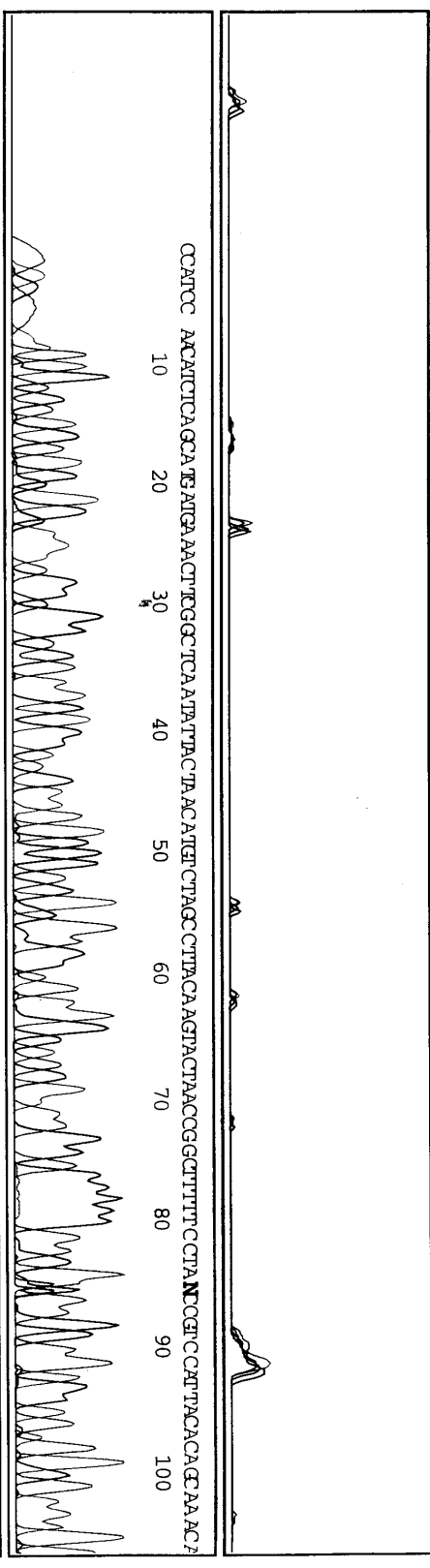




Model 310
 Version 3.0
 Basecaller-310POP6.bc920713-1 CytoB-H
 BC 1.3.0.0
 Lane 2

Signal G:1555 A:1144 T:790 C:492
 DT POP6(BD Set-AhlyPrimer).mob
 seq-w/c.mtx
 Points 1397 to 6680 Base 1: 1397

Page 1 of 1
 Wed, Aug 6, 2003 5:41 PM
 Wed, Aug 6, 2003 1:15 AM
 Spacing: 11.25(11.25)

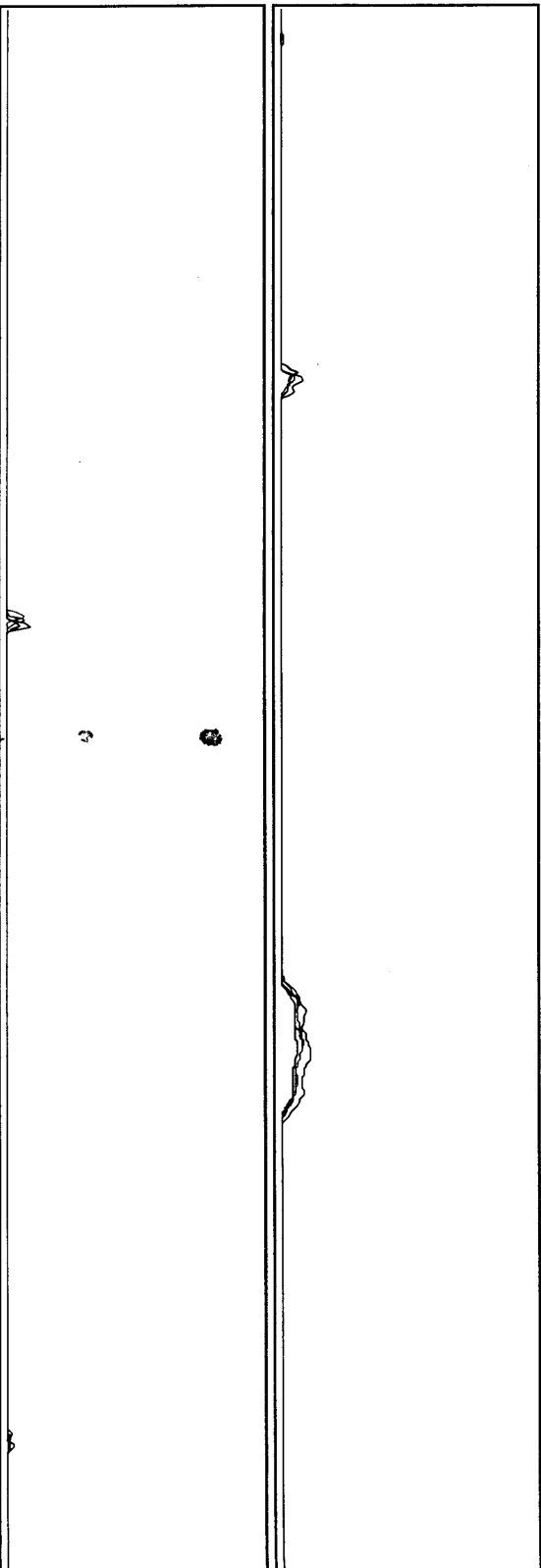
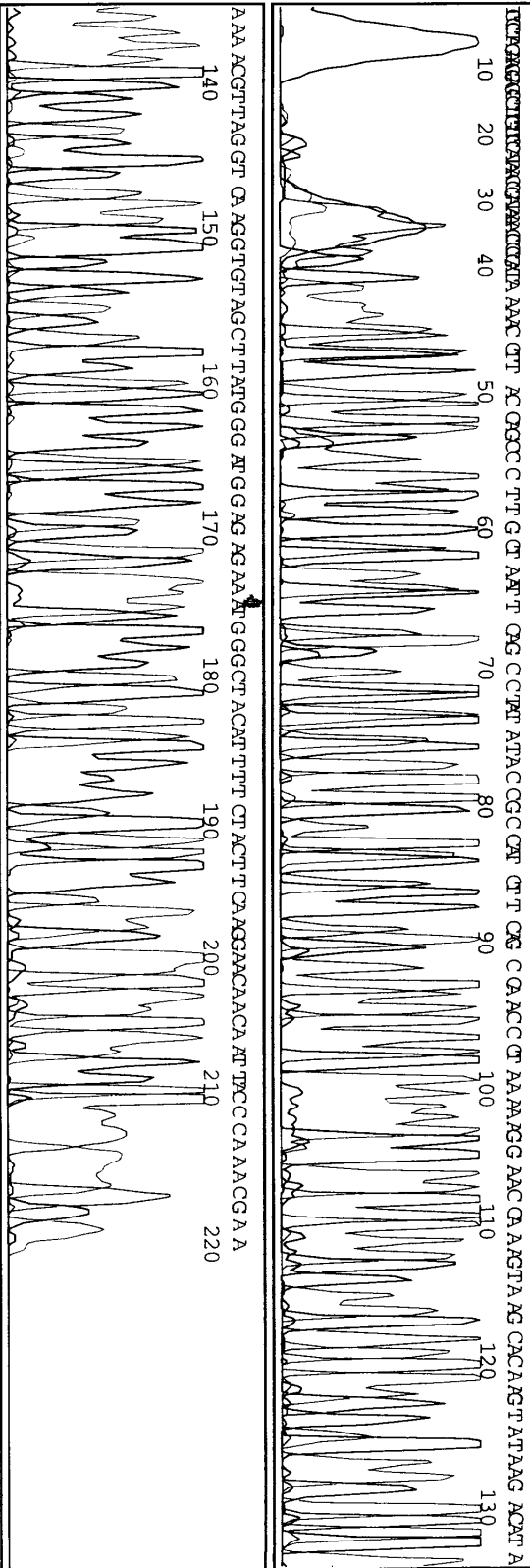




Model 310
Version 3.0
Basecaller-310POP6.bq920713-2.Rinos553
BC 1.3.0.0 Lane 3

Signal G:724 A:1278 T:589 C:692
DT POP6[BD Set:AnyPrimer].mob
seq-w/c.mtx
Points 1428 to 6680 Base 1: 1428

Page 1 of 2
Thu, Aug 7, 2003 9:24 AM
Wed, Aug 6, 2003 2:12 AM
Spacing: 11.77(11.77)

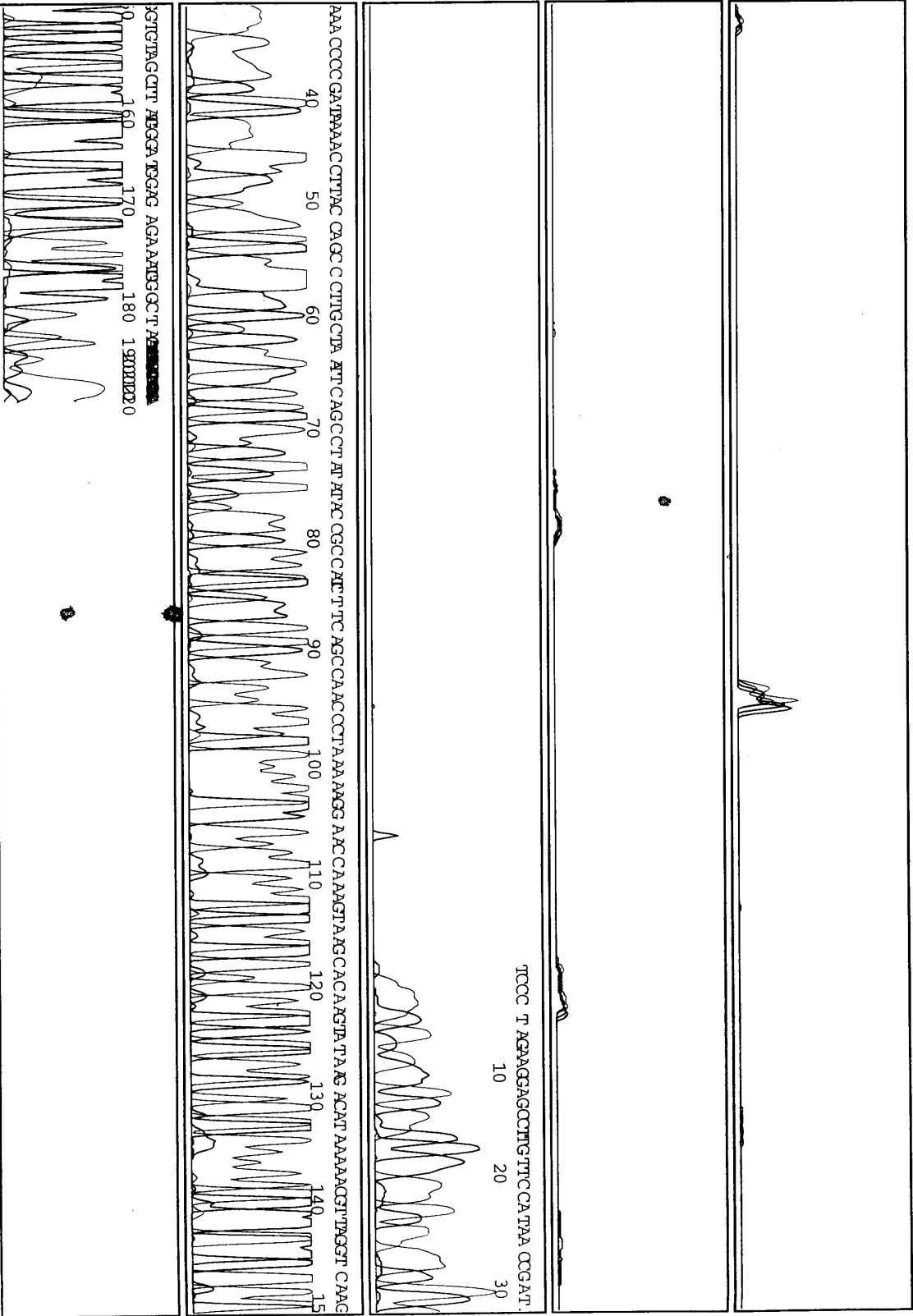




Model 310
 Version 3.0
 Basecaller-310POP6 bog920713-2 Rino747
 BC 1.3.0.0 Lane 4

920713-2 Rino7478-6-03 #B29.ab1
 Signal G:711 A:499 T:494 C:424
 DT POP6(BD Set-Any/Primer).mob
 seq-w/c.mtx
 Points 1597 to 6680 Base 1: 1597

Page 1 of 1
 Thu Aug 7, 2003 9:24 AM
 Wed, Aug 6, 2003 3:09 AM
 Spacing: 11,13(11,13)

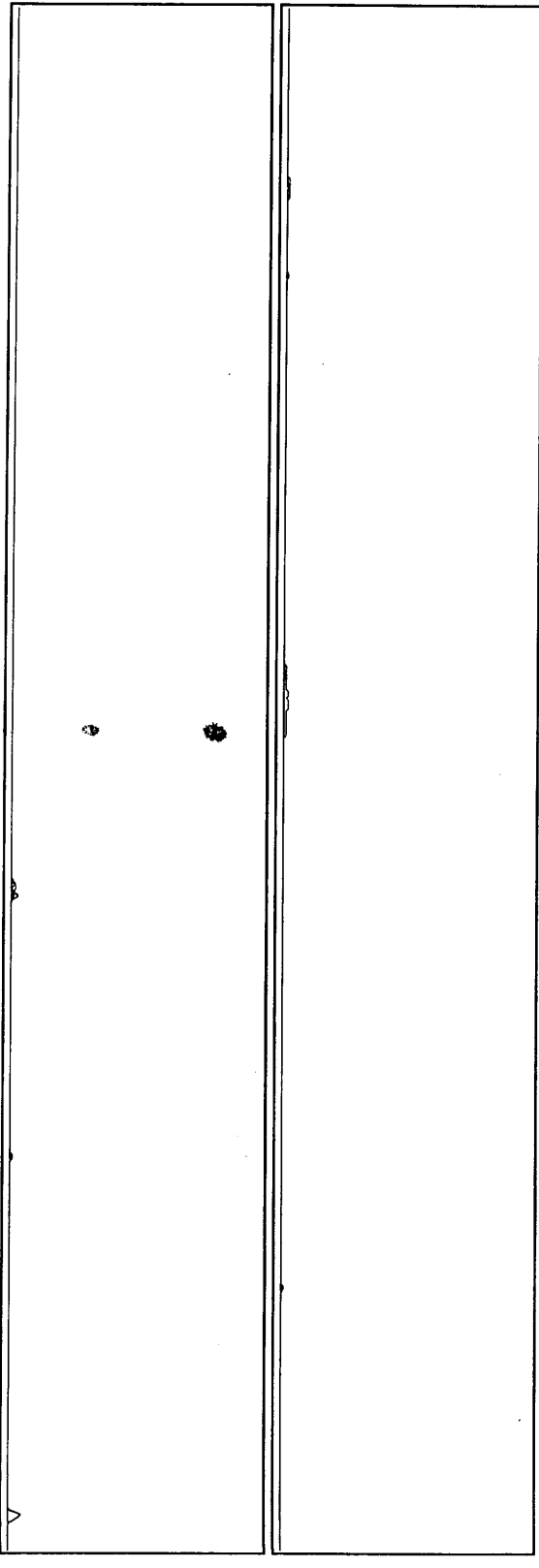
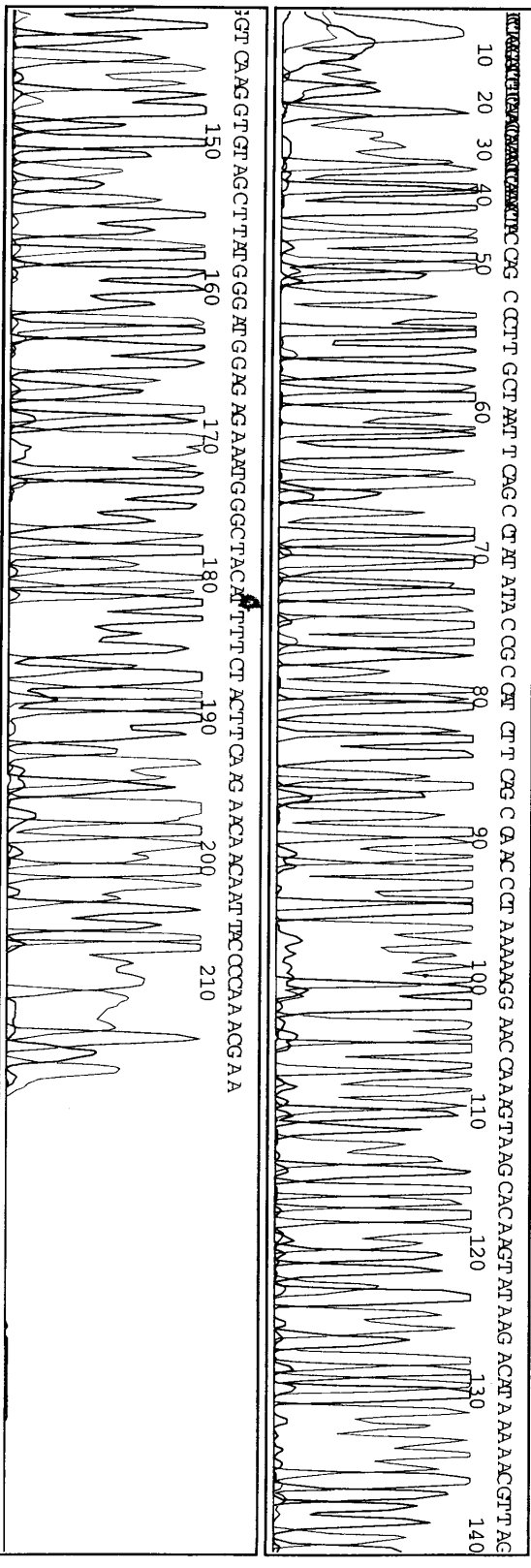




Model 310
 Version 3.0
 Basecaller-310POP6.bc920713-3.Rinos553
 BC 1.3.0.0
 Lane 5

920713-3.Rinos5538-6-03-#ATF.ab1
 Signal G:549 A:955 T:416 C:529
 DT POP6(BD Set:AnyPrimer).mob
 seq-w/c.mtx
 Points 1489 to 6680 Base 1: 1489

Page 1 of 2
 Thu, Aug 7, 2003 10:03 AM
 Wed, Aug 6, 2003 4:07 AM
 Spacing: 11.01(11.01)



Sequence Similarity Search Results

Page 1 of 20

(Nucleotide) FASTA of: 920713-1_CytoB from: 1 to: 358 August 7, 2003 03:31

REFORMAT of: 920713-1_CytoB.853667 check: 4219 from: 1 to: 358 August 6, 2003 17:47
(No documentation)

TO: genemlplus:* Sequences: 19,558,173 Symbols: 33,250,844,483 Word Size: 6

Sequences too short to analyze: 458 (1637 symbols)

Databases searched:

GenBank, Release 134.0, Released on 14Feb2003, Formatted on 15Feb2003
GenBank_EST, Release 134.0, Released on 14Feb2003, Formatted on 15Feb2003
GenBank_GSS, Release 134.0, Released on 14Feb2003, Formatted on 15Feb2003
EMBL, Release 73.0, Released on 16Dec2002, Formatted on 16Feb2003
EMBL_EST, Release 73.0, Released on 16Dec2002, Formatted on 16Feb2003
EMBL_GSS, Release 73.0, Released on 16Dec2002, Formatted on 16Feb2003
GB_TagsNew, Release 1.0, Released on 23May2003, Formatted on 23May2003
GenBankNew, Release 1.0, Released on 23May2003, Formatted on 23May2003

Minimum search sequence length: 1

Maximum search sequence length: 350000

Searching with both strands of the query.

Scoring matrix: fastadna.cmp Constant pamfactor used

Gap creation penalty: 16 Gap extension penalty: 4

Histogram Key:

Each histogram symbol represents 29903 search set sequences

Each inset symbol represents 718 search set sequences

z-scores computed from opt scores

z-score	obs	exp	
	(=)	(*)	
< 20	97719	0	=====
22	538	0	=
24	823	18	*
26	1806	410	*
28	3125	4427	*
30	12586	26895	*
32	46003	103994	== *
34	149704	282018	===== *
36	395229	579200	===== *
38	727655	957201	===== *
40	1192981	1335212	===== *
42	1611299	1632134	===== *
44	1697430	1800395	===== *
46	1794168	1833747	===== *
48	1779076	1755601	===== *
50	1592643	1601993	===== *
52	1445959	1408419	===== *
54	1260210	1203037	===== *

Sequence Similarity Search Results

```

56 1064784 1004904:=====**==
58 905403 825008:=====**==
60 747688 668305:=====**==
62 603014 535780:=====**==
64 497349 426106:=====**==
66 396782 336778:=====**==
68 314996 264904:=====**==
70 253572 207596:=====**==
72 199728 162214:=====**==
74 155923 126474:=====**==
76 123424 98438:=====**==
78 95223 76514:=====**==
80 75560 59412:=====**==
82 60456 45448:=====**==
84 47151 36002:=====**==
86 37321 27854:=====**==
88 29006 21554:=====**==
90 23391 16678:=====**==
92 18262 12902:=====**==
94 14052 9984:=====**==
96 11710 7726:=====**==
98 9886 5978:=====**==
100 6702 4624:=====**==
102 5687 3578:=====**==
104 4478 2770:=====**==
106 3392 2142:=====**==
108 2569 1658:=====**==
110 1880 1282:=====**==
112 1480 994:=====**==
114 1085 766:=====**==
116 815 596:=====**==
118 561 458:=====**==
>120 35889 356:=====**==

```

Joining threshold: 49, opt. threshold: 34, opt. width: 16, reg.-scaled

Sequence	Strand	Description	init1	init2	opt	z-sc	E Score
GB_OV:PRU69860 alignment	+	U69860 Python reticulatus cytochrom...	1737	1737	1743	1843.3	1.6e-95
GB_OV:PRU69859 alignment	+	U69859 Python reticulatus cytochrom...	1728	1728	1734	1833.7	5.5e-95
GB_OV:AY014888 alignment	+	AY014888 Python reticulatus from In...	1670	1670	1670	1771.8	5e-91
GB_OV:AY014895 alignment	+	AY014895 Python reticulatus from Vi...	1670	1670	1670	1771.8	5e-91
GB_OV:AY014887 alignment	+	AY014887 Python reticulatus jampean...	1661	1661	1661	1762.3	1.7e-90
GB_OV:AY014889 alignment	+	AY014889 Python reticulatus from Ma...	1661	1661	1661	1762.3	1.7e-90
GB_OV:AY014885 alignment	+	AY014885 Python reticulatus jampean...	1661	1661	1661	1762.3	1.7e-90
GB_OV:AY014896 alignment	+	AY014896 Python reticulatus from In...	1661	1661	1661	1762.3	1.7e-90
GB_OV:AY014886 alignment	+	AY014886 Python reticulatus jampean...	1661	1661	1661	1762.3	1.7e-90
GB_OV:AY014891 alignment	+	AY014891 Python reticulatus from In...	1607	1607	1607	1704.8	2.7e-87
GB_OV:AY014892 alignment	+	AY014892 Python reticulatus saputra...	1589	1589	1589	1685.7	3.1e-86
GB_OV:AY014893 alignment	+	AY014893 Python reticulatus saputra...	1586	1586	1586	1682.5	4.7e-86
GB_OV:AY014894 alignment	+	AY014894 Python reticulatus saputra...	1586	1586	1586	1682.5	4.7e-86
GB_OV:PRU69862 alignment	+	U69862 Python reticulatus cytochrom...	1577	1577	1583	1679.0	7e-86
GB_OV:AF241402 alignment	+	AF241402 Morelia amethystina isolat...	1539	1539	1545	1635.1	1e-83

FastA Alignments for 920713-1_CytoB

GB_OV:PRU69860 Begin: 47 End: 400
! U69860 Python reticulatus cytochrom... 1737 1737 1743 1843.3 1.6e-95
GB_OV:PRU69859 Begin: 47 End: 400
! U69859 Python reticulatus cytochrom... 1728 1728 1734 1833.7 5.5e-95
GB_OV:AY014888 Begin: 11 End: 344
! AY014888 Python reticulatus from In... 1670 1670 1670 1771.8 5e-91
GB_OV:AY014895 Begin: 11 End: 344
! AY014895 Python reticulatus from Vi... 1670 1670 1670 1771.8 5e-91
GB_OV:AY014887 Begin: 11 End: 344
! AY014887 Python reticulatus jampean... 1661 1661 1661 1762.3 1.7e-90

Alignment of 920713-1_CytoB to GB_OV:PRU69860

SCORES Initl: 1737 Initn: 1737 Opt: 1743 z-score: 1843.3 E(): 1.6e-95
>>GB_OV:PRU69860 (1114 nt)
initn: 1737 initl: 1737 opt: 1743 Z-score: 1843.3 expect(): 1.6e-95
99.2% identity in 354 nt overlap
(2-355:47-400)

```

                                     10      20      30
920713-1_Cyt                      CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAACTTCG
                                     || ||||| ||||| | ||||| |||||
PRU69860      TCCTAACCTTATTTGGCCTTCTACCAGTAGCAACCAACATCTCAACCTGATGAAACTTCG
                20      30      40      50      60      70
                40      50      60      70      80      90
920713-1_Cyt GCTCAATATTACTAACATGTCTAGCCTTACAAGTACTAACCGGCTTTTCCTAGCCGTC
|||||
PRU69860      GCTCAATATTACTAACATGTCTAGCCTTACAAGTACTAACCGGCTTTTCCTAGCCGTC
                80      90      100     110     120     130
                100     110     120     130     140     150
920713-1_Cyt ATTACACAGCAAACATTAACCTAGCATTTTCATCCATCATCCACATCACCCGAGACGTCC
|||||
PRU69860      ATTACACAGCAAACATTAACCTAGCATTTTCATCCATCATCCACATCACCCGAGACGTCC
                140     150     160     170     180     190
                160     170     180     190     200     210
920713-1_Cyt CATACGGCTGAATAATACAAAACCTTCACGCTATCGGAGCATCCATATCTTCATCTGCA
|||||
PRU69860      CATACGGCTGAATAATACAAAACCTTCACGCTATCGGAGCATCCATATCTTCATCTGCA
                200     210     220     230     240     250
                220     230     240     250     260     270
```

```

920713-1_Cyt TCTACATCCACATCGCAGGAGCCTATACTACGGATCATACCTCAACAAGAAACCTGAA
|||||
PRU69860 TCTACATCCACATCGCAGGAGCCTATACTACGGATCATACCTCAACAAGAAACCTGAA
260 270 280 290 300 310
280 290 300 310 320 330
920713-1_Cyt TATCAGGCATCACCCCTACTCATCACAATAAGCCACCGCTTTTTTCGGTTACGTCCTTC
|||||
PRU69860 TATCAGGCATCACCCCTACTCATCACAATAAGCCACCGCTTTTTTCGGTTACGTCCTTC
320 330 340 350 360 370
340 350
920713-1_Cyt CATGAGGACAAATATCATTCTGAGGGG
|||||
PRU69860 CATGAGGACAAATATCATTCTGAGCCGCAACCGTAATTACAAACCTACTACTGCCGTAC
380 390 400 410 420 430

```

Alignment of 920713-1_CytoB to GB_OV:PRU69859

```

SCORES Initl: 1728 Initn: 1728 Opt: 1734 z-score: 1833.7 E(): 5.5e-95
>>GB_OV:PRU69859 (1114 nt)
initn: 1728 initl: 1728 opt: 1734 Z-score: 1833.7 expect(): 5.5e-95
98.9% identity in 354 nt overlap
(2-355:47-400)

```

```

10 20 30
920713-1_Cyt CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAACTTCG
|| ||||| |||
PRU69859 TCCTAACCTTATTTGGCCTTCTACCAGTAGCAACCAACATCTCAACCTGATGAAACTTCG
20 30 40 50 60 70
40 50 60 70 80 90
920713-1_Cyt GCTCAATATTACTAACATGTCTAGCCTTACAAGTACTAACCGGCTTTTTCTAGCCGTCC
|||||
PRU69859 GCTCAATATTACTAACATGTCTAGCCTTACAAGTACTAACCGGCTTTTTCTAGCCGTCC
80 90 100 110 120 130
100 110 120 130 140 150
920713-1_Cyt ATTACACAGCAAACATTAACCTAGCATTTTCATCCATCATCCACATCACCCGAGACGTCC
|||||
PRU69859 ATTACACAGCAAACATTAACCTAGCATTTTCATCCATCATCCACATCACCCGAGACGTCC
140 150 160 170 180 190
160 170 180 190 200 210
920713-1_Cyt CATACGGCTGAATAATAACAAACCTTCACGCTATCGGAGCATCCATATTCTTCATCTGCA
|||||
PRU69859 CATACGGCTGAATAATAACAAACCTTCACGCTATCGGAGCATCCATATTCTTCATCTGCA

```

```

          200      210      220      230      240      250
                220      230      240      250      260      270
920713-1_Cyt TCTACATCCACATCGCACGAGGCCTATACTACGGATCATACTCAACAAGAAACCTGAA
                |||
PRU69859      TCTACATCCACATCGCACGAGGCCTATACTACGGATCATACTCAACAAGAAACCTGAA
                260      270      280      290      300      310
                280      290      300      310      320      330
920713-1_Cyt TATCAGGCATCACCCCTACTCATCACAATAAGCCACCGCTTTTTTCGGTTACGTCCTTC
                |||
PRU69859      TATCAGGCATCACCCCTACTCATCACAATAAGCCACCGCTTTTTTCGGTTACGTCCTTC
                320      330      340      350      360      370
                340      350
920713-1_Cyt CATGAGGACAAATATCATTCTGAGGGG
                |||
PRU69859      CATGAGGACAAATATCATTCTGAGCCGCAACCGTAATTACAAACCTACTACTGCCGTAC
                380      390      400      410      420      430

```

Alignment of 920713-1_CytoB to GB_OV:AY014888

```

SCORES  Initl: 1670  Initn: 1670  Opt: 1670  z-score: 1771.8 E(): .5e-91
>>GB_OV:AY014888 (345 nt)
  initn: 1670  initl: 1670  opt: 1670  Z-score: 1771.8  expect(): 5e-91
  100.0% identity in 334 nt overlap
  (1-334:11-344)

```

```

          10      20      30      40      50
920713-1_Cyt      CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAACTTCGGCTCAATATTACTAACATG
                |||
AY014888      TAAAAAGCTTCCATCCAACATCTCAGCATGATGAAACTTCGGCTCAATATTACTAACATG
          10      20      30      40      50      60
          60      70      80      90      100      110
920713-1_Cyt TCTAGCCTTACAAGTACTAACCGGCTTTTCCTAGCCGTCATTACACAGCAACATTAA
                |||
AY014888      TCTAGCCTTACAAGTACTAACCGGCTTTTCCTAGCCGTCATTACACAGCAACATTAA
          70      80      90      100      110      120
          120      130      140      150      160      170
920713-1_Cyt CCTAGCATTTTCATCCATCATCCACATCACCCGAGACGTCCCATACGGCTGAATAATACA
                |||
AY014888      CCTAGCATTTTCATCCATCATCCACATCACCCGAGACGTCCCATACGGCTGAATAATACA
          130      140      150      160      170      180
          180      190      200      210      220      230
920713-1_Cyt AAACCTTCACGCTATCGGAGCATCCATATTCTTCATCTGCATCTACATCCACATCGCACG

```

```

|||||
AY014888 AAACCTTCACGCTATCGGAGCATCCATATTCTTCATCTGCATCTACATCCACATCGCAGC
          190      200      210      220      230      240
          240      250      260      270      280      290
920713-1_Cyt AGGCCTATACTACGGATCATACTCAACAAAGAAACCTGAATATCAGGCATCACCTACT
|||||
AY014888 AGGCCTATACTACGGATCATACTCAACAAAGAAACCTGAATATCAGGCATCACCTACT
          250      260      270      280      290      300
          300      310      320      330      340      350
920713-1_Cyt CATCACACTAATAGCCACCGCTTTTTTCGGTTACGTCCTTCCATGAGGACAAATATCATT
|||||
AY014888 CATCACACTAATAGCCACCGCTTTTTTCGGTTACGTCCTTCCATN
          310      320      330      340

920713-1_Cyt CTGAGGGG

```

Sequence Similarity Search Results

Page 1 of 20

(Nucleotide) FASTA of: 920713-2_Rino5538 from: 1 to: 220 August 8, 2003 05:55

REFORMAT of: 920713-2_Rino5538.869561 check: 3415 from: 1 to: 220 August 7, 2003 11:35

(No documentation)

TO: genemblplus:* Sequences: 19,558,173 Symbols: 33,250,844,483 Word Size: 6

Sequences too short to analyze: 458 (1637 symbols)

Databases searched:

GenBank, Release 134.0, Released on 14Feb2003, Formatted on 15Feb2003
 GenBank_EST, Release 134.0, Released on 14Feb2003, Formatted on 15Feb2003
 GenBank_GSS, Release 134.0, Released on 14Feb2003, Formatted on 15Feb2003
 EMBL, Release 73.0, Released on 16Dec2002, Formatted on 16Feb2003
 EMBL_EST, Release 73.0, Released on 16Dec2002, Formatted on 16Feb2003
 EMBL_GSS, Release 73.0, Released on 16Dec2002, Formatted on 16Feb2003
 GB_TagsNew, Release 1.0, Released on 23May2003, Formatted on 23May2003
 GenBankNew, Release 1.0, Released on 23May2003, Formatted on 23May2003

Minimum search sequence length: 1

Maximum search sequence length: 350000

Searching with both strands of the query.

Scoring matrix: fastadna.cmp Constant pamfactor used

Gap creation penalty: 16 Gap extension penalty: 4

Histogram Key:

Each histogram symbol represents 33989 search set sequences

Each inset symbol represents 269 search set sequences

z-scores computed from opt scores

z-score	obs (=)	exp (*)
< 20	190088	0:=====
22	391	0:=
24	453	18:*
26	760	411:*
28	2261	4432:*
30	5852	26927:*
32	21232	104116:= *
34	90897	282349:== *
36	257003	579879:===== *
38	714112	958325:===== *
40	1209482	1336778:===== *
42	1752764	1634049:===== *
44	2039321	1802508:===== *
46	1974657	1835899:===== *
48	1951473	1757661:===== *
50	1698090	1603873:===== *
52	1497758	1410072:===== *
54	1261825	1204449:===== *

56	1025932	1006083:	=====*
58	837829	825976:	=====*
60	662822	669089:	=====*
62	529999	536410:	=====*
64	421261	426604:	=====*
66	326011	337176:	=====*
68	251828	265214:	=====*
70	191899	207838:	=====*
72	148659	162406:	=====*
74	114563	126622:	=====*
76	87698	98552:	=====*
78	68043	76604:	=====*
80	54995	59482:	=====*
82	39237	45502:	=====*
84	28469	36044:	=====*
86	22015	27888:	=====*
88	16725	21578:	=====*
90	12126	16698:	=====*
92	8952	12918:	=====*
94	6824	9996:	=====*
96	5358	7734:	=====*
98	3546	5984:	=====*
100	3112	4630:	=====*
102	2802	3584:	=====*
104	1788	2772:	=====*
106	1125	2144:	=====*
108	837	1660:	=====*
110	616	1284:	=====*
112	443	994:	=====*
114	325	768:	=====*
116	269	596:	=====*
118	200	460:	=====*
>120	13446	356:	=====*

Joining threshold: 47, opt. threshold: 32, opt. width: 16, reg.-scaled

Sequence	Strand	Description	init1	init2	opt	z-sc	E Score
GB_OM:RUMTGENOM alignment	+	X97336 Rhinoceros unicornis complet... 印度犀	780	810	1002	903.8	2.3e-44
GB_OM:RSO245724 alignment	+	AJ245724 Rhinoceros sondaicus mitoc...	724	805	957	874.4	1.7e-41
GB_OM:MTCSXX alignment	+	Y07726 Ceratotherium simum complete...	658	868	939	846.2	3.7e-41
GB_OM:DSU245722 alignment	+	AJ245722 Dicerorhinus sumatrensis m...	534	534	950	867.9	3.9e-41
GB_OM:DBI245721 alignment	+	AJ245721 Diceros bicornis mitochond...	698	899	948	866.1	5e-41
GB_OM:AF191837 alignment	+	AF191837 Diceros bicornis 12S ribos...	698	899	948	869.7	7.6e-41
GB_OM:CS12SRRNA alignment	+	X86942 C.simum mitochondrial 12S rR...	713	833	923	843.3	9.3e-40
GB_OM:AF191834 alignment	+	AF191834 Tapirus bairdii 12S riboso...	687	687	838	769.0	2.9e-35
GB_OM:AF038012 alignment	+	AF038012 Tapirus pinchaque 12S ribo...	665	665	813	742.8	3.7e-34

FastA Alignments for 920713-2_Rino553

```

GB_OM:RUMTGENOM   Begin: 617 End: 831
! X97336 Rhinoceros unicornis complet... 780 810 1002 903.8 2.3e-44
GB_OM:RSO245724   Begin: 546 End: 760
! AJ245724 Rhinoceros sondaicus mitoc... 724 805 957 874.4 1.7e-41
GB_OM:MTCSXX      Begin: 615 End: 829
! Y07726 Ceratotherium simum complete... 658 868 939 846.2 3.7e-41
GB_OM:DSU245722   Begin: 546 End: 761
! AJ245722 Dicerorhinus sumatrensis m... 534 534 950 867.9 3.9e-41
GB_OM:DBI245721   Begin: 547 End: 761
! AJ245721 Diceros bicornis mitochond... 698 899 948 866.1 5e-41
  
```

Alignment of 920713-2_Rino553 to GB_OM:RUMTGENOM

```

SCORES   Init1: 780   Initn: 810   Opt: 1002   z-score: 903.8 E(): 2.3e-44
>>GB_OM:RUMTGENOM                               (16829 nt)
  initn: 810 init1: 780 opt: 1002 Z-score: 903.8 expect(): 2.3e-44
  97.7% identity in 219 nt overlap
  (2-220:617-831)
  
```

```

                                     10      20      30
920713-2_Rin                        TCCCTAGAAGGAGCCTTGTTCATAACCGAT
                                     |||||  |||||  |||||
RUMTGENOM   ACTCAAAGGACTTGGCGGTGCTTTATATCCCCCTAG-AGGAGCC-TGTTCCATAACCGAT
          590      600      610      620      630      640
          40      50      60      70      80      90
920713-2_Rin AAACCCCGATAAAACCTTACCAGCCCTTGCTAATTCAGCCTATATACCGCCATCTTCAGC
          |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
RUMTGENOM   AAACCCCGAT-AAACCTTACCAGCCCTTGCTAATTCAGCCTATATACCGCCATCTTCAGC
          650      660      670      680      690      700
          100     110     120     130     140     150
920713-2_Rin CAACCCTAAAAAGGAACCAAAGTAAGCACAAAGTATAAGACATAAAAAACGTTAGGTCAAGG
          |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
RUMTGENOM   CAACCCTAAAAAGGAACCAAAGTAAGCACAAAGTATAAGACATAAAAAACGTTAGGTCAAGG
          710      720      730      740      750      760
          160     170     180     190     200     210
920713-2_Rin TGTAGCTTATGGGATGGAGAGAAATGGGCTACATTTTCTACTTCAAGGAACAACAATTAC
          |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
RUMTGENOM   TGTAGCTTATGGGATGGAGAGAAATGGGCTACATTTTCTACTTCAA-GAACAACTAC
          770      780      790      800      810      820
          220
  
```


920713-2_Rin CCAAACGAA
 |||
 RUMTGENOM CCAAACGAAGGCTTTTATGAAATAAAAGCTAAAGGAGGATTTAGCAGTAAATTAAGAAT
 830 840 850 860 870 880

Alignment of 920713-2_Rino553 to GB_OM:RSO245724

SCORES Initl: 724 Initn: 805 Opt: 957 z-score: 874.4 E(): 1.7e-41
 >>GB_OM:RSO245724 (969 nt)
 initn: 805 initl: 724 opt: 957 Z-score: 874.4 expect(): 1.7e-41
 95.4% identity in 219 nt overlap
 (2-220:546-760)

					10	20	30
920713-2_Rin					TCCCTAGAAGGAGCCTTGTTC	CATAACCGAT	
RSO245724	ACTCAAAGGACTTGGCGGTGCTTTATATCC						
	520	530	540	550	560	570	
	40	50	60	70	80	90	
920713-2_Rin	AAACCCGATAAAACCTTACCAGCCCTTGCTAATTCAGCCTATATACCGCCATCTTCAGC						
RSO245724	AAACCCGAT-AAACCTTACCAACTCTTGCTAATTCAGCCTATATACCGCCATCTTCAGC						
	580	590	600	610	620	630	
	100	110	120	130	140	150	
920713-2_Rin	CAACCCTAAAAAGGAACCAAAGTAAGCACAAGTATAAGACATAAAAAACGTTAGGTCAAGG						
RSO245724	GAACCCTAAAAAGGAACCAAAGTAAGCACAAGTATAAGACATAAAAAACGTTAGGTCAAGG						
	640	650	660	670	680	690	
	160	170	180	190	200	210	
920713-2_Rin	TGTAGCTTATGGGATGGAGAGAAATGGGCTACATTTTCTACTTCAAGGAACAACAATTAC						
RSO245724	TGTAGCTTATGGGTTGGAGAGAAATGGGCTACATTTTCTACTTTAA-GAACAACTAC						
	700	710	720	730	740	750	
	220						
920713-2_Rin	CCAAACGAA						
RSO245724	CCAAACGAAAGCTTTTATGAAATCAAAGCTAAAGGAGGATTTAGCAGTAAATTAAGAAT						
	760	770	780	790	800	810	

Alignment of 920713-2_Rino553 to GB_OM:MTCSXX

SCORES Initl: 658 Initn: 868 Opt: 939 z-score: 846.2 E(): 3.7e-41
>>GB_OM:MTCSXX (16832 nt)
initn: 868 initl: 658 opt: 939 Z-score: 846.2 expect(): 3.7e-41
94.5% identity in 219 nt overlap
(2-220:615-829)

```

                                     10    20    30
920713-2_Rin                      TCCCTAGAAGGAGCCTTGTTCCATAACCGAT
                                     |||||  |||||  |||||
MTCSXX    ACTCAAAGGACTTGGCGGTGCTTTATATCCCCCTAG-AGGAGCC-TGTTCCATAACCGAT
           590    600    610    620    630    640
           40    50    60    70    80    90
920713-2_Rin AAACCCCGATAAAACCTTACCAGCCCTTGCTAATTCAGCCTATATACCGCCATCTTCAGC
           |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
MTCSXX    AAACCCCGAT-AAACCCCAACCAACCCTTGCTAATTCAGCCTATATACCGCCATCTTCAGC
           650    660    670    680    690    700
           100   110   120   130   140   150
920713-2_Rin CAACCCATAAAAGGAACCAAAAGTAAGCACAAGTATAAGACATAAAAAACGTTAGGTCAAGG
           |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
MTCSXX    AAACCCATAAAAGGAACCAAAAGTAAGCACAAGTATAAAACATAAAAAACGTTAGGTCAAGG
           710    720    730    740    750    760
           160   170   180   190   200   210
920713-2_Rin TGTAGCTTATGGGATGGAGAGAAATGGGCTACATTTTCTACTTCAAGGAACAACAATTAC
           |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
MTCSXX    TGTAGCTTATGGGATGGAGAGAAATGGGCTACATTTTCTATTTTAA-GAACACAACAATTAC
           770    780    790    800    810    820
           220
920713-2_Rin CCAAACGAA
           |||||
MTCSXX    CCAAACGAAGGTTTTTATGAAACCAAAAACTAAAGGAGGATTTAGCAGTAAATTAAGAAT
           830    840    850    860    870    880
```

Sequence Similarity Search Results

Refine

Page 1 of 20

(Nucleotide) FASTA of: 920713-3_Rino553 from: 1 to: 217 August 8, 2003 05:54

REFORMAT of: 920713-3_Rino553.869561 check: 3535 from: 1 to: 217 August 7, 2003 11:35
(No documentation)

TO: genemblplus:* Sequences: 19,558,173 Symbols: 33,250,844,483 Word Size: 6

Sequences too short to analyze: 458 (1637 symbols)

Databases searched:

- GenBank, Release 134.0, Released on 14Feb2003, Formatted on 15Feb2003
- GenBank_EST, Release 134.0, Released on 14Feb2003, Formatted on 15Feb2003
- GenBank_GSS, Release 134.0, Released on 14Feb2003, Formatted on 15Feb2003
- EMBL, Release 73.0, Released on 16Dec2002, Formatted on 16Feb2003
- EMBL_EST, Release 73.0, Released on 16Dec2002, Formatted on 16Feb2003
- EMBL_GSS, Release 73.0, Released on 16Dec2002, Formatted on 16Feb2003
- GB_TagsNew, Release 1.0, Released on 23May2003, Formatted on 23May2003
- GenBankNew, Release 1.0, Released on 23May2003, Formatted on 23May2003

Minimum search sequence length: 1

Maximum search sequence length: 350000

Searching with both strands of the query.

Scoring matrix: fastadna.cmp Constant pamfactor used

Gap creation penalty: 16 Gap extension penalty: 4

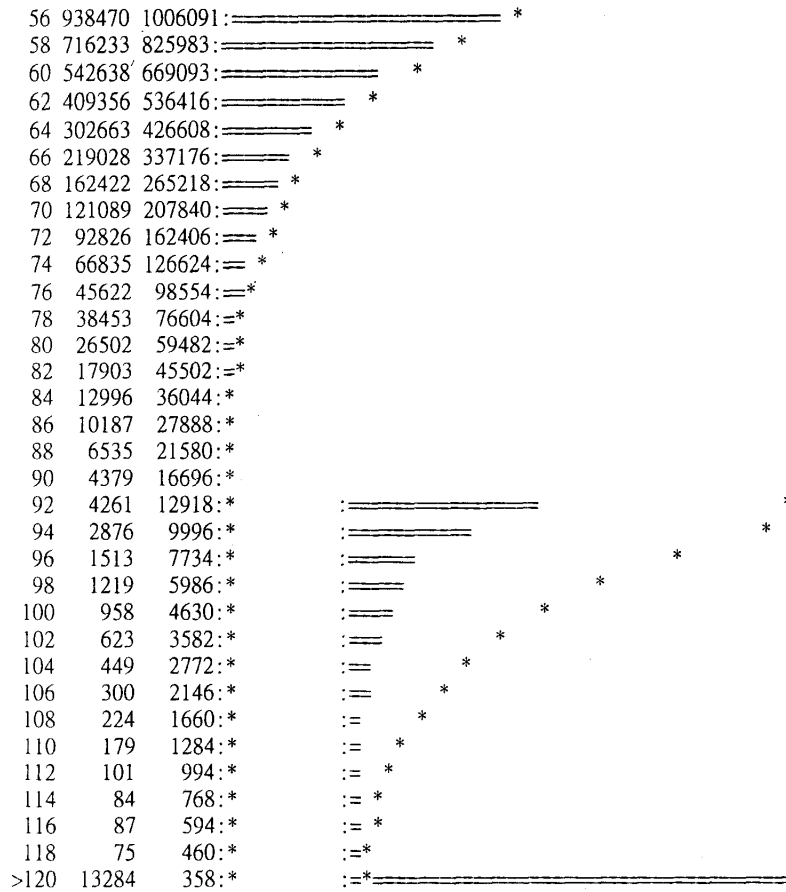
Histogram Key:

Each histogram symbol represents 39284 search set sequences

Each inset symbol represents 266 search set sequences

z-scores computed from opt scores

z-score	obs (=)	exp (*)
< 20	166203	0:=====
22	13126	0:=
24	459	18:*
26	481	411:*
28	734	4432:*
30	2226	26927:*
32	7594	104117:= *
34	39719	282352:== *
36	174318	579884:==== *
38	582124	958332:===== *
40	1342085	1336789:=====*
42	2068232	1634062:=====*
44	2357003	1802522:=====*
46	2337978	1835914:=====*
48	2137317	1757675:=====*
50	1833233	1603886:=====*
52	1532563	1410083:=====*
54	1202408	1204459:=====*



Joining threshold: 47, opt. threshold: 32, opt. width: 16, reg.-scaled

Sequence	Strand	Description	init1	init2	opt	z-sc	E Score
GB_OM:RUMTGENOM alignment	+	X97336 Rhinoceros unicornis ^{印度犀牛} complet...	1010	1010	1050	804.0	8.3e-39
GB_OM:RSO245724 alignment	+	AJ245724 Rhinoceros sondaicus mitoc...	965	995	1005	778.8	3.7e-36
GB_OM:MTCSXX alignment	+	Y07726 Ceratotherium simum complete...	968	968	987	755.6	4.1e-36
GB_OM:CS12SRRNA alignment	+	X86942 C.simum mitochondrial 12S rR...	999	999	999	774.2	6.6e-36
GB_OM:DSU245722 alignment	+	AJ245722 Dicerorhinus sumatrensis m...	537	537	998	773.4	7.3e-36
GB_OM:DBI245721 alignment	+	AJ245721 Diceros bicornis mitochond...	977	977	996	771.9	8.9e-36
GB_OM:AF191837 alignment	+	AF191837 Diceros bicornis 12S ribos...	977	977	996	774.7	1.5e-35
GB_OM:AF191834 alignment	+	AF191834 Tapirus bairdii 12S riboso...	859	894	899	700.1	2e-31
GB_OM:AF038012 alignment	+	AF038012 Tapirus pinchaque 12S ribo...	836	836	877	680.5	1.1e-30

FastA Alignments for 920713-3_Rino553

GB_OM:RUMTGENOM Begin: 617 End: 831
 ! X97336 Rhinoceros unicornis complet... 1010 1010 1050 804.0 8.3e-39
 GB_OM:RSO245724 Begin: 546 End: 760
 ! AJ245724 Rhinoceros sondaicus mitoc... 965 995 1005 778.8 3.7e-36
 GB_OM:MTCSXX Begin: 615 End: 829
 ! Y07726 Ceratotherium simum complete... 968 968 987 755.6 4.1e-36
 GB_OM:CS12SRRNA Begin: 546 End: 761
 ! X86942 C.simum mitochondrial 12S rR... 999 999 999 774.2 6.6e-36
 GB_OM:DSU245722 Begin: 546 End: 761
 ! AJ245722 Dicerorhinus sumatrensis m... 537 537 998 773.4 7.3e-36

Alignment of 920713-3_Rino553 to GB_OM:RUMTGENOM

SCORES Initl: 1010 Initn: 1010 Opt: 1050 z-score: 804.0 E(): 8.3e-39
 >>GB_OM:RUMTGENOM (16829 nt)
 initn: 1010 initl: 1010 opt: 1050 Z-score: 804.0 expect(): 8.3e-39
 99.1% identity in 216 nt overlap
 (2-217:617-831)

				10	20	30
920713-3_Rin				TCCCTAGAGGAGCCTGTTCCATAACCGATAA		
RUMTGENOM	ACTCAAAGGACTTGGCGGTGCTTTATATCCCCCTAGAGGAGCCTGTTCCATAACCGATAA					
	590 600 610 620 630 640					
	40 50 60 70 80 90					
920713-3_Rin	ACCCCGATAAACCTTACCAGCCCTTGCTAATTCAGCCTATATACCGCCATCTTCAGCCAA					
RUMTGENOM	ACCCCGATAAACCTTACCAGCCCTTGCTAATTCAGCCTATATACCGCCATCTTCAGCCAA					
	650 660 670 680 690 700					
	100 110 120 130 140 150					
920713-3_Rin	CCCTAAAAAGGAACCAAGTAAGCACAAGTATAAGACATAAAAAACGTTAGGTCAAGGTGT					
RUMTGENOM	CCCTAAAAAGGAACCAAGTAAGCACAAGTATAAGACATAAAAAACGTTAGGTCAAGGTGT					
	710 720 730 740 750 760					
	160 170 180 190 200 210					
920713-3_Rin	AGCTTATGGGATGGAGAGAAATGGGCTACATTTTCTACTTCAAGAACAACAATTACCCCA					
RUMTGENOM	AGCTTATGGGATGGAGAGAAATGGGCTACATTTTCTACTTCAAGAACAACAATA-CCCA					
	770 780 790 800 810 820					

SCORES Initl: 968 Initn: 968 Opt: 987 z-score: 755.6 E(): 4.1e-36
 >>GB_OM:MTCSXX (16832 nt)
 initn: 968 initl: 968 opt: 987 Z-score: 755.6 expect(): 4.1e-36
 95.8% identity in 216 nt overlap
 (2-217:615-829)

				10	20	30
920713-3_Rin				TCCCTAGAGGAGCCTGTTCCATAACCGATAA		
MTCSXX	ACTCAAAGGACTTGGCGGTGCTTTATATCCCCCTAGAGGAGCCTGTTCCATAACCGATAA					
	590 600 610 620 630 640					
	40 50 60 70 80 90					
920713-3_Rin	ACCCCGATAAACCTTACCAGCCCTTGCTAATTCAGCCTATATACCGCCATCTTCAGCCAA					
MTCSXX	ACCCCGATAAACCCACCAACCCTTGCTAATTCAGCCTATATACCGCCATCTTCAGCAAA					
	650 660 670 680 690 700					
	100 110 120 130 140 150					
920713-3_Rin	CCCTAAAAAGGAACCAAGTAAGCACAAGTATAAGACATAAAAAACGTTAGGTCAAGGTGT					
MTCSXX	CCCTAAAAAGGAACCAAGTAAGCACAAGTATAAAACATAAAAAACGTTAGGTCAAGGTGT					
	710 720 730 740 750 760					
	160 170 180 190 200 210					
920713-3_Rin	AGCTTATGGGATGGAGAGAAATGGGCTACATTTTCTACTTCAAGAACAACAATTACCCCA					
MTCSXX	AGCTTATGGGATGGAGAGAAATGGGCTACATTTTCTATTTTAAGAACAACAATTA-CCCA					
	770 780 790 800 810 820					
920713-3_Rin	AACGAA					
MTCSXX	AACGAAGGTTTTTATGAAACCAAAAACTAAAGGAGGATTTAGCAGTAAATTAAGAATAGA					
	830 840 850 860 870 880					