

## 琥珀中古生物 DNA 之探討

黃瑞齡<sup>1\*</sup>·林子軒<sup>1</sup>·沈賈堯<sup>2</sup>·陳春香<sup>2</sup>·黃義仁<sup>3</sup>

### 摘要

古生物復育是全世界研究物種起源、生物演化學者極感興趣的研究題目，對生命科學的探討意義深遠。本計畫使用經過鑑定，距今四千六百萬年前之琥珀，以酚/氯仿法萃取琥珀中的古生物組織 DNA，將萃取到之古生物 DNA，先以隨機增殖多態性(Random Amplified Polymorphic DNA；RAPD)進行指紋分析,接著以數十種特定核酸引子，進行聚合酶鏈鎖反應快速擴增特定 DNA 進行物種比對。期望提供古生物學家對遠古世界研究的參考。

**關鍵詞：**琥珀、古生物復育、隨機增殖多態性、指紋分析、聚合酶鏈鎖反應

---

<sup>1</sup> 美和科技大學 生物科技系 \* 責任作者

<sup>2</sup> 美和科技大學 護理學系

<sup>3</sup> 美和科技大學 珠寶學系

## 前言

琥珀，礦物學名詞為琥珀，中國古書〈山海經〉稱為育沛、遺玉[5]，英文名稱為 Amber，語源來自阿拉伯文，原義是“在海中漂浮者”的意思，法文人稱之 ambre jaune，意思是石化琥珀，希臘人稱『elektron』，即是“電”的字源，根據學者推測是因為琥珀在磨擦後會產生靜電的關係，羅馬人稱之 succinum，為“脂石”的意思，德國人稱為 Bernstein，意思是火石，這是因為琥珀的色澤黃橙如火的原故。科學家於 2007 年 2 月宣布，墨西哥南部恰帕斯州一名礦工發現的珍貴琥珀中完整保存著一隻小樹蛙，它的年齡有 2500 萬年。美聯社的消息稱，這塊罕見琥珀是一名礦工在 2005 年發現的，隨後被賣給一位私人收藏者。經科學家通過研究琥珀以及其藏身地質層，推斷琥珀中的樹蛙(1 厘米)已經有 2500 萬年歷史，引起研究古生物學者極大興趣。為了正式確認這隻樹蛙所屬“家族”，專家加爾波特希望能提取樹蛙部分組織分析 DNA，但是他說：「由於這塊琥珀非常珍稀，我估計它的收藏者不會允許我這樣做。」

琥珀具有極重要的歷史與文化價值，

因此有人稱琥珀是「金色的時窗」、「時間夾囊」、「封藏的古世界」，意思指在這金黃色的琥珀中，封藏著無數的動植物，它能協助我們回溯到數千萬年前，飽覽一個與今日完全不同的古代世界，一個已經被遺忘的世界！

琥珀是遠古松科植物的樹脂埋藏於地層，經過漫長歲月的沖刷、搬運、擠壓而演變形成的化石，其成份為有機植物樹脂混合物，主要成份是松樹脂，它是由松脂酸與海松脂，外加琥珀酸所構成的。晶體結構屬非晶質，硬度在 2.5，比重在 1.05~1.09 之間，光學性質可見其折射率 1.54~1.55，目前所知琥珀主要產地為波羅的海沿岸、多明尼加、羅馬尼亞、義大利、加拿大、中國..等。而琥珀酸對琥珀的顏色與透明度有很大的影響，琥珀酸的含量愈少，琥珀的透明度愈高，有時含少量的硫化氫與少許的揮發油，隨著產地的不同，成份也會略有差異，例如波羅的海的琥珀，琥珀酸含量大多介於 3~4%之間，就依琥珀顏色可細分成 250 種之多，最常見的則是蜜黃與酒紅色。琥珀顏色的形成除了與樹脂本身有密切關係外，相信與其土壤中的礦物質也有直接的關係，像鐵、錳、鎳、銅等在長時間的接觸下必定能使

琥珀產生不同的色彩[6-9]。

因此我們藉由翡翠世家珠寶公司提供的琥珀，進行琥珀中古生物 DNA 提取的試驗。我們先以簡單的比重值測定、折射率及外觀的辨別，鑑定琥珀的真偽，再用用生物科技—基因工程方法，以鹼性法萃取琥珀中的古生物 DNA，將萃取到之古生物 DNA，先以隨機增殖多態性(Random Amplified Polymorphic DNA:RAPD)進行指紋分析，再以幾個特定核酸引子，進行聚合酶鏈鎖反應(Polymerase Chain Reaction)快速擴增特定 DNA 進行物種比對。提供古生物學家對遠古世界研究的參考。

## 研究方法與步驟

### 1. 供研究之材料

琥珀由翡翠世家珠寶公司提供。

### 2. 琥珀的真偽鑑定

由於琥珀市價日增，在國際市場上一直居高不下，促使圖利者致力於仿造偽製，造成假品充斥，幾可亂真，假琥珀大致可分為：(1) 塑膠琥珀：多以賽璐璐製作，又稱骨董琥珀，是以化學材質做成，在飽和的食鹽水中會下沉，用熱針刺，帶有刺

鼻的辛辣味！(2) 合成琥珀：是將琥珀磨粉重新熔製而成，因此當可發現其流紋是天然原石琥珀所沒有的。(3) 壓製琥珀：亦稱半琥珀，是由碎塊狀的真琥珀在攝氏 200 度下壓縮接合而成，像塊狀琥珀，但用放大鏡細看，會有旋風狀且不完整的色調及氣泡。(4) 波力本琥珀：是用體積較小的琥珀粒與多元酯混合製成；由德國開發技術，因含有高比例的琥珀，故可以浮在鹽水之上，燃燒時也會有松香味；肉眼難以檢測，可以 15 倍放大鏡檢測。(5) 貝克萊：又稱電木，是比利時裔美籍化學家歐貝克藍於 1909 年發明的，為一種不易分解，燃點低，價格便宜，不易出現磨損的取材，歷經六七十年，表面依然完好如初，不同於天然琥珀會出現洞口磨損，表面有細微的風化網狀裂紋。古羅馬人善以靜電反應來鑑定琥珀之真偽，他們先用皮毛磨擦琥珀，再用它來吸取手上的汗毛，聽說這種測試法既準確又快速。中國人則喜歡用手指在琥珀上來回的磨擦，再以鼻嗅其味，如具松香味即是真品。前人以視覺、嗅覺、觸覺來鑑定琥珀之真偽，也許當時大家不知其所以然來，但倒都是測試的良法。本計畫採用實體顯微鏡觀察以下重點：

### 1. 顏色外觀不同

人造再生琥珀的色彩單調，無靈艷光澤，呈呆色。天然琥珀成色多變，色澤透艷，具油脂光澤感。

### 2. 內含物

天然琥珀中有很多細小的氣泡，這些氣泡必須要用高倍數的放大鏡才看得到；天然琥珀有圓形氣泡，內含的琥珀花有細絲羽狀紋路，偶爾還包有昆蟲。植物化石，再生琥珀有被急速壓迫的流動長形氣泡。在壓縮琥珀內的小細片琥珀之間，會呈現攪重的狀態。其內含之琥珀花為單一。規則的片狀結構。

### 3. 生長紋理

天然琥珀有規律的流紋，部份合成琥珀的成品，在清澈區與雲霧區的交接邊際，可能會出現兩種不同液體混合而產生的水流狀漩渦紋理。

- a. 琥珀內部的雲霧狀態。
- b. 琥珀的羽狀紋路是否自然。
- c. 琥珀的重量是否合理。
- d. 老琥珀念珠的洞口是石有磨損的溝痕。
- e. 握在手中是否有溫暖的感覺。
- f. 顏色過於鮮艷規則一致的琥珀，很可能是人工染色的產物。

### 4. 比重

將琥珀浸泡於飽和食鹽水中(密度約  $1.13 \text{ g/cm}^3$ )，如果浮於液面，我們將初步判定是真琥珀。接著使用自製的比重器具，來測量每一顆琥珀的比重值(也就是密度)，只要密度介於  $1.05\text{-}1.09 \text{ g/cm}^3$  之間，就可更進一步的確認琥珀的真偽，更可證實我們能取得古 DNA 的事實。

### 5. 折射率的測定

(1) 折射儀的功能：折射儀上的主要部份為一玻璃半球儀器的，其餘光學系統含有若干鏡片直角全反射稜鏡，將所測寶石的臨界面邊緣對焦於目鏡上，由標尺讀出讀數，該讀數為寶石的折射率值。琥珀的折射率則介於  $1.54\text{-}1.55$  之間。

(2) 折射儀的工作原理：將待測寶石放在玻璃半球上呈光學接觸時，不同的折射率寶石有不同的臨界面角，低折射率的寶石臨界面角大，視域內所見的陰影區比明亮區的範圍小，高折射率寶石的臨界面角小，視域中所見的陰影區比明亮區的範圍大，因此視域中的陰影或明亮分界完全由所測寶石的臨界面角大小來決定。

### 3. 生物組織 DNA 酚/氯仿萃取法[1]

將生物組織加入 lysis buffer  $55^{\circ}\text{C}$  作用 24 Hour 後，取出，先以等量 ( $500 \mu\text{l}$ ) 之

phenol(酚)萃取 Genomic DNA，再以等量 500  $\mu$ l 之酚:氯仿(1:1)萃取 Genomic DNA，最後以等量 500  $\mu$ l 之氯仿:isoamylalcohol (24:1)萃取 Genomic DNA，加入 90  $\mu$ l 之 3M 醋酸鈉及 700  $\mu$ l 絕對酒精沉澱 Genomic DNA，放置 $-70^{\circ}\text{C}$  20 分鐘或 $-20^{\circ}\text{C}$  30 分鐘，經過 15,000 rpm 離心 10 分鐘，得到 DNA 沉澱塊，以 600  $\mu$ l 的 70%酒精 wash，離心後將 70%酒精倒乾，並將 DNA 沉澱塊吹乾 5 分鐘，得到之 DNA 沉澱塊，以含有 RNase 之 TE buffer 50  $\mu$ l 溶解之，冰在 $-70^{\circ}\text{C}$  備用。

#### 4. 聚合酶鏈鎖反應 (Polymerase Chain Reaction)[1]

取約 50 ng 的琥珀中萃取得到的古生物

DNA 當作模板 DNA，加入正股引子 Primers 1  $\mu$ g，及反股引子 Primer AS 1  $\mu$ g dNTP 2.5 mM 10  $\mu$ l，10 x Taq DNA polymerase buffer 10  $\mu$ l，Taq DNA polymerase 1  $\mu$ l，3DH<sub>2</sub>O 76  $\mu$ l total 100  $\mu$ l。置於聚合酶鏈鎖反應儀器進行反應，循環溫度控制器上，設其反應程序為：(1)模板變性， $94^{\circ}\text{C}$ ，5 分鐘；(2)引子與模板 DNA 黏合反應， $94^{\circ}\text{C}$ ，30 秒； $52^{\circ}\text{C}$ ，30 秒 (3)合成新股 DNA， $72^{\circ}\text{C}$ ，30 秒；(4)重覆進行反應(1)至(3)三十次；(5) $72^{\circ}\text{C}$ 再進 10 分鐘後結束反應(6)靜置 $4^{\circ}\text{C}$ 。PCR 產物以 1.5% 洋菜凝膠進行電泳分析。

Template 50 ng/μl	→1 μl
Primer(forward)100 mM	→1 μl
Primer(revert)100 mM	→1 μl
dNTP 2.5 mM	→10 μl
Taq DNA polymerase	→1 μl
10×PCR Buffer	→10 μl
ddH <sub>2</sub> O	→76 μl
<b>total</b>	<b>100 μl</b>

**5. 隨機增殖多態性(Random Amplified Polymorphic DNA:RAPD)[1] :**

所進行之反應原理是與聚合酶連鎖反應(PCR)相似,同樣是經由試管內的酶合成作

用,應用極少量的DNA當作模板(template)來進行增殖,以合成大量的標的序列DNA片段.特點:RAPD是使用單一、短的隨機寡核苷酸引子(oligo-nucleotide primer). RAPD產物以1.5%洋菜凝膠進行電泳分析。

RAPD-PCR		Program		
		Temperature	Time	Cycles
模板 DNA(25ng/μl)	2 μl			
短的隨機寡核苷酸引子	1 μl	(1)94 °C	5 min	1
10x Taq polymerase buffer	1.5 μl	(2)94 °C	1 min	35
Taq DNA polymerase	0.5 μl	(3)37 °C	2 min	
2.5mM dNTP	1 μl	(4)72 °C	2 min	
2 D H <sub>2</sub> O	9 μl	(5)72 °C	10 min	1
Total	15 μl	(6)4 °C	∞	1

## 研究結果與討論

### 一. 琥珀的真偽鑑定

#### 1. 外觀特徵辨別

翡翠世家珠寶公司贈予之五顆供測試之琥珀，成色多變，色澤透艷，具油脂光澤感，搓揉及用火燒出現清淡松香的香味。

#### 2. 內含物及生長紋理

五顆供測試之琥珀，以高倍數 60X 的解剖實體顯微鏡觀察每一顆琥珀的內部形態，有許多細小的圓形氣泡，內含的琥珀花有細絲羽狀紋路，未見水流狀漩渦紋理，偶爾還包有昆蟲、植物化石(詳圖一 A-E)。

#### 3. 比重值的測定

(a) 五顆供測試之琥珀，浸泡於飽和食鹽水中(密度約 1.13 g/cm<sup>3</sup>)，均浮於液

面，我們初步判定是真琥珀。

(b) 測比重器具是針對此研究特別純手工打造(詳圖二)，利用不要的瓦楞紙做成

底座，並以竹筷組成四周的支柱，來支撐燒杯的重量(以防止測得燒杯及水的

重量)，再以膠帶最內圍的紙圈做為支

撐，來秤量物體在水中的重量，此時將

物體丟入水中的網子裡，僅會測得物體在水中的浮力重，而不會測得其他重

量。將五顆供測試之琥珀，使用自製的

比重器具，來測量每一顆琥珀的比重

值(也就是密度)，只要密度介於

1.05~1.09 g/cm<sup>3</sup> 之間(詳表一)，更進一步

的確認五顆供測試之琥珀，為真琥珀。

#### 4. 折射率的測定

五顆供測試之琥珀，以折射儀測定，折射率均介於 1.54~1.55 之間，顯示五顆供測試之琥珀，為真琥珀(詳表一)。

### 二. 生物組織 DNA 酚/氯仿萃取法

將生物組織加入 lysis buffer 55<sup>o</sup>C 作用 24 Hour 後取出，先以等量(500 μl)之 phenol(酚)萃取 Genomic DNA，再以等量 500 μl 之酚:氯仿(1:1)萃取 Genomic DNA，最後以等量 500 μl 之氯仿:isoamylalcohol (24:1)萃取 Genomic DNA，加入 90 μl 之 3M 醋酸鈉及 700 μl 絕對酒精沉澱 Genomic DNA，放置 -70<sup>o</sup>C 20 分鐘或 -20<sup>o</sup>C 30 分鐘，經過 15,000 rpm 離心 10 分鐘，得到 DNA 沉澱塊，以 600 μl 的 70%酒精 wash，離心後將 70%酒精倒乾，並將 DNA 沉澱塊吹乾 5 分鐘，得到之 DNA 沉澱塊，以含有 RNase 之 TE buffer 50 μl 溶解之，冰在 -70<sup>o</sup>C 備用。共取得蚊子、螞蟻、果蠅之 DNA。

### 三. 聚合酶鏈鎖反應(Polymerase Chain Reaction)

取約 50 ng 的蚊子、螞蟻、果蠅之 DNA，進行聚合酶鏈鎖反應，PCR 產物以 1.5% 洋菜凝膠進行電泳分析。結果如圖三 A 所示：現代蚊子和螞蟻的 PCR 片段，使用編

號 ①② 的引子取得當今蚊子的 PCR fragment，蚊子品種則為一般常見之家蚊，其片段為 415 bp。圖三 B 所示：現代螞蟻的 PCR 片段，使用編號 ③④ 的引子取得當今螞蟻的 PCR fragment，蚊子品種則為一般常見之螞蟻，其片段為 429 bp。

### 結論




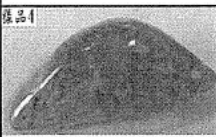

我們已成功的使用各項鑑定方法及自製的

比重測定裝置，證實琥珀的真偽，翡翠世家珠寶公司贈予之五顆供測試之琥珀，為真琥珀；目前也已成功在當今的蚊子及螞蟻中，得到了明確的 DNA 片段，但是因為使用了許多文獻提供的方法[2-4]，在目前還是無法真正的萃取出琥珀中古生物的 genomic DNA，希望未來能夠從琥珀中得到古生物 DNA，我們將能很快的進行親緣關係的鑑定。



附表

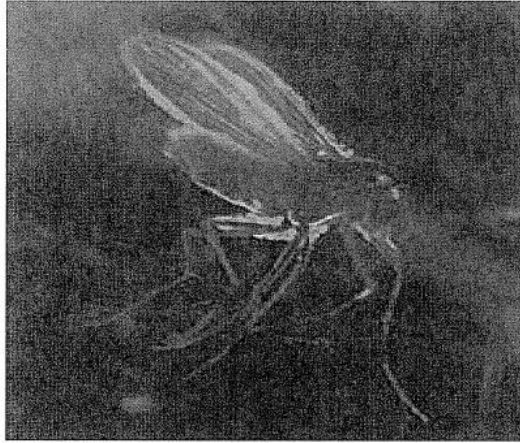
表一：五顆供測試琥珀之質量、浮力重、密度、比重值及折射率。〈使用此自製比重器具測得五顆琥珀的浮力重，每顆均為測量5次後之平均值，再經計算後得知比重值及密度。〉

樣品	質量(g)	浮力重(gw)	密度(g/cm <sup>3</sup> )	比重值(sg)	折射率
 樣品1	1.273	0.107	1.09	1.09	1.54
 樣品2	1.276	0.105	1.09	1.09	1.55
 樣品3	2.094	0.126	1.06	1.06	1.54
 樣品4	2.144	0.158	1.07	1.07	1.56
 樣品5	1.363	0.121	1.09	1.09	1.54

附圖

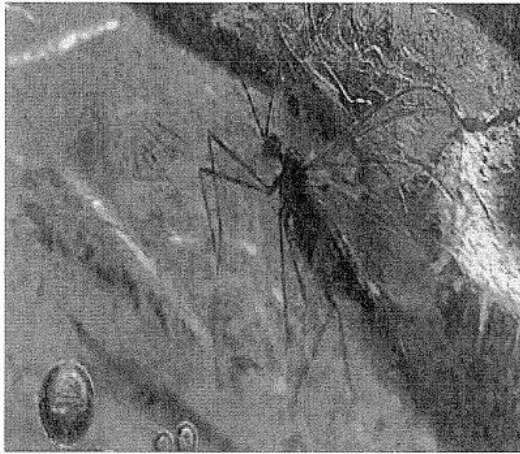
圖一：五顆供測試之琥珀中的昆蟲型態，以高倍數 60X 的解剖實體顯微鏡觀察每一顆琥珀的內部形態，有許多細小的圓形氣泡，內含的琥珀花有細絲羽狀紋路，未見水流狀漩渦紋理，偶爾還包有昆蟲、植物化石。

A.



(樣品 1 中的昆蟲)

B.



(樣品 2 中的昆蟲)

C.



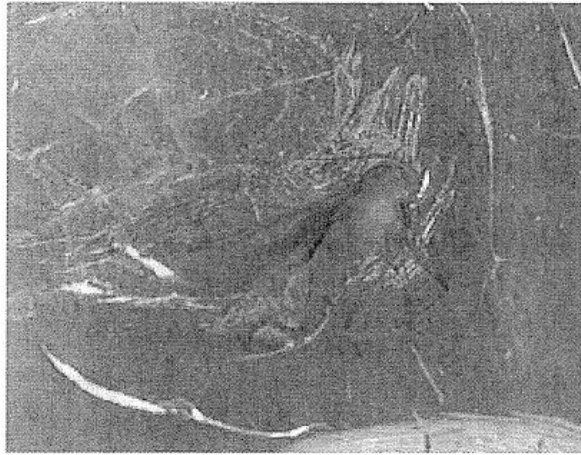
(樣品 3 中的昆蟲)

D.



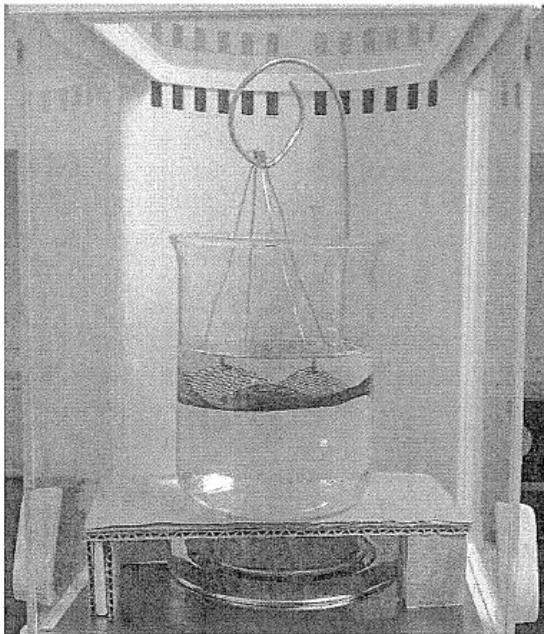
(樣品 4 中的昆蟲)

E.



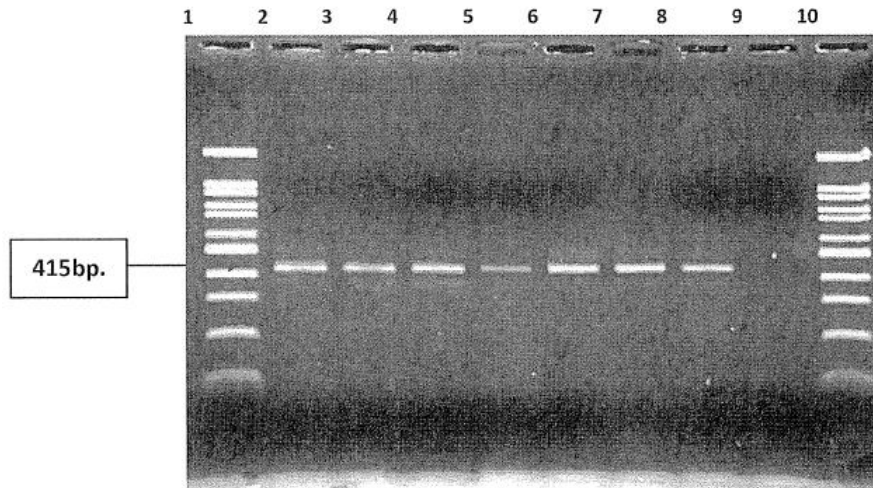
(樣品 5 中的昆蟲)

圖二：自製測比重器具，此測比重器具是純手工打造，利用不要的瓦楞紙做成底座，並以竹筷組成四周的支柱，來支撐燒杯的重量(以防止測得燒杯及水的重量)。再以膠帶最內圍的紙圈做為支撐，來秤量物體在水中的重量，此時將物體丟入水中的網子裡，僅會測得物體在水中的浮力重，而不會測得其他重量。



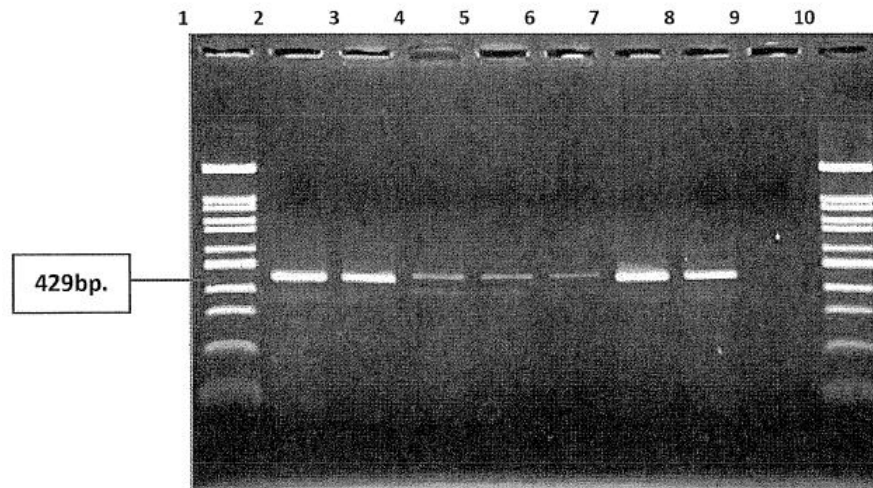
圖三：現代蚊子和螞蟻的 PCR 片段。

A. 使用編號①②的引子取得當今蚊子的 PCR fragment，蚊子品種則為一般常見之家蚊，本片段為 415 bp.



(1&10 為 100bp marker。2~8 為日常生活中常見的瘧蚊。9 為 control。)

B.使用編號③④的引子取得當今各不同品種的螞蟻片段 429 bp.



(1&10 為 100bp marker。2~8 為各不同品種的螞蟻。9 為 control。)

### 中英文參考文獻

1. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Third edition. 2001. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
2. Azar, D. (1997). A new method for extracting plant and insect fossils from Lebanese amber. *Palaeontology*, 40(4), 1027-1060
3. Austin, J. J., Ross, A. J., Smith, A. B., Fortey, R. A., & Thomas, R. H. (1997). Problems of reproducibility--does geologically ancient DNA survive in amber-preserved insects? *Proc Biol Sci*, 264(1381), 467-474.
4. Kambhampati, S., & Smith, P. (1995) PCR primers for the amplification of four insect mitochondrial gene fragments. *Insect Molecular Biology* 4(4), 233-236
5. 山海經校注 袁珂校注 里仁書局印行
6. 琥珀：各時代的金色珠寶 萊斯著。
7. 滄海遺玉。細說琥珀 張宏實著。淑馨出版社出品
8. 玉器珠寶學 張嵩著。經史子集出版社出品
9. 自然珍藏系列。寶石圖鑑 卡莉 霍爾著。貓頭鷹出版社

## Studies on the DNA of Ancient Living Creature from Amber

### Abstract:

The reincarnation of ancient living creature is a very interesting research topic for worldwide biologists studying the origin of species and living creature revolution. It also has very significant effects on the exploration of life science.

In this proposal, we propose to use phenol/chloroform extraction method to extract the ancient living tissue from amber sample that dated 4600 million years ago. We plan to use the extracted ancient living tissue DNA as the template, and apply the Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) for fingerprint analysis. Finally, we plan to use 10 ~ 20 kinds of specific primers for polymerase chain reaction to amplify specific DNA for biology species match. Our goal of this study is to provide valuable data basis for the ancient biologists.

**Keywords:** amber, reincarnation of ancient living creature, Random Amplified Polymorphic DNA, polymerase chain reaction.