

· 综述 ·

动物类中药 DNA 条形码鉴定研究进展

王孟虎, 许亮, 康廷国*, 常安, 陈思有, 何婉婉, 李庆, 郭爽
(辽宁中医药大学, 辽宁 大连 116600)

[摘要] DNA 基因鉴定是近年来应用在中药鉴定中较为重要的分子生物技术,该技术能够很好地从基因层面上鉴别药材,具有较高的准确性。DNA 基因鉴定包括 DNA 分子遗传标记,核酸探针杂交,DNA 条形码分子鉴定法等,其中发展最快的为 DNA 条形码分子鉴定法。DNA 条形码分子鉴定法是利用基因组中一段公认的、相对较短的 DNA 序列来进行物种鉴定的一种分子生物学技术,是传统形态鉴别方法的有效补充。由于不同物种的 DNA 序列是由腺嘌呤(A),鸟嘌呤(G),胞嘧啶(C),胸腺嘧啶(T) 4 种碱基以不同顺序排列组成,因此对某一特定 DNA 片段序列进行分析即能够区分不同物种。Hebert 等在 2003 年提出了通过测定线粒体细胞色素 C 氧化亚基 I(COI) 基因序列来鉴定动物的种类。陈士林等则在大量实验的基础上提出了鉴别动物的基因以 COI 基因为主,ITS2 基因为辅的动物类药材 DNA 条形码鉴定体系。大量的实验表明,通过 DNA 条形码来鉴别动物具有准确性、可行性、简便性、通用性,为鉴别动物物种及发现新物种提供了新的方法,为鉴别动物药材的真伪提供了科学的依据。但由于该技术是通过基因进行鉴定,对实验材料及提取方法有较高要求,对一些年代较久的动物药材,其 DNA 降解较为严重,为 DNA 提取技术提出了较高的要求;该技术只能鉴别其来源是否准确却不能鉴别其药用部位是否准确,这就需要结合其他鉴别方法来准确鉴别其药用部位。本文通过综合国内外对 DNA 条形码的研究,为日后的研究和应用提供理论依据。

[关键词] 药用动物; DNA 条形码; 线粒体细胞色素 C 氧化亚基 I

[中图分类号] R282.74 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)15-0227-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016150227

Advances in Animal Medicine DNA Barcoding

WANG Meng-hu, XU Liang, KANG Ting-guo*, CHANG An,
CHEN Si-you, HE Wan-wan, LI Qing, GUO Shuang

(Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

[Abstract] DNA gene identification is used as a more important molecular biological technology to identify traditional Chinese medicine in recent years. It can identify good herbs at the genetic level, with a high accuracy. DNA gene identification includes DNA molecule genetic markers, DNA hybridization and DNA barcoding molecular identification method, particularly the fastest growing one is DNA barcoding molecular identification method. DNA barcoding molecular identification method is a molecular biological technique to identify species using an admittedly short DNA sequence in genome, and an effective complement to traditional morphological identification methods. Because DNA sequences of different species were composed of four bases, namely adenine (A), guanine (G), cytosine (C) and thymine (T), analysis on a specific sequence of DNA fragments can distinguish different species. Hebert, proposed the animal species identification method by measuring mitochondrial

[收稿日期] 20150918(001)

[基金项目] 国家公益性行业专项(201407002);辽宁中医药大学杰出青年基金项目(20121228);辽宁省高等学校杰出青年学者成长计划项目(LJQ2014101)

[第一作者] 王孟虎,在读硕士,从事中药鉴定与品质评价,Tel:15140068315, E-mail:shapuofeng@163.com

[通讯作者] *康廷国,教授,博士生导师,从事中药鉴定与品质评价,Tel:0411-87586018, E-mail: kangtg@lnutem.edu.cn

cytochrome C oxidase subunit I (COI) gene sequences in 2003. CHEN Shi-lin proposed to identify genes with COI gene-dominated and ITS2 gene-supplemented animal medicine DNA barcoding system on the basis of a large number of experiments on animals. A large number of experiments have showed that, DNA barcoding is accurate, feasible, simple and general to identify animals, and provides a new method for identifying animal species, finding new species and authenticating animal medicines. However, because the technology is to identify by gene, it has higher requirements for experimental materials and extraction methods. Particularly, animal medicines prepared many years ago have a severe DNA degradation, which sets higher requirements for the DNA extraction technology. In this case, the technology can only identify the exact source, but not its medicinal parts, which has to be identified in the combination with other identification methods. In this article, studies on DNA barcodes at home and abroad are summarized to provide a theoretical basis for future studies and applications.

[Key words] medicinal animal; DNA barcode; mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I

动物类中药的应用在我国有着悠久的历史。早在 3 000 多年前,我国就开始了蜂蜜的使用,鹿茸、麝香、阿胶、蕲蛇等的药用和珍珠、牡蛎的养殖等在我国也有两三千年的之久。从本草的记载来看,历代本草共记载有动物药 600 余种^[1]。鉴别动物药的常见方法为传统鉴别方法,主要为形态鉴别、显微鉴别和理化鉴别^[1]。近年来又发展了蛋白分析技术,免疫学技术,DNA 方法,核酸探针杂交法等现代技术。随着技术的不断发展,人们对能够快速、准确、通用、方便地鉴别动物药材的技术更加渴望,上述方法未能满足这 4 个条件,而 DNA 条形码则满足这些条件。DNA 条形码是利用基因组中一段公认的、相对较短的 DNA 序列来进行物种鉴定的一种分子生物学技术,根据其碱基序列的不同进行鉴别不同的生物。Hebert 等^[2-3]于 2003 年首次将一段长度约为 650 bp 的线粒体细胞色素 C 氧化亚基 I(COI)基因序列作为动物条形码鉴定的基因片段。陈士林等^[4]通过对大量中药材样本进行 DNA 条形码分子鉴定研究,确立了以 COI 为主,ITS2 为辅的动物类药材 DNA 条形码鉴定体系。李海涛等^[5]利用 DNA 条形码技术对贝类 26 个形态种进行鉴别并结合系统发育树(Neighbour-Joining tree, NJ),准确鉴定物种;贾静等^[6]对穿山甲及其混伪品共计 7 个物种 56 份样品进行 DNA 条形码鉴定,并构建 NJ 树显示穿山甲和混伪品能够完全鉴别开;张红印等^[7]对蜈蚣及其混伪品合计 5 个物种 50 份样品进行 DNA 条形码的鉴定,基于 COI 基因序列构建 NJ 树显示蜈蚣能与混伪品准确鉴别开。本文综合国内为有关 DNA 条形码技术应用的文章,表明该技术适用于动物鉴别,为动物中药材的鉴别提供一定的思路与方法。

1 动物类中药 DNA 条形码鉴定研究背景

1.1 应用 DNA 条形码的背景及其必要性 动物药

作为中药使用中重要的一部分,已经有上千年的应用历史。据记载,动物药已经达到 2 215 种^[1]。由于其分布广泛,种类繁多,人们的用药方法随着地域性的不同及时代的变迁也有所不同,同名异物及使用药用部位不同的现象比较突出,鉴别动物药材的难度较大。近年来动物药的使用量呈现上升趋势,但药用动物的养殖规模没有达到市场要求,其养殖数量远远小于市场需求,混伪品代替真品的过程中产生了巨大的经济利益,加速了混伪品数量的增加。动物药材主要以器官入药,完整的器官较易鉴别,但在市场中存在较多破碎的器官、组织,给传统鉴别带来了较大的挑战。而培养专业的鉴定人才需要花费更多的时间、精力和金钱,市场上急需一种新的技术能够准确、快速地鉴别动物类中药材。随着分子生物学的快速发展,有许多技术已经应用在各个方面。在此基础上,Tautz 等^[8]在 2002 年提出 DNA 分类的概念,以 DNA 序列为基础来鉴别生物物种,发掘潜在物种及新物种,并指出 DNA 分类学是鉴别的发展趋势。Hebert 等^[2]在 2003 年提出 DNA 条形码的概念,通过一段较短而又能区分物种的 DNA 特定片段来进行鉴别物种,从而避免了物种形态发生变化造成无法鉴别的现象发生;并首次提出通过测定 COI 来鉴别动物物种(除腔肠动物外)。COI 基因具有很多的优点,其中包括较为稳定而又有足够的变异,序列长度较为适中等。

在 2003 年全球著名的生物学专家在美国的冷泉港召开两次会议,深入讨论了 DNA 条形码的科学性和实用性,最终确立的以 COI 为主,ITS2 为辅鉴别动物物种的生物技术^[3,9-10],提出了国际 DNA 条形码计划(IBOL)。2004 年生命条形码联盟成立^[11]旨在为促进 DNA 条形码的发展,扩充 DNA 条形码的数量,建立了 DNA 条形码序列数据库,为鉴别世

界生物物种提供了坚实的依据。针对全球鸟类的计划 (All birds Barcoding Initiative), 全球鱼类计划 (Fish Barcode of Life Initiative), 鳞翅目昆虫计划 (All Lepids Barcode of Life), 极地生物计划 (Polar Barcode of Life) 等 DNA 条形码项目正在实施。2007 年 5 月, 加拿大圭尔夫大学建立了生命条形码数据库 (Barcode of Life Data Systems, BOLD) 该数据库收集的信息包括物种 DNA 的序列、物种描述、地理分布和标本信息等。

1.2 鉴定动物药材的非 DNA 技术的方法 传统鉴别方法现在依然应用在大部分的鉴别领域, 由于其对于有丰富鉴别经验的鉴定工作者有着许多现代技术无法比拟的优势, 依然是快速鉴别药材的主要手段, 特别是在野外、缺乏仪器的实验室、贫困地区等。传统鉴别方法主要有形态鉴别、显微鉴别、理化鉴别和其他^[11-16], 这些鉴别方法在生活中依然占据着重要的作用, 是鉴定的基石。随着技术的发展, 传统鉴别手段逐渐向数字化技术发展。

1.3 鉴定动物类中药的 DNA 分子标记方法 由于分子技术的应用, 通过 DNA 技术在鉴定物种上得到较快的发展, 发明了较多的 DNA 鉴定技术来鉴别各个物种, 其技术分别为: 核酸探针杂交法^[17-18], 微卫星 DNA 分子标记^[19], 随机扩增片段长度多态^[20], DNA 芯片技术^[21], DNA 指纹技术^[22-23], PCR 测序技术^[24-27] 等技术, 均能正确测定不同的物种。但由于这些 DNA 技术操作复杂, 使用时有诸多限制, 至今未能大规模的应用在各个物种领域。在分子应用中新发明的一种技术为 DNA 条形码技术, 该技术能够克服上述技术的缺点, 能够较准确鉴别各个物种, 且能够大规模的应用在各个方面。由于 DNA 条形码具有准确性、通用性、简便性、快速、经济等优点, 现已得到广泛应用。

1.4 DNA 条形码的原理及操作步骤

1.4.1 DNA 条形码的定义及原理 DNA 条形码分子鉴定法是利用基因组中一段公认的、相对较短的 DNA 序列来进行物种鉴定的一种分子生物学技术, 是传统形态鉴别方法的有效补充。由于不同物种的 DNA 序列是由腺嘌呤 (A), 鸟嘌呤 (G), 胞嘧啶 (C), 胸腺嘧啶 (T) 4 种碱基以不同顺序排列组成, 因此对某一特定 DNA 片段序列进行分析即能够区分不同物种^[4,28]。

1.4.2 DNA 条形码技术的操作步骤及后期处理 通过 DNA 条形码技术来鉴别动物药材需要通过如下步骤, ①供试品的处理: 用 75% 的乙醇擦洗或者

浸泡去除外来基因原; ②DNA 提取: 通过仪器等使线粒体或核酸内的 DNA 释放出来并用提取试剂盒进行提取; ③PCR 扩增: 选择或者制备一条合适的 PCR 引物, 利用 PCR 扩增仪并采用合适的反应条件进行扩增; ④PCR 产物检测: PCR 产物通过琼脂糖凝胶电泳进行检测; ⑤DNA 条形码测序: 将 PCR 产物送至条形码检测公司进行测序; ⑥DNA 序列的后期处理: 先下载你所需要的基因序列, 应用相应的软件去检测所测基因的物种并用相应的软件建立系统树等所需要的内容^[4]。

2 动物类中药 DNA 条形码的研究现状

动物的分类主要根据动物细胞的分化、胚层的形成、体腔的有无、对称的形式、体节的分化、骨髓的性质、附肢的特点及器官系统的发生、发展等基本特征而划分为若干动物类群。在动物分类系统中与药用动物有关的有 10 门, 它们是 (由低等到高等): 原生动物门 (Protozoa), 多孔动物门 (Porifera), 肠腔动物门 (Coelenterata), 扁形动物门 (Platyhelminthes), 线形动物门 (Nematomorpha), 环节动物门 (Annelida), 软体动物门 (Mollusca), 节肢动物门 (Arthropoda), 棘皮动物门 (Echinodermata), 脊索动物门 (Chordata)^[1]。

药用动物种类较多的有脊索动物门、节肢动物门和软体动物门, 其次是环节动物门和棘皮动物门。现将 6 个动物门的主要特征和 DNA 条形码研究现状简介如下。

2.1 脊索动物门 (Chordata) 脊索动物门在动物进化系统中是最高等的类群, 主要特征为有脊索, 它是位于背部的一条支持身体纵轴的棒状结构。低等脊索动物终生存在, 高等动物只在胚胎期间有脊索, 成长时即由分节的脊柱取代。

脊索动物门可分为 3 个亚门: 尾索动物亚门 (Subphylum Urochordata), 头索动物亚门 (Subphylum Cephalochordata) 和脊椎动物亚门 (Subphylum Vertebrata)。其中与药用关系密切的是脊椎动物亚门, 本亚门是动物界中最高级的类群, 分为圆口纲、鱼纲、两栖纲、爬行纲、鸟纲及哺乳纲 6 个纲。现将药用价值较大的 4 个纲的主要特征与 DNA 条形码的研究。

2.1.1 鱼纲 (Pisces) 全为水生, 以鳃呼吸, 体表被鳞。以鳍运动, 除有奇鳍外, 并具成对的附肢 (偶鳍, 即 1 对胸鳍和 1 对腹鳍)。头不能运动。心脏有一心房一心室, 为单循环。药用动物有海马、海龙等。

全球现生种鱼类共有 24 618 种,占已命名脊椎动物一半以上,且新种鱼类不断被发现,平均每年以约 150 种新物种被发现,十多年约增加超过 1 500 种,目前全球已命名的鱼种应在 26 000 种以上。如此庞大的种群利用传统分类系统已经很难将鱼类正确的分类,这就需要利用 DNA 条形码科学化、系统化的优点进行物种的分类,这样利用基因序列才能够准确的将不同的物种进行分类并发现新物种及其隐藏种。Costa 等^[29],Zhang 等^[30]通过对大量海洋鱼类 DNA 条形码 COI 基因进行测序,均能够准确鉴别不同种的鱼类并建立了海洋鱼类 DNA 条形码数据库;周美玉等^[31]成功通过 DNA 条形码技术鉴别 7 种不同鱼卵和仔稚鱼;胡嵘^[32]通过对海马、海龙及其混伪品共 14 个种 20 份样品的 COI 条形码序列进行研究,结果表明,海马、海龙 COI 序列可以明确的与混伪品 COI 序列区分开;温珑莲^[33]对 8 种海马进行 COI 基因测序,并通过 GeneBank 下载相关基因序列,结果表明通过测定 COI 基因序列能够很好地将不同种的海马区别开。

2.1.2 两栖纲 (Amphibia) 是脊椎动物从水生开始向陆生过渡的一个类群。水陆两栖,体表皮肤裸露无鳞,但富于腺体,能使皮肤湿润,具五趾型的四肢。幼体水中生活,用鳃呼吸;幼体经过变态发育成成体,成体以肺和皮肤呼吸。心脏具两心房一心室,为不完全的双循环(肺循环与体循环)。为变温动物。药用动物有林蛙、蟾蜍等。

由于形态特征的相似性,林蛙属各物种的识别较为困难。近年来,随着 DNA 序列分析技术的迅速发展,其在物种和个体识别亲缘关系鉴定以及分子进化和系统发育关系分析等诸多方面显示了极大的优势,从而得到了广泛的应用。由于母系遗传和不存在重组过程的特点,线粒体 DNA 在很多动物研究中被证明能够很好地展现物种系统发生关系^[34]。周瑜等^[35]利用线粒体 Cytb 和 COI 基因对中国林蛙组、长肢林蛙种组与黑龙江林蛙种组共计 17 个蛙种进行鉴别和系统发育关系分析,其中包括近年发表的新种徂徕林蛙 (*Rana culaiensis*)^[36],猫儿山林蛙 (*Rana maoershanensis*)^[37]和 *R. jiemuxiensis*^[38],序列分析结果表明各个物种大部分都能够鉴别开,徂徕林蛙与长肢林蛙 *P*-distance 值介于 Kartavtsev 和 Lee (2006)^[39]分析的种内与相近物种之间;猫儿山林蛙与长肢林蛙种组物种关系较近,最近为昭觉林蛙。

2.1.3 爬行纲 (Reptilia) 真正的陆栖动物,皮肤干燥,有角质或骨板。脊柱有颈椎、胸椎、腰椎、荐椎

和尾椎的分化。四肢强大,趾端具爪。心脏有二心室、一心房或近于二心室,以肺呼吸。在胚胎时期有羊膜结构。为变温动物。药用动物有蛇类、蜥蜴、蛤蚧等。

我国利用爬行类动物药材的历史可以追溯到战国时期,其主要使用方式为药用、食用、制革等。由于爬行动物种类繁多,种间的差异较小,个体大小及其不同种间的幼崽相似度较高,在形态上较难鉴别,这就需要通过 DNA 条形码来鉴别真伪。蛇是在生活中常见的一种药用爬行动物,其种类较多,普通人难以将真品和混伪品进行区分,而通过 DNA 条形码则很容易将其区分开并在实际生活中已经开始应用。相关研究分别对东南亚 11 中蛇类、金钱白花蛇及其混伪品、3 中不同蛇类的蛇蜕运用 DNA 条形码 COI 基因序列进行测序,均能够很好的将不同蛇类鉴别出来^[40-43];李晓玲等^[44]通过对不同品种的蜥蜴、蛤蚧及其混伪品进行 COI 基因序列进行测序,均能够将不同品种的物种区分出来。

2.1.4 哺乳纲 (Mammalia) 哺乳动物是动物发展史上最高等的阶段。体外被毛,皮肤腺发达。心脏四腔,具完全双循环,恒温,肺具肺泡。药用动物有梅花鹿、马鹿、麝、藏羚羊、牦牛等。

哺乳类动物药在动物药中占有重要的市场地位,特别是一些名贵动物药材很大一部分来自哺乳类,例如:麝香、鹿鞭、鹿茸、羚羊角等,其市场中的混伪品较多。由于哺乳类动物生长缓慢,饲养时间较长,成本较大等原因,造成市场上哺乳类动物药的数量远小于市场需求量,大量的混伪品流入市场造成极大的市场混乱,给正规的哺乳类动物药养殖基地带来极大的威胁,这时市场急切需要一种能够准确鉴别动物药材的技术。DNA 条形码技术在哺乳类动物药中的应用,为市场的规范化做出重要的贡献。国内已经开始大量应用 DNA 条形码进行哺乳类动物药材的鉴定。崔丽娜等^[45]、张蓉等^[46]利用 DNA 条形码测定 COI 基因序列均成功鉴别了鹿茸及其伪品;刘冬等^[47]通过对鹿茸、鹿角、鹿鞭、鹿筋、鹿尾、鹿胎分别进行 DNA 条形码 COI 基因测序,均能很好鉴别出市售 40 份药材中 8 个物种的真品及其伪品;杜鹤等^[48]通过毛发、毛壳麝香上的密生短毛或麝香仁里脱落毛发等利用 COI 进行鉴别测序,成功鉴别出 12 份药材 7 个物种的真品及其混淆品。阿依努尔·阿卜杜艾尼^[49]通过对 7 个科,16 个种的总共 62 份样本,其中分别为有 51 份肌肉样本,5 份粪便样本,6 份血液样本的动物样本进行 COI 分析,

成功鉴别出藏羚羊、牦牛、雪豹、马鹿、天山马鹿等十分名贵的药用动物。

2.2 棘皮动物门(Echinodermata) 形态多种多样,有星形、球形、圆柱形、树枝形等。成体为辐射对称,幼体则两侧对称。体表有许多棘状突起,故称棘皮动物。药用动物有海参、海胆等。

律迎春^[50]对仿刺参、梅花参、加州拟刺参和北大西洋瓜参进行 COI 基因测序,结果显示该方法能够同时检测混合样品中的所有海参种类。闫晗^[51]对大连 5 处产地的仿刺参作 ISSR 和 COI 基因测序研究,结果表明其中 2 处(皮口、大刘家)仿刺参为一支,其余为一支;陈丽梅等^[52]通过对来自 7 个不同地域的参进行 COI 基因鉴别,结果表明长岛和荣成刺参序列差异最小,和日本刺参序列差异最大;刺参和其他科 3 种海参种间的序列差异远远高于刺参种内差异。曾晓起等^[53]通过测定 5 种海胆的 COI 基因片段,表明其中哈氏刻肋海胆,细雕刻肋海胆, *Temnopleurus alexandri* 三者亲缘关系较近,芮氏刻肋海胆和 *T. michaelsoni* 亲缘关系较近。

2.3 节肢动物门(Arthropoda) 为动物界种类最多的一门,现存种类已达 100 余万种,占已知动物种类的 85%。它们分布极广,具有高度的适应性。节肢动物门分为 3 个亚门,7 个纲。其药用价值较大的 4 个纲分别为甲壳纲、蛛形纲、多足纲、昆虫纲,以上 4 纲中,又以昆虫纲种类最多,有近一百万种,药用动物种类也最。药用动物有蜈蚣、斑蝥、家蚕、地鳖、蚂蚁等。

张红印等^[7]对 5 个物种的 50 份样品进行序列测定并与 GeneBank 中的相关序列进行比对,结果显示实验样品均可以获得 COI 序列,蜈蚣药材与其混伪品 COI 序列种间平均 K2P 距离为 0.222,种间最小 K2P 距离为 0.190,因此基于 COI 条形码序列可以准确鉴定蜈蚣及其混伪品。陈仕江等^[54]以我国重要的中药资源芫菁科 7 种斑蝥为研究对象,分析线粒体 COI 基因序列,研究表明以 COI 基因作为芫菁 DNA 条形码进行物种鉴定具有一定的可行性。刘巍^[55]利用 COI 基因技术,对中国家蚕蛾属 6 种进行 COI 基因测序并建立系统树,结果表明该技术能够很好地区分各个蛾属不同的种。武松等^[56]对柞蚕和蓖麻蚕的 COI 基因进行测序并从 GenBank 下载相关基因进行比对,结果表明 COI 基因测序能够很好地鉴别柞蚕和蓖麻蚕。陈媛^[57]通过 DNA 条形码鉴别 16 种蚂蚁,分别对 COI, ITS1, ITS2 进行测序,并比较 COI, ITS1, ITS2, COI + ITS1, COI + ITS2,

COI + ITS1 + ITS2 的序列,得出 COI 有较多的变异位点,在测定种间、种内的遗传距离具有较大的优势;但由于 COI, ITS1, ITS2 在种间、种内的基因差异存在广泛的重叠区,无明显的种间阈值存在,表明单依靠 DNA 条形码鉴定物种结果并不准确,经过 DNA 条形码构建的系统发育树与传统形态学差异,因此应该多种方法的综合分类以达到准确鉴定物种的目的。

2.4 软体动物门(Mollusca) 为动物界第二大门。身体柔软,不分节,除腹足纲外为左右对称,由头、足及内脏团三部分组成,具次生体腔。外套膜和贝壳的形成是软体动物的显著特征。多为水生,少数陆生。药用动物有杂色鲍、牡蛎、乌贼等

虽然软体动物入药时间可追溯到战国时期,但由于地理环境的限制,大部分软体动物生活在海里而且至今人工养殖技术依然不够成熟或在某些软体动物养殖上依然处于空白地位。软体动物在古代的发展并没有陆地上其他动物药材那样应用广泛,但其具有明显的药理作用,在应用上依然有着广泛的应用。随着现代的发展,软体动物无论在药用、食用、饰品等方面的需求正在呈现逐年上升趋势,混伪品的数量和种类不断增加,其鉴别难度也在增加,这就急需通过 DNA 来鉴别市场上的真品与混伪品。高晓晨等^[58]通过对《中国药典》收录的 7 中软体动物真品及其混伪品进行 DNA 条形码 COI 的鉴别,均能够鉴别出其真伪品的品种。辛一^[59]测定了中国及日本沿海 5 个皱纹盘鲍群体共 16 个个体的线粒体基因 COI, COII 以及 CYTB 的完整序列。研究表明,上述 3 种基因的序列构成和遗传多样性都具有一定相似性,且三者都可用于区分上述鲍属物种。鉴于目前 COI 具有完善的通用引物,并且具有较多的公布序列,本研究建议采用 COI 序列作为目前鲍属物种鉴定的 DNA 条形码。

2.5 环节动物门(Annelida) 为真体腔动物,是高等无脊椎动物开端。体圆柱形或扁平形,两侧对称,身体分节(由相似的体节组成),多为自由生活。药用动物有水蛭、沙蚕、地龙等。

环节动物门在动物进化上发展到一个较高的阶段,是高等无脊椎动物的开始,约有 13 000 种。全世界均有分布,可见于各类生境,尤其在海洋、淡水或湿土中。已知的环节动物常见环节动物有:蚯蚓、蚂蟥(又称水蛭)、沙蚕等。近年来随着对蚂蝗、沙蚕等产品的开发,市场上对其产量的要求产生了严峻的挑战,大量的混伪品涌入市场,给其发展带来了

严峻的挑战。刘晓帆等^[60]基于 DNA 条形码 COI 技术对水蛭、柳叶蚂蟥与其混伪品进行基因测序,结果表明各个物种种间存在较多变异位点,能够将水蛭的真品及其混伪品鉴别开来。王一泉等^[61]对 COI 基因序列和 ISSR 分子标记技术对我国 7 个地方的沙蚕进行基因的测序,通过建立系统树模型,系统树分析表明供试群体内 COI 具有较高的遗传多样性,与 ISSR 分析结果相一致。

2.6 肠腔动物门 (Coelenterata) 为低等后生动物。体形辐射对称,具内外两胚层,有原始的消化腔,有口无肛门,行细胞外及细胞内消化。有组织分化,具原始的肌肉结构和原始的神系统(神经网),有刺细胞。有骨骼时,为钙质或角质。全为水生,营固着或漂浮生活。药用动物有水母、海蜇、珊瑚等。

肠腔动物又称为刺胞动物,大部分分布在海中,可分为有性繁殖和无性繁殖,有些物种种属间聚集在一起,由无数个个体构成一个较大的个体,如珊瑚;有些物种在幼年与成年的外观有较大的差别,外观随着环境而变化,存在较多潜在物种的可能性,如水母;有些形态、大小极其相似,如海葵。这些刺胞动物由于上述特定的原因,往往通过外观形态极难辨别,这就需要通过 DNA 条形码技术进行快速、准确的鉴别。张瑄妮等^[62]基于 COI 和 16S 片段来鉴别水螅水母,发现两种方法均能鉴别水母的种属。

2.7 其他 由于原生动物门(Protozoa),多孔动物门(Porifera),扁形动物门(Platyhelminthes),线形动物门(Nematomorpha)四大门类的药用种类较少,利用 DNA 条形码来鉴别动物的文献较少,在此就不再一一陈述。

3 讨论

DNA 条形码由于其基因序列较短、有充足的基因变化、测序较为简单、鉴别度较高等优点正在逐年增加其在生活中的应用。特别是在名贵中药材方面发挥着重要的作用,不仅可以鉴别其真伪,亦能发现物种之间的生物亲缘关系,从而获得更加准确的物种分类信息。在通过 COI 技术,能够较准确的鉴别除刺胞动物以外的动物,但在对于一些动物,单纯的通过 COI, ITS1, ITS2 等 DNA 条形码并不能准确的鉴别,因为有些基因存在重叠区域,单纯的依靠 DNA 条形码技术并不能将两种同属间的动物完全鉴别出来,这时就需要结合外观形态及其他传统鉴别方法才能够鉴别。对于蚂蚁的鉴别,单纯的依靠 DNA 条形码技术不能够将多种蚂蚁的种属进行系

统的分类,需要结合传统鉴别方法才能鉴别出来。绝大部分的脊椎动物通过 COI 能够鉴别出来,对于部分脊椎动物由于个体的差异,通用的 COI 正向、反相引物并不能很好地得到所需要的基因片段,这就需要根据实际需要在通用引物的基础上自行设计出所需要的引物,得到所需要的基因。但由于 DNA 条形码只能鉴别来源而不能鉴别药用部位,在应用上具有一定的局限性;对于放置时间较长的动物药材,由于细胞的衰亡和 DNA 的降解,在利用 DNA 条形码进行鉴别时难以将指定的 DNA 片段利用 PCR 扩增仪进行大量转录、复制或者指定的 DNA 片段全部降解而不能鉴别其来源,这就大大限制其大规模的应用,还需要结合蛋白质等物质来进行来源、药用部位的鉴定。

DNA 条形码技术是一个时代发展的标志,是人类在鉴定学上和分类学上的巨大的飞跃。从此人类步入了从传统鉴定、分类学上转入现代生物分子技术来鉴定和分类物种的时代。人们对 DNA 条形码的广泛应用,给笔者的生活带来的巨大的好处。但由于 COI, ITS1, ITS2 等 DNA 条形码技术并不能鉴别所有的物种,对于一些特殊的物种、变异种或者潜藏种还需要开发更加便捷、应用更加广泛的分子鉴定手段。

[参考文献]

- [1] 康廷国. 中药鉴定学 [M]. 9 版. 北京:中国中医药出版社,2012:432-440.
- [2] Hebert P D, Cywinska A, Ball S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes [J]. Proc Biol Sci, 2003, 270(1512):313-321.
- [3] Hebert P D, Ratnasingham S, Dewaard J R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit I divergences among closely related species [J]. Proc Biol Sci, 2003, 270(Suppl 1):S96-99.
- [4] 陈士林,姚辉,韩建萍,等. 中药材 DNA 条形码分子鉴定指导原则 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(2): 141-148.
- [5] 李海涛,张保学,高阳,等. DNA 条形码技术在海洋贝类鉴定中的实践:以大亚湾生态监控区为例 [J]. 生物多样性, 2015, 23(3):299-305.
- [6] 贾静,张红印,陈俊,等. 名贵动物药材穿山甲的 DNA 条形码分子鉴定研究 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(12):2212-2215.
- [7] 张红印,陈俊,贾静,等. 中药材蜈蚣及其混伪品 DNA 条形码鉴别研究 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(12):2208-2211.

- [8] Tautz D, Arctander P, Minelli A, et al. DNA points the way ahead in taxonomy [J]. Nature, 2002, 418 (6897): 479.
- [9] El-Ashker M, Hotzel H, Gwida M. Molecular biological identification of babesia, theileria, and anaplasma species in cattle in Egypt using PCR assays, gene sequence analysis and a novel DNA microarray [J]. Vet Parasitol, 2015, 207 (3/4): 329-334.
- [10] Stoeckle M Y, Thaler D S. DNA barcoding works in practice but not in (neutral) theory [J]. PLoS One, 2014, 9 (7): e100755.
- [11] Marshall E. Taxonomy: will DNA bar codes breathe life into classification? [J]. Science, 2005, 307 (5712): 1037.
- [12] 周用武, 杨玉华. 动物物种鉴定的非 DNA 方法评述 [J]. 通化师范学院学报, 2009, 30 (10): 58-61.
- [13] 程轩轩. 动物药残留毛的显微鉴定研究 (Ⅲ) [D]. 沈阳: 辽宁中医学院, 2005.
- [14] 赖小平, 赵树进, 陈念. DNA 条形码的原理和应用 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2010: 35-41.
- [15] 周虞灿, 夏武平. 三种鼠兔血清蛋白和血红蛋白的电泳比较——高原鼠兔分类地位的探讨 [J]. 兽类学报, 1981, 1 (1): 39-44.
- [16] 冯振波, 乔宛虹, 郭柏, 等. 应用免疫学方法进行虎骨鉴别的研究 [J]. 中国中药杂志, 1992, 17 (4): 196-198, 254.
- [17] 石丰运. 应用基因芯片技术鉴别检测动物源性成分 [D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2010.
- [18] Keskin E, Koyuncu C E, Genc E. Molecular identification of hysterothylacium aduncum specimens isolated from commercially important fish species of Eastern Mediterranean Sea using mtDNA cox1 and ITS rDNA gene sequences [J]. Parasitology Int, 2015, 64 (2): 222-228.
- [19] Gilmore S, Peakall R, Robertson J. Short tandem repeat (STR) DNA markers are hypervariable and informative in cannabis sativa: implications for forensic investigations [J]. Forensic Sci Int, 2003, 131 (1): 65-74.
- [20] Yildirim N, Sunar S, Agar G, et al. Biochemical and molecular characterization of some centaurea species growing in the eastern anatolia region of Turkey [J]. Biochem Genet, 2009, 47 (11/12): 850-859.
- [21] 李凌, 马文丽. DNA 芯片技术研究进展 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2000, 16 (2): 151-155.
- [22] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting [J]. Nucleic Acids Res, 1995, 23 (21): 4407-4414.
- [23] 孙希福. 基于形态学和分子生物学资料探讨中国沿海 10 种虾虎鱼类的系统发育关系 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2009.
- [24] 艾斯卡尔·买买提, 马合木提·哈力克, 日沙来提·吐尔地, 等. 应用 mtDNA 16S rRNA 基因测序鉴定肉产品种属 [J]. 中国法医学杂志, 2011, 26 (5): 391-392, 396.
- [25] Woo P C, Teng J L, Yeung J M, et al. Automated identification of medically important bacteria by 16S rRNA gene sequencing using a novel comprehensive database, 16SpathDB [J]. J Clin Microbiol, 2011, 49 (5): 1799-1809.
- [26] Wong-Villarreal A, Caballero-Mellado J. Rapid identification of nitrogen-fixing and legume-nodulating burkholderia species based on PCR 16S rRNA species-specific oligonucleotides [J]. Syst Appl Microbiol, 2010, 33 (1): 35-43.
- [27] Mohamed A A, Zhang L, Dorrah M A, et al. Molecular characterization of a c-type lysozyme from the desert locust, schistocerca gregaria (Orthoptera: Acrididae) [J]. Dev Comp Immunol, 2016, S0145-305X (16) 30099-30114.
- [28] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 四部 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 383-385.
- [29] Costa F O, Landi M, Martins R, et al. A ranking system for reference libraries of DNA barcodes: application to marine fish species from portugal [J]. PLoS One, 2012, 7 (4): e35858.
- [30] Zhang J, Hanner R. Molecular approach to the identification of fish in the South China Sea [J]. PLoS One, 2012, 7 (2): e30621.
- [31] 周美玉, 陈骁, 杨圣云. 采用 DNA 条形码技术对厦门海域鱼卵、仔稚鱼种类的鉴定 [J]. 海洋环境科学, 2015, 34 (1): 120-125, 135.
- [32] 胡嵘, 杜鹤, 崔丽娜, 等. 海马、海龙基于 COI 条形码的 DNA 分子鉴定 [J]. 吉林中医药, 2012, 32 (3): 272-273, 276.
- [33] 温珑莲. 中药海马的品种与 DNA 条形码鉴定研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2014.
- [34] Che J, Pang J, Zhao E M, et al. Phylogenetic relation of the chinese brown frogs (Genus Rana) inferred from partial mitochondrial 12S and 16S rRNA gene sequences [J]. Zoolog Sci, 2007, 24 (1): 71-80.
- [35] 周瑜, 杨宝田. 基于线粒体 Cytb 和 COI 基因的中国林蛙系统发生关系 [J]. 长春师范大学学报, 2014, 33 (2): 70-76.
- [36] Li P, Lu Y, Li A. A new species of brown frog from Bohai, China [J]. Asiatic Herpetological Research, 2008, 3 (11): 62-70.

- [37] Lu Y, Li P, Jiang D. A new species of *Rana* (Anura, Ranidae) from China [J]. *Acta Zootaxonomica Sinica*, 2007, 5(32): 792-801.
- [38] Yan F, Jiang K, Chen H, et al. Matrilineal history of the *Rana longicrus* species group (*Rana*, Ranidae, Anura) and the description of a new species from Hunan, Southern China [J]. *Asian Herpetological*, 2011, 2(2): 61-71.
- [39] Kartavtsev Y P, Lee J S. Analysis of nucleotide diversity at the cytochrome b and cytochrome oxidase I genes at the population, species, and genus levels [J]. *Genetika*, 2006, 42(4): 437-461.
- [40] Dubey B, Meganathan P R, Haque I. DNA mini-barcoding: an approach for forensic identification of some endangered Indian snake species [J]. *Forensic Sci Int Genet*, 2011, 5(3): 181-184.
- [41] Chao Z, Liao J, Liang Z, et al. Cytochrome C oxidase subunit I barcodes provide an efficient tool for *Jinqian Baihua She* (*Bungarus parvus*) authentication [J]. *Pharmacogn Mag*, 2014, 10(40): 449-457.
- [42] 崔丽娜, 杜鹤, 张辉, 等. 基于 COI 条形码序列的金钱白花蛇及其混伪品的 DNA 分子鉴定 [J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2011, 13(2): 424-428.
- [43] 廖婧. 华南地区常见药用蛇类的 DNA 条形码研究及其在金钱白花蛇鉴定上的应用 [D]. 广州: 南方医科大学, 2013.
- [44] 李晓玲, 张月云, 徐永莉, 等. 数种蜥蜴亚目药用动物 DNA 条形码分类探讨 [J]. *中国中药杂志*, 2013, 38(7): 951-956.
- [45] 崔丽娜, 杜鹤, 刘新成, 等. 基于 COI 条形码序列的鹿茸及其混伪品的 DNA 分子鉴定 [J]. *吉林中医药*, 2012, 32(4): 384-387.
- [46] 张蓉, 刘春生, 黄璐琦, 等. 鹿茸饮片的 DNA 条形码鉴别研究 [J]. *中国药学杂志*, 2011, 46(4): 263-266.
- [47] 刘冬, 钱齐妮, 张红印, 等. 基于 COI 条形码的鹿类中药材 DNA 条形码分子鉴定 [J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2014, 16(2): 274-278.
- [48] 杜鹤, 孙佳明, 崔丽娜, 等. 基于 COI 条形码的麝香及其混伪品的 DNA 分子鉴定 [J]. *吉林中医药*, 2011, 31(5): 451-452, 468.
- [49] 阿依努尔·阿卜杜艾尼. 基于细胞色素氧化酶基因 (COI) 进行哺乳动物物种鉴定 [D]. 乌鲁木齐: 新疆大学, 2014.
- [50] 律迎春. 基于 DNA 条形码的分子生物学方法鉴定海参种类的研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2012.
- [51] 闫晗. 利用 ISSR 和 COI 序列标记分析不同地理仿刺参群体的遗传多样性 [D]. 沈阳: 辽宁师范大学, 2006.
- [52] 陈丽梅, 李琪, 李赞. 4 种海参 16S rRNA 和 COI 基因片段序列比较及系统学研究 [J]. *中国水产科学*, 2008, 15(6): 935-942.
- [53] 曾晓起, 张文峰, 高天翔. 基于线粒体 16S rRNA 与 COI 基因序列的刻肋海胆属系统发育研究 [J]. *中国海洋大学学报*, 2012, 42(6): 47-51.
- [54] 陈仕江, 鲁增辉, 廖玉凤, 等. 7 种中药材斑蝥 COI 基因序列的分子系统学研究 [J]. *西南农业学报*, 2013, 26(5): 1809-1813.
- [55] 刘巍. 中国家蚕蛾属的系统分类学研究 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2012.
- [56] 武松, 李玉萍, 夏润玺, 等. 柞蚕和蓖麻蚕的 DNA 条形码编码与系统进化分析 [J]. *蚕业科学*, 2009, 35(3): 553-538.
- [57] 陈媛. 中国蚁属 16 种蚂蚁系统发育及 DNA 条形码研究 [D]. 南宁: 广西师范大学, 2014.
- [58] 高晓晨, 孙佳明, 杜鹤, 等. 中国药用软体动物养殖与 DNA 条码鉴定 [J]. *吉林中医药*, 2012, 32(8): 820-824.
- [59] 辛一. 线粒体 COI、COII 和 CYTB 基因在鲍属物种鉴定中的适用性分析 [J]. *海洋科学*, 2011, 35(11): 58-62.
- [60] 刘晓帆, 刘春生, 杨瑶珺, 等. 基于 COI 基因的水蛭及其混伪品的 DNA 条形码研究 [J]. *北京中医药大学学报*, 2013, 36(1): 63-66.
- [61] 王一泉, 任洪伟, 朱迎军, 等. 应用 ISSR 和线粒体 COI 序列对不同地理种群双齿围沙蚕 (*Perinereis aibuhitensis*) 遗传多样性的分析 [J]. *中国农业科技导报*, 2014, 16(1): 139-147.
- [62] 张瑛妮, 郑连明, 何劲儒, 等. 基于线粒体 COI 和 16S 片段序列的北部湾北部水螅水母 DNA 条形码分析 [J]. *生物多样性*, 2015, 23(1): 50-60.

[责任编辑 邹晓翠]