

DNA 条形码 (DNA barcoding) 用于动物类 中药鉴定的应用与展望

许亮, 谷丽艳, 赵丹玉, 杨燕云, 王冰, 康廷国*
(辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600)

[摘要] 对 DNA 条形码技术的概念与特点、基因的标准与鉴别原理、操作步骤与分析方法及建立动物类中药 DNA 条形码鉴定新平台进行综述, 对该技术在动物类中药鉴定中的应用前景进行展望。

[关键词] DNA 条形码; 动物类中药; 中药鉴定

[中图分类号] R282.74 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)14-0229-03

Application and Prospect of DNA Barcoding Identification Animal Traditional Chinese Medicine

XU Liang, GU Li-yan, ZHAO Dan-yu, YANG Yan-yun, WANG Bing, KANG Ting-guo*

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

[Abstract] The concept and characteristics of DNA barcoding technology, the gene standard and identify principle, operation procedure and methods of analysis, establishing new animal traditional Chinese medicine DNA barcoding identification platform were reviewed, and the application of DNA barcoding for animal traditional Chinese medicine identification was prospected.

[Key words] DNA barcoding; animal traditional chinese medicine; identification

动物类中药在我国有着悠久的历史,早在4 000年前甲骨文就记载了麝、犀、牛、蛇等 40 余种药用动物。据统计,历代本草共计载有动物药 600 余种^[1]。文献记载的调查显示,中国药用动物有 1 581 种,占全部中药资源总数的 12%^[2]。药用动物及动物类中药的准确鉴别对于临床用药的准确可靠、中药厂生产的稳定可控具有重要意义。

DNA 条形码 (DNA barcoding) 是利用标准的、有足够变异的、易扩增且相对较短的 DNA 片段自身在物种种内的特异性和种间的多样性而创建的一种新的身份识别系统,它可

以对物种进行快速的自动鉴定^[3]。其思想产生于现代商品零售业的条形码系统,就像以超市条形码识别产品一样,利用 A, T, C 和 G 4 个碱基在基因中的排列顺序识别物种。

加拿大圭尔夫大学 (University of Guelph) Paul Hebert 教授率先于 2003 年选取线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 I (cytochrome c oxidase subunit I, CO I) 作为动物中通用的物种鉴定标记进行研究^[4]。目前, DNA 条形码技术在很多动物分类群中得到了成功的应用^[5-12]。国内学者应用 DNA 条形码技术在动物分类方面进行了研究报道^[13-23]。

1 DNA 条形码的概念与特点

生命 DNA 条形码协会 (Consortium for the barcode of life, CBOL) 对 DNA 条形码的定义是: DNA 条形码即一段能够高效鉴定物种的 DNA 标准区域。

DNA 条形码技术具有以下几个显著的特点: ① 直接利用 DNA 序列进行物种的鉴定, 基于生物的基因型, 具有独一无二的可重复性, DNA 序列在生物个体发育过程中不会改变, 同种生物不同生长期的 DNA 序列信息是相同的, 即使经过加工, 形态发生变化, 而 DNA 序列信息不会改变, 较之传统的方法, 扩大了检测样本的范围, 同时样本部分受损也不会

[收稿日期] 20100621(005)

[基金项目] 科技部资助项目 (2005DKA21004); 辽宁省教育厅项目 (2009A496); 辽宁中医药大学青年药理学人才基金课题 (YXRC0920)

[第一作者] 许亮, 讲师, 博士, 研究方向: 中药资源与鉴定的研究及开发, Tel: 0411-87586004, E-mail: xul@lnutcm.edu.cn

[通讯作者] * 康廷国, 教授, 博士研究生导师, 研究方向: 中药鉴定与品种评价, Tel: 0411-87586028

影响识别结果;②DNA 条形码序列具有通用性,只需一对或几对通用引物,在不同物种之间具有可比性,在全球物种鉴定中可以形成统一的标准,适用于非专家物种鉴定。设计一套实验流程,技术人员就可完成鉴定工作;③准确性高,鉴别速度快,特定的物种具有特定的 DNA 序列信息,而形态学鉴别特征会因趋同和变异导致物种的鉴别失误,通过建立 DNA 条形码数据库,可一次性快速鉴定大量样本。

2 DNA 条形码编码基因的标准与鉴别原理

作为 DNA 条形码的编码基因综合起来应符合以下标准:①具有足够的可以区分物种的变异和分化,同时种内变异要足够小;②具有高度保守的引物设计区以便于设计通用引物;③应该包含足够的系统进化信息以定位物种在系统中的位子;④片段足够短,以便于 DNA 提取和 PCR 扩增。目前有足够的分子进化研究数据表明线粒体基因组是最佳的 DNA 条形码编码基因目标,因为线粒体基因没有内含子,没有等位基因重组事件,是母系遗传的单倍体,并且通用引物能够扩增绝大多数动物物种。线粒体基因组 CO I -5'端的区域被选作绝大多数高等动物的编码基因,这个区域长度为 648 bp,相邻的保守序列使得这个区域易于扩增和分析。理论上一个长度为 15 bp 的序列,每个位点有 4 个状态,能产生 10 亿个代码,远超过估计的动物物种数。在应用中没有必要分析如此短的 DNA 片段,因为能轻松得到 600 bp 的 DNA 片段,依据每百万年 2% 的进化速率,一个有 1 百万年生殖隔离历史的物种类群,600 bp 的 DNA 序列平均就有 12 个特征信号位点可用于识别,即使在亲缘关系很近的类群中,大多数物种的进化历史都超过 1 百万年,所以 CO I 基因 600 bp 的 DNA 片段足够分析绝大多数动物物种^[24],因此,CO I 条形码具有很高的物种鉴别可靠性。

3 DNA 条形码的操作步骤与分析方法

DNA 条形码的操作步骤首先是采集所需样品并提取 DNA,然后设计和合成通用引物,进行 PCR 扩增,筛选引物,优化反应条件,测序,序列编辑、人工校正,最后进行分析,将结果提交到相关数据库。应该包括下列信息:①物种名称;②凭证标本信息(目录号、馆藏号、配有照片以及形态特征等有关信息的文字描述);③采集号(采集人、采集日期和 GPS 定位地点);④标本鉴定人;⑤序列信息;⑥用于扩增的引物;⑦序列峰图^[25]。

DNA 条形码分析方法:①序列比对和人工校对;②遗传距离计算:种间距离通常采用 pairwise uncorrected p-distance 或 Kimura-2 parameter distance (K_2P)模型计算。 K_2P 是生物条形码联盟(CBOL)推荐使用的距离计算模型。种内距离通常采用 3 种参数表示: K_2P 距离,平均 θ 值和平均溯祖度。 K_2P 距离可以通过 MEGA 或 PAUP 计算,在此基础上计算其余 2 个参数,通常认为每个物种内不超过 10 个个体,并最好包括 5 个不同居群;③系统学分析:条形码分析中通常采用标准的分子系统学方法建立多种系统树。建树的目的并不是利用条形码重建系统发育树,而是为了检验每个物种的单

系性,即同一物种的不同个体能否紧密聚类在一起。认为 MP 和 UPGMA 树得到的物种正确识别率最高;④barcoding gap 检验:理想条形码检测到的同属内种间遗传变异应明显大于种内遗传变异,并在两者之间存在显著差异,形成一个明显的间隔区,称作 barcoding gap。barcoding gap 是评价 DNA 条形码理想与否的一个重要指标,因此现阶段评价各片段时通常会进行 barcoding gap 检验。该检验实际上是用柱形图呈现种间、种内的遗传距离的分布频率,一般采用 TaxonDNA 软件结合一般的统计软件来完成。

4 DNA 条形码在动物类中药鉴定的应用与展望

已经开展的动物条形码计划有,ABBI(鸟类 DNA 条形码计划)、FISH-BOL(鱼类 DNA 条形码计划)、FBI(实蝇 DNA 条形码计划)、MBI(蚊子 DNA 条形码计划)、INBIPS(入侵生物和害虫 DNA 条形码计划)和 BLOD(生命的 DNA 条形码数据库)等。我国学者对动物的分类研究也关注该 DNA 条形码技术^[26],如:对斑腿蝗科 7 种蝗虫采用 CO I 基因建立 DNA 条形码进行研究,对蚜虫类昆虫进行了 DNA 条形码研究^[27],对长江中下游褶皱纹冠蚌 10 个居群 CO I 基因序列进行分析^[28]。DNA 条形码技术已经取得了较大的进步,也得到了许多生物学家的支持^[29,30],但同时也有部分专家学者对此持怀疑态度^[31]。应用 CO I 基因进行 DNA 条形码鉴定也有局限,如杂交/基因渗入、新近起源物种、分子进化速率差异等,幸运的是这些不会影响一般水平的物种鉴定。对那些 CO I 基因不能有效鉴定的类群,可以使用辅助的基因,也可以与 DNA 芯片技术相结合。对药用动物与动物药条形码鉴别研究处于起步阶段,陈士林等学者对基于 DNA barcoding(条形码)技术的中药材鉴定进行了综述^[32],但相关的报道较少,我们提出建立药用动物与动物药 DNA 条形码鉴定平台,参考 BLOD 的相关标准,建立适合中医药发展的动物类中药与药用动物的鉴定新平台,技术路线见图 1。当技术发展成熟后,可以应用自动分析仪进行简单快捷准确的非专业人员就能完成鉴定工作。药用动物与动物药 DNA 条形码计划与药用植物与植物药 DNA 条形码计划的实施必将促进中医药资源与鉴定领域的发展。

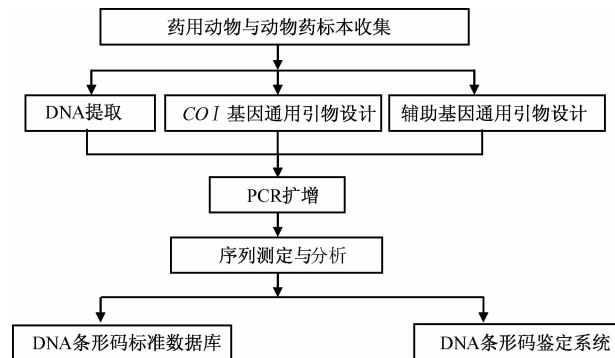


图 1 药用动物与动物药 DNA 条形码鉴定平台技术路线

[参考文献]

- [1] 康廷国. 中药鉴定学[M]. 北京:中国中医药出版社, 2003:479.
- [2] 中国药材公司. 中国中药资源志要[M]. 北京:科学出版社,1994:7.
- [3] Hebert PDN, Cywinska A, Ball S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes [J]. Proc Biol Sci, 2003,270:313.
- [4] PDN Hebert, S Ratnasingham, de Waard J R. Barcoding animal life: cytochrome oxidase subunit 1 divergences among closely related species [J]. Proc Biol Sci, 2003, 270: S96.
- [5] Hebert PDN, Penton E H, Burns J M, et al. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101:14812.
- [6] Hebert PDN, Stoeckle M Y, Zemplak T S, et al. Identification of birds through DNA barcodes [J]. PLoS Biol, 2004, 2:312.
- [7] Ward R D, Zemplak T S, Innes B H, et al. DNA barcoding Australia's fish species [J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2005, 360: 1847.
- [8] Hajibabaei M, Janzen D H, Burns J M, et al. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103:968.
- [9] Yoo H S, Eah J Y, Kim J S, et al. DNA barcoding Korean birds [J]. Mol Cells, 2006, 22, 323.
- [10] Kerr KCR, Stoeckle M Y, Dove C J, et al. Comprehensive DNA barcode coverage of North American birds [J]. Mol Ecol Notes, 2007, 7, 535.
- [11] Hubert N, Hanner R, Holm E, et al. Identifying Canadian freshwater fishes through DNA Barcodes [J]. PLoS ONE, 2008, 3(6): 2490.
- [12] Kerr KCR, Lijtmaer D A, Barreira A S, et al. Probing evolutionary patterns in neotropical birds through DNA barcodes [J]. PLoS ONE, 2009, 4(2): e4379.
- [13] 宋红梅, 胡隐昌, 王培欣, 等. 福寿螺线粒体 DNA CO I 基因序列测定及分类地位 [J]. 动物学杂志, 2010, 45(1):1.
- [14] 高玉时, 屠云洁, 童海兵, 等. 6 个地方鸡种线粒体 CO I 基因的 DNA 条形码 [J]. 农业生物技术学报, 2007, 15(6):924.
- [15] 范净安, 顾海丰, 陈世界, 等. DNA 条形码识别 VI: 基于微型 DNA 条形码的果实蝇物种鉴定 [J]. 应用与环境生物学报, 2009, 15(2):215.
- [16] 赵明, 谭玲, 莫帮辉, 等. DNA 条形码识别 III: 媒介蚊类 DNA 条形码芯片的初步研究 [J]. 中国媒介生物学与控制杂志, 2008, 19(2):99.
- [17] 欧阳小艳, 莫帮辉, 余华丽, 等. DNA 条形码识别- DNA 条形码与 DNA 芯片识别蚊媒体准确性的比较 [J], 中国国境卫生检疫杂志, 2007, 30(6):349.
- [18] 潘程莹, 胡婧, 张霞, 等. 斑腿蝗科 Catantopidae 7 种蝗虫线粒体 CO I 基因的 DNA 条形码研究 [J]. 昆虫分类学报, 2006, 28(2):103.
- [19] 陈庆, 白洁, 刘力, 等. 北京地区 7 种常见嗜尸性蝇类的 CO I 基因序列分析及 DNA 条形码的建立 [J]. 昆虫学报, 2009, 52(2):202.
- [20] 彭居俐, 王绪祯, 王丁, 等. 基于线粒体 CO I 基因序列的 DNA 条形码在鲤科鮪属鱼类物种鉴定中的应用 [J]. 水生生物学报, 2009, 32(2):271.
- [21] 陈念, 赵树进. 入侵种的 DNA 条形码鉴别 [J]. 生物技术通报, 2009, 20(1):135.
- [22] 蔡延森, 张修月, 岳碧松, 等. 我国 8 种猛禽的 DNA 条形码技术研究 [J]. 四川动物, 2009, 28(3):334.
- [23] 雷富民, 杨岚. 中国鸟类的 DNA 分类及系统发育研究概述 [J]. 动物分类学报, 2009, 34(2):309.
- [24] 莫帮辉, 屈莉, 韩松, 等. DNA 条形码识别 I. DNA 条形码研究进展及应用前景 [J]. 四川动物, 2008, 27(2):303.
- [25] 谈献和, 姚振生. 药用植物学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2009:294.
- [26] 关申民, 高邦权. CO I 序列: 影响动物分类学和生态学的 DNA barcode [J]. 生态学杂志, 2008, 27(8): 1406.
- [27] 王剑锋, 乔格霞. DNA 条形码在蚜虫类昆虫中的应用 [J]. 动物分类学报, 2007, 32(1):153.
- [28] 贾名静, 李家乐, 牛东红, 等. 长江中下游褶纹冠蚌 10 个居群 CO I 基因序列变异分析 [J]. 动物学杂志, 2009, 44(1):1.
- [29] Gregory T R. DNA barcoding does not complete with taxonomy [J]. Nature, 2005, 434:1067.
- [30] Schindel D E, Miller SE. DNA barcoding a useful tool for taxonomists [J]. Nature, 2005, 435:17.
- [31] Ebach M C, Holdrege C. DNA barcoding is no substitute for taxonomy [J]. Nature, 2005, 434:697.
- [32] 陈士林, 姚辉, 宋经元, 等. 基于 DNA barcoding(条形码)技术的中药材鉴定 [J]. 世界科学技术——中医药现代化, 2007, 9(3):7.

[责任编辑 邹晓翠]