两栖动物的 DNA 组织取样和浸制标本制作流程

Protocols for DNA Tissue Sampling and Specimen Fixation of Amphibians

陈进民^{1,*}, 金洁琼², 吴云鹤², 侯绍兵², 刘硕², 车静^{2,*}

¹重要生物资源保护与利用研究安徽省省级重点实验室, 生命科学学院, 安徽师范大学, 芜湖, 安徽; ²遗传资源与进化国家重点实验室, 中国科学院昆明动物研究所, 昆明, 云南

*通讯作者邮箱: chej@mail.kiz.ac.cn; chenjinminkiz@126.com

引用格式: 陈进民, 金洁琼, 吴云鹤, 侯绍兵, 刘硕, 车静. (2021). 两栖动物的 DNA 组织取样和浸制标本制作流程. *Bio-101* e1010656. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010656.

How to cite: Chen, J.M., Jin, J.Q., Wu, Y.H., Hou, S.B., Liu, S and Che, J. (2021). **Protocols for DNA tissue sampling and specimen fixation of Amphibians**. *Bio-101* e1010656. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010656. (in Chinese)

摘要: 生物标本被广泛地服务于科研、科普和教学等众多领域。此外, DNA 组织样品在生物学研究的作用日益彰显。现今, 生物标本的制作和遗传资源的取样已经密不可分。两栖动物有其特性, 并且种类繁多, 有一套自身的标本处理方案。我国有着丰富的两栖动物资源, 物种数量占旧大陆之首, 很多是特有物种。因此, 科学规范地进行 DNA 组织取样和标本制作是一项重要的基础工作。在本文中, 我们总结了两栖动物的活体处死、DNA 组织取样、标本固定和保存等制作步骤及其注意事项。

关键词: 蛙, 蝾螈, 蚓螈, 标本制作, 遗传资源, 技术流程

研究背景: 依托中国科学院昆明动物研究所动物标本馆、西南野生种质资源库动物分库标本及样品处理管理办法, 结合国内外同行的研究进展 (Pisani, 1973; 李家坤, 1981; Zhao and Adler, 1993; Simmons, 2002), 整理形成如下有关两栖动物常规 DNA 组织取样和浸制标本制作流程。

材料与试剂

1. 保鲜膜
2. 标本标签

3. 标本瓶
4. 标签纸
5. 丁香油
6. 冻存盒
7. 记号笔
8. 记录本
9. 甲醛溶液
10. 剪刀
11. 酒精灯
12. 酒精棉球
13. 口罩
14. 宽口瓶
15. 密封盒
16. 镊子
17. 手套
18. 透明胶带
19. 无尘纸
20. 无水乙醇
21. 注射器
22. 组织冻存管

仪器设备

1. 标本储存柜 (宁波圣达精工实业有限公司)
2. 标本储存间
3. 超低温冰箱 (海尔集团, 型号: DW-86L959)

实验步骤

一、处理前准备

1. 佩戴好口罩和手套。

2. 在组织冻存管内灌入适量 95%酒精，管壁外依次贴上标签纸，标签纸上至少包含标本编号和 DNA 组织样品编号等内容，并用透明胶带固定标签纸，防止脱落。
3. 取甲醛溶液加水稀释成 10%福尔马林。
4. 点燃酒精灯，用于剪刀镊子消毒。

二、标本分类和检视

1. 根据地点、物种、雌雄等信息，把采集到的活体标本进行分类。

三、活体处死和标本清洗

1. 在可密封宽口瓶中灌入四分之三的水，然后加入 5-10 滴丁香油。
2. 把动物活体放入瓶中，把盖子拧紧，一般 3-4 min 即可麻醉处死。

注：也可以使用乙醚在密闭容器中对两栖动物进行安乐死，但相比而言，丁香油具有成本低、高效性以及较高的安全性。

3. 处死时把相同地点的个体放一起，不宜放多个地点。
4. 取出麻醉后的标本，用清水冲洗干净，避免取样时皮肤表面杂物污染组织样品。

四、拴标本标签和信息记录

1. 在工作台上铺上干净的保鲜膜，将标本按地点、物种等顺序整齐摆放在保鲜膜上，随后逐一拴标本标签，此标签上至少包含标本编号等内容，便于后续能一一对应。
 - 1) 蚓螈目：标签拴在颈部或取样刀口处 (图 1)。
 - 2) 有尾目：标签拴在腰部，或四肢与躯干的交接处 (图 2)。
 - 3) 无尾目：标签拴在后肢膝关节处 (图 3)。
2. 将标本各部分的色斑和特征准确记录下来。记录标本信息，包括物种名称、标本编号、DNA 组织样品编号、采集地点、采集日期、采集者、性别、生境和习性等。

图 1. 蚓螈目标本制作后的固定姿态和特征展示。红色箭头所指位置表示 DNA 组织取样的刀口处。以鱼螈属物种为例。

图 2. 有尾目标本制作后的固定姿态和特征展示。红色箭头所指位置表示 DNA 组织取样的刀口处。以香港瘰螈为例。

图 3. 无尾目标本制作后的固定姿态和特征展示。红色箭头所指位置表示 DNA 组织取样的刀口处。以红蹼树蛙为例。

五、DNA 组织取样

两栖动物的肝脏组织含丰富的 DNA，而且，取肝脏组织对标本外形损坏较小，因此，保存 DNA 组织样品首选肝脏。但动物死亡后，肝脏里面的 DNA 降解较快，需要在麻醉之后快速完成取样。如果肝脏组织不可用，也可取两栖动物大腿内侧肌肉。

1. 用消毒过的剪刀从无尾类的腹部偏右侧（腹面观）剪一个小口，有尾类和蚓螈类从腹部中央剪开一个小口，注意不要剪到胸骨（图 1-3）。
2. 用镊子小心把肝脏拉出，剪成黄豆大小并浸入装有 95%酒精的组织冻存管内，在冻存管内，DNA 组织：95%酒精 $\approx$ 1：4 为好。体型大的个体可以多管分装保存。蝌蚪剪取尾巴上缘肌肉保存。

注：每次取样时，需核对所取个体的标本标签编号与组织冻存管上的编号是否一一对应。

3. 取完组织样品后，把取样时带到腹腔外的其他内脏放回腹腔，整理好刀口。

注：如果肝脏组织有胆汁或者血液，必须用酒精反复冲洗，确定洗净后再剪成小块放入组织冻存管保存；

4. 组织样品需进行多次酒精保存液更换，使样品彻底脱水。及时转入-80 °C 冰箱长期保存。

六、标本固定

1. 选择合适大小的密封盒，在盒子底部铺上一至两层无尘纸。
2. 标本依次放入密封盒内，调整标本姿态。
 - 1) 蚓螈目：盘成一圆盘或折成三折 (图 1)，用线拴住固定，以免变形。
 - 2) 无尾目和有尾目：用镊子将标本的指、趾自然展开，蹼拉平整，贴在纸上，标本调整成其生活时的匍匐姿态。在标本口腔里塞一团脱脂棉，使其口略张开，张开的角度以能观察到口腔内舌、齿、咽等为准 (图 2 和 3)，便于后续研究时观察。对于有尾目，尾部应沿脊椎线后伸，使吻端、躯体和尾巴在同一直线上 (图 2)。
 - 3) 蝌蚪和卵：直接装进 10%福尔马林标本瓶中保存。蝌蚪应头向下放入瓶中，以免压弯标本。
3. 同一批标本一般放于同一密封盒中固定。标本姿势调整好后，在标本上方铺一层无尘纸，将 10%福尔马林从盒子一侧轻轻倒入，直至将标本覆盖为止。

注：体型大的个体须在腹腔、四肢和尾部等多处，注射适量 75% 酒精，进行防腐处理。

七、标本冲洗

1. 固定 24 h 后，检查标本硬化程度。检查无问题后，用镊子把纸屑全部去除，纸屑用密封袋单独封好，放入垃圾袋内。
2. 取出标本，检查标签是否完整无损，如有缺损，及时更正。
3. 将用过的福尔马林倒入回收瓶内下次使用，瓶子上标注信息，包括使用人、时间、

液体浓度。

4. 将标本用自来水 (细流) 冲洗至少 12 h 以上, 将福尔马林冲洗干净。由于福尔马林有毒性, 需在通风处进行处理。

八、标本保存

1. 冲洗好后, 将标本按照物种和地点信息进行分类, 同一地点的同一物种放入一个标本瓶, 标本浸入 70%-75% 的酒精中保存。在玻璃标本瓶塞处用石蜡密封, 以防保存液蒸发。
2. 在标本瓶外贴上标本瓶号和物种信息标签纸。
3. 移至标本馆保存。

注: 标本的长久保存需要防止光、热、液体防腐剂的蒸发。如果标本因损坏或腐烂而无法保存, 应尽量获取骨骼, 尤其是头骨。

致谢

感谢中国科学院昆明动物研究所两栖爬行类多样性与进化学科组提供的宝贵建议及讨论。本研究得到中国西南野生生物种质资源库动物分库 (国家重大科技基础设施专项)、国家自然科学基金委青年基金 (31900323)、重要生物资源保护与利用研究安徽省重点实验室开放基金 (692001) 资助。

参考文献

1. 李家坤. (1981). [两栖纲和爬行纲动物的采集和保存法](#). *生物学通报* 1(3): 52-54.
2. Pisani, G. R. (1973). [A guide to preservation techniques for amphibians and reptiles](#). Society for the Study of Amphibians and Reptiles, St. Louis, MO, USA.
3. Simmons, J. E. (2002). [Herpetological collecting and collections management](#). Society for the Study of Amphibians and Reptiles Herpetology Circular 31: 1-153.
4. Zhao, E. M. and Adler, K. (1993). *Herpetology of China*. Society for the Study of Amphibians and Reptiles, Ohio, USA.