

· 专论 ·

《中国药典》收载动物药材 DNA 条形码 鉴定研究策略与方法[△]

姚辉¹, 张辉^{2*}, 陈士林^{1,3*}

1. 中国医学科学院 北京协和医学院 药用植物研究所 中药资源教育部工程研究中心, 北京 100193;

2. 长春中医药大学 中医药与生物工程研发中心, 吉林 长春 130117;

3. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700

[摘要] 动物药材应用历史悠久, 是中药资源的重要组成部分。近年来动物药材混伪品、替代品不断出现, 严重影响了动物药材临床应用效果和用药安全。DNA 条形码技术作为一种新兴的生物鉴定方法, 可对《中华人民共和国药典》收载动物药材进行快速、准确的鉴定。本文就以 COI 为主体、ITS2 为补充的动物药材 DNA 条形码鉴定体系的建立、动物药材 DNA 条形码鉴定中的关键技术和动物药材 DNA 条形码鉴定数据库进行介绍, 为《中华人民共和国药典》收载动物药材 DNA 条形码鉴定研究提供参考。

[关键词] 动物药材; 鉴定; DNA 条形码; COI 序列

[中图分类号] R282.74; R282.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2019)09-1137-10

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20190213007

Strategies and Methods of DNA Barcoding Medicinal Animals in Chinese Pharmacopoeia

YAO Hui¹, ZHANG Hui^{2*}, CHEN Shi-lin^{1,3*}

1. Engineering Research Center of Chinese Medicine Resource, Ministry of Education, Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China;

2. Development Center of Traditional Chinese Medicine and Bioengineering, Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130117, China;

3. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

[Abstract] Animal drugs are an important part of traditional Chinese medicine and have been used for thousands of years. Recently, the counterfeits and substitutes of medicinal animals emerged because of insufficiency of wild resources, which resulted in security risks of their applications. DNA barcoding is a novel technique for accurate and rapid identification of medicinal animals recorded in *Chinese Pharmacopoeia* by use of a short standard DNA sequence. This article reviewed the establishment of DNA barcoding system for medicinal animals based on COI as a core barcode and ITS2 as a complementary locus, the key techniques in the operating procedures and the database for the identification, which will provide references for the research of DNA barcoding medicinal animals in *Chinese Pharmacopoeia*.

[Keywords] medicinal animals; identification; DNA barcoding; COI sequence

动物药在我国具有悠久的历史, 早在《神农本草经》中就有记载。历代本草共记载动物药 600 余种, 《中国中药资源志要》收录药用动物 414 科 879 属 1574 种, 约占全国中药资源总种数 12%, 其中脊椎动物占多数, 约占药用动物总数的 61%。

动物药是祖国医药学遗产中的重要组成部分, 具有活性成分强、疗效确切等特点, 如斑蝥中含有的斑蝥素为抗癌有效成分, 临床治疗肝癌和膀胱癌有效, 同时还具有升高白细胞的作用; 水蛭含有的水蛭素是重要的抗凝血物质, 对脑血管疾病、高血脂症等

[△] [基金项目] 公益性行业科研专项(201507002-4-1-2); 四川省重点研发项目(2018SZ0061)

* [通信作者] 张辉, 教授, 研究方向: 中药有效成分与应用开发; Tel: (0431)86172080, E-mail: zhanghui_8080@163.com
陈士林, 研究员, 研究方向: 中药基因组学; E-mail: slchen@icmm.ac.cn

均有显著疗效^[1]。大多数动物药材来自野生资源,部分药材的基原动物已被列入《国家重点保护野生动物名录》和《濒危野生动植物种国际贸易公约》(CITES)附录,如穿山甲、麝类3种、玳瑁、黑熊、棕熊、梅花鹿、海马属5种等。近年来动物药材的需求量不断上升,但药用动物的养殖规模远没有达到市场需要,市场上混伪品、替代品的不断出现严重影响了动物药材的应用效果和用药安全。动物药材的传统鉴定方法有来源鉴定、性状鉴定、显微鉴定和理化鉴定,在不同种类动物药材的鉴定中发挥着重要的作用。随着分子生物学技术的发展,应用分子生物学手段进行动物药材的鉴定越来越受到关注,《中华人民共和国药典》(《中国药典》)一部收载乌梢蛇和蕲蛇的特异性PCR鉴别方法。

作为一种新兴的生物鉴定方法,DNA条形码技术是应用基因组中一段标准的DNA短序列进行物种鉴定的分子诊断技术,自2003年由加拿大动物学家Paul Hebert提出以来^[2-3],就受到生物分类学家的广泛关注,为因资金不足以及年轻分类学家匮乏而沉寂的生物分类学带来了新的发展机遇^[4]。陈士林等^[5]首先探讨了DNA条形码技术在中药材鉴定中应用的技术方法、技术路线和关键问题,展望了DNA条形码在中药材鉴定中的应用前景,并指出DNA条形码在中药鉴定中的成功应用将给生药鉴定方法带来革命性突破。与传统鉴定方法相比,DNA条形码鉴定具有客观性强、重复性好和通用性等优点,易于构建统一的DNA条形码序列数据库^[6-7]。本文对动物药材DNA条形码鉴定体系的建立、动物药材DNA条形码研究中的关键技术和DNA条形码数据库进行介绍,以期对动物药材DNA条形码研究、珍稀药用动物资源保护和动物药材的市场监管提供参考。

1 以COI为主体、ITS2为补充的动物药材DNA条形码鉴定体系的建立

Hebert等^[2]对11个门13320个同属物种的COI比较分析,提出COI序列可作为DNA条形码序列对动物进行鉴定。在COI序列对动物药材的鉴定方面,张辉等^[8]选取《中国药典》中45个动物药材,涉及基原物种51种,分析样品COI序列的种内种间变异情况、barcoding gap、鉴定效率等,考察COI序列鉴定动物药材的有效性和准确性。结果表明,COI序列作为DNA条形码适用于《中国药典》中动物药

材的鉴定,为COI条形码准确鉴定《中国药典》中动物药材提供了分子依据。

目前,很多学者应用COI序列对基原动物和动物药材进行了鉴定研究,其中对角甲类和蛇类动物药的研究报道较多。角甲类动物药临床应用历史悠久、其作用常常是植物药和矿物药不能替代的,更是一些经典名方中不可缺少的主药之一。大多数角甲类动物药如鹿角、羚羊角等为骨化的动物样品,其DNA降解比较严重,提取难度较大。Luo等^[9]应用DNAout试剂盒提取角甲类样品DNA,对15个种72份角甲类动物药材COI序列进行了分析,PCR扩增与测序效率均为100%,COI序列长度为477bp,其中156个位点(32.7%)具有多态性。角甲类动物药种内与种间的遗传变异平均值分别为0.4%和15.8%,种内的最大K2P距离均小于种间的最小K2P距离。NJ树分析表明马鹿、梅花鹿、麋鹿、黄鹿、羚羊角、山羊角、鳖甲各自聚为一支,野生物种与家养物种能明显分开。进一步对GenBank数据库中53个物种313条COI序列进行了系统分析,BLAST1分析表明其物种鉴定成功率为100%。该研究为濒危物种贸易监管提供了有力的技术支持,帮助限制野生动物资源的过度利用和非法的贸易流通。Yan等^[10]采用相似的方法,对角甲类动物药材10个物种47份样本进行了COI序列分析研究。张蓉等^[11]和崔丽娜等^[12]应用COI条形码序列分别对鹿茸及其混伪品进行研究,均表明COI可鉴定鹿茸及其混伪品。刘冬等^[13]对鹿茸、鹿角、鹿鞭、鹿筋、鹿尾、鹿胎分别进行DNA提取、COI序列扩增和测定,构建鹿类药材8个物种101份样品COI序列数据库,对市售40份鹿类药材进行鉴定,发现其中18份为《中国药典》规定物种,22份不是《中国药典》规定物种。刘旭朝等^[14]应用COI序列对62份市售水牛角样品研究,发现34份市售水牛角药材基原动物为水牛,占54.8%;18份为牦牛,3份为山羊,另有2份样品无法获得COI序列,5份样品无法鉴定到基原物种,已被卵菌、子囊菌、甲虫、蛾等外源物污染。张龙霏等^[15]利用COI检验中药制剂中的羚羊角药材,表明COI基因作为DNA条形码检验中药制剂中羚羊角方法是可行的,但因羚羊其他器官也含有相同基因,为保证检验结果的准确性,还需配合使用其他检验方法。另外,COI序列也应用于鳖甲^[16]、龟甲^[17-18]、穿山甲^[19]及其混伪品的鉴定研究,为中药材市场监管提供了新的技术手段。

我国蛇类中药应用历史悠久,近年来随着蛇类野生资源逐渐匮乏,加上价格昂贵,药材市场上出现伪品及混淆品的数量甚多,质量问题严重,仅根据外部形态特征很难进行准确的鉴别。崔丽娜等^[20]应用 COI 条形码序列能够鉴定金钱白花蛇及其混伪品,廖婧等^[21]收集常见药用蛇类 23 种,共 44 个样品,对其 COI 条形码序列进行测定,各物种种内遗传距离与种间遗传距离有显著差异,系统聚类树中样品可聚类为与分科相一致的 3 个类群,各物种均形成了相对独立的支,表明 COI 条形码能够对实验中各药用蛇类物种进行准确鉴定。对 10 份市场收集的金钱白花蛇生药样品进行鉴定发现,5 份为正品,其余 5 份为伪品,来源于赤链蛇 *Dinodon rufozonatum*,与蛇类专家利用传统形态学方法鉴定的结果一致;且形态学上不能准确鉴别的样品,DNA 条形码技术可以迅速鉴别真伪并确定其物种信息。Cao 等^[22]也应用 COI 序列对 17 个种 51 份蛇的样本进行了鉴定研究,并对 10 份药材市场样品进行鉴定发现其中 5 份为伪品。蛇蜕在采集、炮制过程中,很难保持完整的形态,商品药材多数已经破碎,形态鉴定特征不完整,给蛇蜕的形态鉴定带来极大的困难。石林春等^[23]应用 COI 作为 DNA 条形码,不仅可以鉴定中药材蛇蜕的 3 种基原,而且可以区分蛇蜕及其易混伪品,表明 DNA 条形码可以用于中药材蛇蜕的鉴定。

僵蚕药材同时包含动物家蚕和真菌白僵菌,贾静等^[24]对市售僵蚕药材进行了 DNA 条形码鉴定研究,采用植物基因组 DNA 提取试剂盒成功扩增白僵菌 ITS 序列,未能扩增家蚕 COI 序列,动物基因组 DNA 提取试剂盒可一次性将家蚕和白僵菌的 DNA 同时提取出来,有效解决同时含有动物和真菌类药材的基原鉴定。COI 序列经鉴定为家蚕 *Bombyx mori* L., ITS 序列经鉴定主要来源为白僵菌 *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillant,少数为杂菌。基于 COI 序列和 ITS 序列的 DNA 条形码分子技术能稳定、准确鉴别动物药材僵蚕。

另外,应用 COI 序列对麝香^[25]、蜈蚣^[26]、蛤壳^[27]、紫河车^[28]、海马^[29-30]、海龙^[29]、水蛭^[31]、蛤蚧^[32]、桑螵蛸^[33]、阿胶原材料驴皮^[34]及其混伪品的鉴定研究,均表明 COI 序列可对正品与混伪品进行准确鉴定,对保障临床用药安全和药材市场监控具有重要意义,整理的具体研究信息见表 1。

某些动物药材由于 DNA 降解比较严重,标准 DNA 条形码序列获取困难。不同研究者根据标准 DNA 条形码序列的信息设计特异引物,扩增其中一段长度更短的 DNA 序列(也称 mini-barcode),应用 mini-barcode 序列进行物种鉴定,如在蛤蚧^[35]、龟甲^[36]、羚羊角^[37]和冬虫夏草^[38]等药材鉴定中已有应用。

表 1 动物药材 DNA 条形码研究信息

主要研究的动物药材	分类	序列	样本数	引物或条形码类型	参考文献
珍珠母	软体动物	COI	3 种 15 份	通用引物	[39]
蛤壳	软体动物	COI	8 种 11 份	通用引物	[27]
水蛭	环节动物	COI	5 种 12 份	通用引物	[31]
地龙	环节动物	COI	10 批次	通用引物	[40]
地龙	环节动物	COI	5 个居群 25 份	通用引物	[41]
地龙	环节动物	COI	10 种	通用引物	[42]
蜈蚣	多足纲	COI	5 种 50 份	通用引物	[26]
桑螵蛸	昆虫纲	COI	19 个桑螵蛸以及 4 种螳螂	通用引物	[33]
僵蚕	昆虫纲	COI、ITS	115 份	COI 通用引物、ITSF/4R	[24]
海龙、海马	鱼纲	COI	14 种 20 份	通用引物	[29]
海马	鱼纲	COI	21 种 211 份	通用引物	[30]
海龙	鱼纲	COI	126 批次	通用引物	[43]
蟾皮	两栖纲	COI	6 种 54 份	通用引物	[44]
哈蟆油	两栖纲	COI	4 种 67 条序列	通用引物	[45]

续表 1					
主要研究的动物药材	分类	序列	样本数	引物或条形码类型	参考文献
中华蟾蜍	两栖纲	COI	6 种 19 份	设计引物	[46]
鳖甲	爬行纲	COI	8 种 15 份	通用引物	[16]
蛤蚧	爬行纲	COI	57 份	mini-barcode	[35]
龟甲	爬行纲	COI	8 种 22 份	通用引物	[18]
龟甲	爬行纲	COI	14 种 61 条序列, 17 份待检药材	通用引物 mini-barcode	[36]
金钱白花蛇	爬行纲	COI	4 种 11 份	通用引物	[20]
蛇类	爬行纲	COI	23 种 44 份	通用引物/蝮科蛇类自行设计	[21]
蛇蜕	爬行纲	COI	13 种 68 份	通用引物	[23]
蛇类	爬行纲	COI	17 种 51 份	通用引物	[22]
麝香	哺乳纲	COI	7 种 12 份	通用引物	[25]
鹿茸	哺乳纲	COI	7 种 14 份	通用引物	[12]
鹿茸	哺乳纲	COI	9 种 19 份	设计引物	[11]
鹿类药材	哺乳纲	COI	8 种 141 份	通用引物	[13]
羚羊角	哺乳纲	COI	8 种含羚羊角中药制剂	通用引物和设计引物	[15]
羚羊角	哺乳纲	COI	8 种 69 条序列	mini-barcode	[37]
紫河车	哺乳纲	COI	6 种 41 份	通用引物	[28]
穿山甲	哺乳纲	COI	7 种 56 份	通用引物	[19]
鹿茸粉	哺乳纲	COI	71 份	通用引物	[47]
水牛角	哺乳纲	COI	5 种 155 份	通用引物	[14]
驴皮	哺乳纲	COI	4 种 22 份	设计引物	[34]
角甲类	哺乳纲、爬行纲	COI	15 种 72 份	设计引物	[9]
角甲类	哺乳纲、爬行纲	COI	10 种 47 份	设计引物	[10]
动物药材	各类	COI	51 种 62 样品 + 1146 条序列	通用引物	[8]
动物类	各类	ITS2	12 221 条		[48]
冬虫夏草	其他	ITS	184 条	通用引物	[49]
冬虫夏草	其他	ITS	6 种	mini-barcode	[38]

核 ITS2 序列已被证明在植物类药材鉴定中具有很高的鉴定效率,被选作中草药 DNA 条形码鉴定的核心序列^[48,50]。Yao 等^[48]对 GenBank 中 12 221 条动物的 ITS2 序列进行分析,ITS2 序列长度分布在 100 ~ 1209 bp,主要分布在 195 ~ 510 bp,平均长度 306 bp,GC 碱基含量为 48.3%,种间遗传距离大于种内遗传距离,基于 BLAST 分析发现在物种水平上 ITS2 的鉴定效率为 91.7%。COI 序列在 *Cnidarians* 和 West Palaearctic *Pandasyopthalmus* 分类群变异小,甚至没有差异^[48],但 ITS2 序列对 *Cnidarians* 的鉴定效率为 77%^[2,51]。由于 COI 等线粒体基因是母系遗传,在动物的鉴定中应纳入核基因等其他相关信息。

因此,Yao 等^[48]提出 ITS2 可作为 COI 序列的补充序列对动物进行鉴定。Xiang 等^[49]应用 ITS 序列可快速准确鉴定冬虫夏草及 12 种常见混伪品及近缘物种。陈士林等^[52]在大量样本研究的基础上,建立了以 COI 为主体、ITS2 序列为补充的动物药材 DNA 条形码鉴定体系,该体系已纳入《中国药典》^[53]。

2 动物药材 DNA 条形码鉴定关键技术

动物药材来源复杂,有来自动物的干燥全体(如水蛭、全蝎、蜈蚣、斑蝥、土鳖虫、九香虫等),有除去内脏的动物体(如地龙、蛤蚧、乌梢蛇、蕲蛇、金钱白花蛇等),有动物体的某一部分(如鹿茸、鹿

角、水牛角、鳖甲、龟甲、鸡内金、哈蟆油等)^[1], DNA 存在不同程度的降解, 甚至严重的降解, DNA 条形码序列能否顺利获得是对动物药材进行鉴定的前提条件。

2.1 样品前处理

动物药材样本因储存环境差异, 为避免被其他污染干扰实验结果, 一般先用 75% 乙醇擦拭表面进行消毒或清洗, 如鹿类药材^[13]、水牛角^[14]、穿山甲^[19]、僵蚕^[24]、蜈蚣^[26]、紫河车^[28]、海马^[30]、蛤蚧^[32]等。严华等^[34]对阿胶原材料驴皮及其混伪品鉴定时, 采用 70% 乙醇浸泡达到清洁药材表面的目的。乙醇擦拭的样品应放超净工作台上挥干乙醇, 部分样品取样时还需通过紫外照射进行消毒, 如穿山甲^[19]、蟾皮^[44]等。

基原动物样本如保存于 95% 乙醇中, 如蛇类或其他动物标本取样时取其肌肉组织, 置于蒸馏水中或流水浸泡过夜, 以除去乙醇^[20-21]。因药材样本的表面 DNA 易降解或被真菌及寄生虫等污染, 取样时需去除外部组织, 取药材内部组织进行实验或尽量取其肌肉组织; 动物肢体部分因内脏以及食物残留, 取样时应避开这些部位。如海马样品用止血钳撕下海马尾部表皮后, 割取剥去表皮的尾部药材并剪碎^[30]; 蛤蚧样品应多取肌肉组织部分, 样品的外皮部分与骨骼部分, 质地坚硬, 不易粉碎, 从其中提取基因组 DNA 比较困难^[32]; 穿山甲等可取其甲片残留的腹面皮肤组织^[19]。取样的前处理及取样部位, 直接决定 DNA 提取的难度和效果, 可参考与实验样品最接近的动物药材的相关文献进行操作。

2.2 DNA 提取

DNA 提取包括破碎细胞、释放核酸、DNA 的分离与纯化、DNA 浓缩、沉淀与洗涤等基本步骤。动物药材 DNA 提取方法目前主要应用试剂盒法、Chelex-100 法、磁珠法等^[54]。部分动物药材因 DNA 降解可增大取样量, 如水牛角取样 60 mg^[14]、角甲类药材研究取样达 200 mg^[9-10], 而哈蟆油药材温水中浸泡体积可膨胀 10 ~ 15 倍, 取样时则应进行减量, 如 5 mg 即可获得后续实验要求的 DNA^[55]。动物药材粉碎前应剪碎或切小, 利于充分粉碎。严华等^[34]鉴定阿胶原材料驴皮时, 其样品为冻干品, 质地硬而韧, 难以用球磨机直接粉碎, 在粉碎时即加入试剂盒中的 GA 缓冲液, 水浴裂解后加入三氯甲

烷, 除去蛋白质。延长水浴时间对于提高提取效率是一个很有效的方法, 如 56 °C 水浴 2 ~ 8 h 或过夜, 在羚羊角、蜈蚣、紫河车和蛤蚧等药材中都获得很好的提取效果^[15,26,28,32]。对于蛋白质含量高的材料, 需要加大试剂用量^[28], 或用三氯甲烷-异戊醇多次抽提^[30,32], 对于脂类含量多的样品, 如哈蟆油, 加入酚-三氯甲烷-异戊醇 (25:24:1) 可有效去除脂肪^[55]。对 DNA 降解严重的动物药材, 如角甲类, 还可采用该类药材专用的 DNA 提取试剂盒进行提取, 也可获得不错的提取效果^[9-10,14]。

刘旭朝等^[56]基于 SDS 法 DNA 提取原理, 对动物药材 DNA 提取方法进行优化研究。通过对动物干燥全体、角类、骨甲类、组织类、其他类 (卵鞘等) 等不同用药部位的市售动物药材 26 种 121 份样品筛选最佳裂解液配方, 结果表明裂解液配方为 1% SDS、0.03 mol·L⁻¹ Tris-HCl、0.25 mol·L⁻¹ EDTA、0.2 mol·L⁻¹ NaCl 时, 对不同用药部位动物药材 DNA 提取效果最佳, 并可实现对蝉蜕等提取困难样本 DNA 的提取, 利用优化裂解液提取的 121 份市售动物药材 DNA 满足后续实验要求。该裂解液配方可用于除壳类、分泌物类、加工品外的不同用药部位动物药材 DNA 提取, 为动物药材分子鉴定提供了技术支持。杨璐等^[57]使用常规定性滤纸作为核酸吸附的载体, 通过裂解液的裂解, 释放核酸并吸附在滤纸上, 利用洗脱液进行核酸纯化, 可使整个核酸提取过程在 30 s 内完成, 吸附核酸的滤纸可直接放入反应体系进行扩增, 提取得到的核酸经扩增验证, 可获得与传统提取方法相一致的检测结果。此方法简单易行、速度快、成本低, 可以成功提取不同药用部位的中药材核酸, 可使核酸提取变得越来越大众化, 不再局限于专业人员和实验室环境。

2.3 PCR 扩增与测序

COI 序列作为动物的核心 DNA 条形码, 使用通用引物 LCO1490/HCO2198 对大多数动物类群扩增可获得其 COI 序列, 对于昆虫纲、两栖纲等类群, 还可使用文献报道的适用于该类群的扩增引物, 具体的引物序列及相关文献见表 2。如以上引物还不适用, 可应用相关引物设计软件, 根据公共数据库中相近物种的 COI 序列或线粒体全基因组序列进行引物设计。对于 DNA 降解严重的动物药材, 还可设计引物, 扩增更短的 COI 片段进行分析研究^[9-10]。作为 COI 的补充序列, 核 ITS2 序列扩增引物见表 2。

表2 动物DNA条形码通用引物序列

片段	引物名称	引物序列(5'→3')	适用类群	参考文献
COI	LC01490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	动物界各门	[58-59]
	HCO2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA		
	LepF1	ATTCAACCAATCATAAAGATATTGG	昆虫纲、两栖纲	[60]
	LepR1	TAAACTTCTGGATGTCCAAAAATCA		
	MLepF1	GCTTTCCACGAATAAATAATA(与LepR1一同用)	昆虫纲、两栖纲	[61]
	MLepR1	CCTGTTCCAGCTCCATTTC(与LepF1一同用)		
	BirdF1	TTCTCCAACCACAAAGACATTGGCAC	鸟纲	[62]
	BirdR1	ACGTGGGAGATAATTCCAAATCCTGG		
ITS	ITS5F	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	动物界各门	[63]
	ITS4R	TCCTCCGCTTATTGATATGC		
ITS2	ITS3F	GCATCGATGAAGAACGCAGC(与ITS4R一同用)	动物界各门	[63]

PCR 扩增体系以 25 μL 为参照, 包括 2 $\times$ PCR Mixture 12.5 μL , 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 正反向引物, 模板 DNA(约 30 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 1 μL , ddH₂O 补足至 25 μL , 同时设置未加模板 DNA(ddH₂O 代替)的阴性对照。实际应用中, PCR 扩增体系和程序可根据具体情况予以调整。目前, 在动物药材的扩增引物方面, 通用引物 LC01490/HCO2198 不适用于海马、阿胶基原动物驴皮、哈蟆油、九香虫及蕲蛇 COI 序列的扩增, 相关研究人员已设计专属的引物并获得其 COI 序列^[30,34,54,58]。水蛭应用通用引物 LC01490/HCO2198 和 LepF1/LepR1 均可^[58]。

PCR 扩增产物应用 1.2% ~ 2% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测, 应用通用引物扩增 COI 序列的样品应在约 700 bp 处有一条单一明亮的条带, 阴性对照应无条带。对有扩增条带的 PCR 产物, 在紫外灯下迅速切取目的条带所在位置的凝胶, 应用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收, 应用 Sanger 测序法进行双向测序, 测序引物同 PCR 扩增引物。

2.4 序列质量评价与分析

双向测序峰图在进行质量评价^[50]后进行序列拼接, 获得相应的 DNA 条形码序列。获得的 DNA 条形码序列首先进行校对, 可采用 BLAST 分析防错、系统树分析防错和 barcoding gap 检验防错^[64], 保证 DNA 条形码序列的正确。正确的 DNA 条形码序列, 应用 CLUSTAL X、CLUSTAL W^[65] 或 MUSCLE 等^[66] 软件进行多序列比对, 应用 MEGA 等^[67] 软件进行种内、种间遗传距离和系统聚类树分析。

3 动物DNA条形码鉴定数据库

目前应用的动物 DNA 条形码鉴定数据库主要有 GenBank(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>)、BOLD(Barcode of Life Database)^[68]、中药材 DNA 条形码鉴定系统^[69] 和 MMDBD(Medicinal Materials DNA Barcode Database)^[70-71] 等。GenBank 为公共数据库, 全世界研究者的实验数据都可以上传至 GenBank, 数据量庞大, 但因主要是储存功能, 所以对序列的真实性不做判断, 因而存在一定的错误率, 影响鉴定结果的准确性。BOLD(<http://www.boldsystems.org>) 是由国际生命条形码协会(The Consortium of Barcode of Life, CBOL)建立的 DNA 条形码数据库, 动物 COI 序列丰富, 目前物种水平的 DNA 条形码序列包括 195 887 个物种的 3 267 402 条 COI 序列。MMDBD 数据库(<https://rdccm.cuhk.edu.hk/mherbsdb/>) 由香港中文大学邵鹏柱教授团队建立, 在 2010 年建立的 MMDBD V1.0 版本^[70] 基础上提高到 V1.5 版本^[71], 目前包括 2111 个药用物种的 62 011 条序列。

中药材 DNA 条形码鉴定系统(<http://www.tcmbarcode.cn>) 由中国医学科学院药用植物研究所和中国中医科学院中药研究所共同建立^[69,72], 目前包含百万余条 DNA 条形码序列, 涵盖中国、日本、韩国、印度、欧盟和美国药典几乎所有草药物种, 可进行中药材(动物类、植物类和真菌类)DNA 条形码鉴定。贾静等^[47] 基于中药材 DNA 条形码鉴定系统对市售鹿茸粉的基原物种进行鉴定发现, 其中有 38% 为《中国药典》规定的正品来源, 而 62%

为其他基原,以驯鹿 *Rangifer tarandus* L. 为主,有些待检样品包装明确标示为梅花鹿鹿茸粉,其鉴定结果为马鹿或驯鹿。应用该系统对市售僵蚕的鉴定研究发现,除白僵菌外,少数为杂菌,且为致病菌株^[24]。

4 结语

Miller 等^[73]认为 DNA 条形码技术正在推动分类学的“文艺复兴”,能够缓解传统鉴定人才缺乏的现状,完成一些传统形态学和保护生物学无法完成的工作,且技术方法易于掌握,不需要多年的经验积累。动物药材 DNA 条形码鉴定工作已经有了大量的研究报道,进一步完善动物药材 DNA 条形码鉴定数据库是今后一个时期的主要任务,并在国家相关主管部门的组织下,尽快开展动物药材 DNA 条形码标准序列研究工作。随着测序技术的快速发展,应用下一代测序技术开展动物药线粒体基因组测定的技术已经成熟^[74],对于难鉴定的近缘物种可应用线粒体基因组作为“超级条形码”进行区分。另外对中药制剂中动物药材基原物种的鉴定和动物全基因组序列测定研究会越来越多^[75-76],将进一步促进动物药材鉴定研究及其本草基因组学^[77]的发展。

参考文献

- [1] 康廷国. 中药鉴定学[M]. 北京:中国中医药出版社, 2016:432,441,447.
- [2] HEBERT PDN, RATNASINGHAM S, DEWAARD J R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species[J]. Proc Biol Sci, 2003, 270: S96-S99.
- [3] HEBERT PDN, CYWINSKA A, BALL S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes[J]. Proc Biol Sci, 2003, 270(1512): 313-321.
- [4] 肖金花, 肖晖, 黄大卫. 生物分类学的新动向——DNA 条形码[J]. 动物学报, 2004, 50(5): 852-855.
- [5] 陈士林, 姚辉, 宋经文, 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): 7-12.
- [6] 陈士林, 郭宝林, 张贵君, 等. 中药鉴定学新技术新方法研究进展[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(8): 1043-1055.
- [7] 陈士林, 庞晓慧, 姚辉, 等. 中药 DNA 条形码鉴定体系及研究方向[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2011, 13(5): 747.
- [8] 张辉, 姚辉, 崔丽娜, 等. 基于 COI 条形码序列的《中国药典》动物药材鉴定研究[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2013, 15(3): 371-380.
- [9] LUO J Y, YAN D, SONG J Y, et al. A strategy for trade monitoring and substitution of the organs of threatened animals[J]. Sci Rep, 2013, 3: 3108.
- [10] YAN D, LUO J Y, HAN Y M, et al. Forensic DNA barcoding and bio-response studies of animal horn products used in traditional medicine[J]. PLoS One, 2013, 8(2): e55854.
- [11] 张蓉, 刘春生, 黄璐琦, 等. 鹿茸饮片的 DNA 条形码鉴别研究[J]. 中国药理学杂志, 2011, 46(4): 263-266.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] 刘旭朝, 周丽思, 刘金欣, 等. 基于 COI 序列的水牛角及其易混伪品 DNA 条形码鉴定研究[J]. 药学学报, 2017, 52(3): 159-164.
- [15] 张龙霏, 陈绍民, 田景振, 等. 利用 DNA 条形码检验中药制剂中的羚羊角药材[J]. 中草药, 2014, 45(23): 3467-3471.
- [16] 杜鹤, 崔丽娜, 张辉, 等. 鳖甲及其混伪品的 DNA 分子鉴定[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2011, 13(2): 429-434.
- [17] 崔丽娜, 杜鹤, 孙佳明, 等. 基于 COI 条形码序列的龟甲及其混伪品的 DNA 分子鉴定[J]. 吉林中医药, 2012, 32(2): 176-178.
- [18] 刘晓帆, 刘春生, 杨瑞琚, 等. 基于 COI 基因的龟甲及其混伪品的 DNA 条形码研究[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(7): 947-950.
- [19] 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.
- [20] 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.
- [21] 廖婧, 梁镇标, 张亮, 等. 常见药用蛇类的 DNA 条形码研究[J]. 中国药理学杂志, 2013, 48(15): 1255-1260.
- [22] CAO S P, GUO L N, LUO H M, et al. Application of COI barcode sequence for the identification of snake medicine (*Zaocys*) [J]. Mitochondr DNA Part A, 2016, 27(1): 483-489.
- [23] 石林春, 陈俊, 刘冬, 等. 基于 COI 条形码的中药材蛇蜕及其易混伪品的 DNA 分子鉴定[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2014, 16(2): 284-287.
- [24] 贾静, 石林春, 姚辉, 等. 市售动物药材僵蚕的 DNA 条形码

- 码鉴定研究[J]. 药学学报, 2016, 51(11): 1784-1790.
- [25] 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.
- [26] 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.
- [27] 杜鹤, 崔丽娜, 孙佳明, 等. 基于 COI 序列的蛤壳及其混伪品的 DNA 分子鉴定[J]. 吉林中医药, 2012, 32(1): 55-57.
- [28] 陈俊, 贾静, 徐晓兰, 等. 基于 COI 序列的紫河车药材及其混伪品的 DNA 条形码鉴定研究[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(12): 2204-2207.
- [29] 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.
- [30] 张改霞, 刘金欣, 贾静, 等. 基于 COI 条形码的海马药材及其混伪品分子鉴定[J]. 中国药学杂志, 2015, 50(17): 1469-1473.
- [31] 刘晓帆, 刘春生, 杨瑶琨, 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.
- [32] 张红印, 石林春, 刘冬, 等. 基于 COI 条形码序列的蛤蚧及其混伪品的 DNA 分子鉴定[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2014, 16(2): 269-273.
- [33] 王茜, 侯飞侠, 王艺璇, 等. 基于 DNA 条形码的桑螵蛸基原动物鉴定研究[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(20): 3963-3966.
- [34] 严华, 陈俊, 石林春, 等. 基于 COI 序列的阿胶原材料及其混伪品的 DNA 条形码鉴定研究[J]. 药物分析杂志, 2018, 38(10): 1761-1766.
- [35] GU H F, XIA Y, PENG R, et al. Authentication of Chinese crude drug gecko by DNA barcoding[J]. Nat Prod Commun, 2011, 6(1): 67-71.
- [36] CHEN M Y, HAN X, MA J, et al. Identification of *Plastrum Testudinis* used in traditional medicine with DNA mini-bar-codes[J]. Rev Bras Farmacogn, 2018, 28(3): 267-272.
- [37] CHEN J, JIANG Z, LI C, et al. Identification of ungulates used in a traditional Chinese medicine with DNA barcoding technology[J]. Ecol Evol, 2015, 5: 1818-1825.
- [38] LIU Y, WANG X Y, GAO Z T, et al. Detection of *ophiocordyceps sinensis* and its common adulterates using species-specific primers[J]. Front Microbiol, 2017, 8: 1179.
- [39] 杜鹤, 崔丽娜, 姚辉, 等. 基于 COI 条形码序列的珍珠母及其混伪品的 DNA 分子鉴定[J]. 中国现代中药, 2011, 13(11): 12-14.
- [40] 吕国庆, 牛宪立, 姬可平. 动物性中药材地龙 DNA 条形码初步研究[J]. 广东农业科学, 2011, 38(17): 114-116.
- [41] 韦健红, 李薇, 吴文如, 等. 基于 COI 与 16S rRNA 基因对广地龙的 DNA 分子鉴定研究[J]. 中国药房, 2012, 23(35): 3274-3278.
- [42] 马梅, 李薇, 龚玲, 等. 基于 COI 和 16S rRNA 基因的地龙药材及其混淆品的 DNA 条形码鉴定[J]. 中药新药与临床药理, 2014, 25(5): 595-598.
- [43] 刘富艳, 金艳, 袁媛, 等. 基于形态和 DNA 序列分析的海龙类药材商品的基原调查[J]. 世界中医药, 2018, 13(2): 241-247.
- [44] 樊佳佳, 宋明, 宋驰, 等. 中药材蟾皮及其混伪品的 DNA 条形码鉴定研究[J]. 中国药学杂志, 2015, 50(15): 1292-1296.
- [45] 王孟虎, 康廷国, 许亮, 等. 基于 COI 序列的哈蟆油基原动物 DNA 条形码鉴定研究[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(8): 1572-1577.
- [46] 赵群, 张恬, 高波, 等. 中华蟾蜍 DNA 条形码鉴定[J]. 中国现代中药, 2017, 19(1): 11-15.
- [47] 贾静, 石林春, 徐志超, 等. 市售鹿茸粉药材的 DNA 条形码鉴定[J]. 药学学报, 2015, 50(10): 1356-1361.
- [48] YAO H, SONG J Y, LIU C, et al. Use of ITS2 region as the universal DNA barcode for plants and animals[J]. PLoS One, 2010, 5(10): e13102.
- [49] XIANG L, SONG J Y, XIN T Y, et al. DNA barcoding the commercial Chinese caterpillar fungus[J]. FEMS Microbiol Lett, 2013, 347(2): 156-162.
- [50] CHEN S L, YAO H, HAN J P, et al. Validation of the ITS2 Region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species[J]. PLoS One, 2010, 5(1): e8613.
- [51] ROJO S, STAHL S G, PEREZ-BANON C, et al. Testing molecular barcodes: Invariant mitochondrial DNA sequences vs the larval and adult morphology of West Palaearctic *Pandasyopthalmus* species (Diptera: Syrphidae: Paragini) [J]. Eur J Entomol, 2006, 103: 443-458.
- [52] 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.
- [53] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 四部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 383-385.
- [54] 陈士林. 中药 DNA 条形码分子鉴定[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012.
- [55] 石林春, 刘建辉, 宋经元, 等. 哈蟆油基因组 DNA 提取方法、试剂盒及其应用: 201610903601. 2[P]. 2017-01-25.
- [56] 刘旭朝, 刘金欣, 孙伟, 等. 动物药材 DNA 提取方法优化和市售药材 DNA 条形码鉴定研究[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2017, 19(4): 602-609.
- [57] 杨璐, 吴文如, 付菲, 等. 新型快速中药材 DNA 提取方法

- 的探索与应用[J]. 中草药, 2019, 52(2): 502-509.
- [58] 陈士林. 中国药典中药材 DNA 条形码标准序列[M]. 北京: 科学出版社, 2015.
- [59] FOLMER O, BLACK M, HOEH W, et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates [J]. Mol Marine Biol Biotech, 1994, 3: 294-299.
- [60] HEBERT PDN, PENTON E H, BURNS J M, et al. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astrartes fulgurator* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(41): 14812-14817.
- [61] 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: 968-971.
- [62] HEBERT P D N, STOECKLE M Y, ZEMLAK T S, et al. Identification of birds through DNA barcodes [J]. PLoS Biol, 2004, 2(10): e312.
- [63] WHITE TJ, BRUNS T, LEE S, TAYLOR J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M, Gelfand D, Swinsky J, White TJ, eds. PCR protocols: a guide to methods and applications [M]. San Diego: Academic Press, 1990: 315-322.
- [64] 陈士林, 宋经元, 姚辉, 等. 药用植物 DNA 条形码鉴定策略及关键技术分析 [J]. 中国天然药物, 2009, 7(5): 322-327.
- [65] LARKIN M A, BLACKSHIELDS G, BROWN N P, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0 [J]. Bioinformatics, 2007, 23(21): 2947-2948.
- [66] EDGAR R C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput [J]. Nucleic Acids Res, 2004, 32(5): 1792-1797.
- [67] KUMAR S, STECHER G, LI M, et al. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms [J]. Mol Biol Evol, 2018, 35(6): 1547-1549.
- [68] RATNASINGHAM S, HEBERT P D. BOLD: The Barcode of Life Data System [J]. Mol Ecol Notes, 2007, 7: 355-364.
- [69] CHEN S L, PANG X H, SONG J Y, et al. A renaissance in herbal medicine identification: from morphology to DNA [J]. Biotechnol Adv, 2014, 32(7): 1237-1244.
- [70] LOU S K, WONG K L, LI M, et al. An integrated web medicinal materials DNA database: MMBDB (Medicinal Materials DNA Barcode Database) [J]. BMC Genomics, 2010, 11(1): 402-409.
- [71] WONG T H, BUT GWC, WU H Y, et al. Medicinal Materials DNA Barcode Database (MMBDB) version 1. 5-one-stop solution for storage, BLAST, alignment and primer design [J]. Database, 2018. doi: 10.1093/database/bay112.
- [72] 石林春, 姚辉, 谢丽芳, 等. 中国动物药材 DNA 条形码数据库 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(12): 2155-2159.
- [73] MILLER S E. DNA barcoding and the renaissance of taxonomy [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(12): 4775-4776.
- [74] CHENG R, LIAO G, GE Y, et al. Complete mitochondrial genome of the great seahorse *Hippocampus kelloggi* Jordan & Snyder, 1901 (Gasterosteiformes: Syngnathidae) [J]. Mitochondr DNA Part A, 2017, 28(2): 227-228.
- [75] COGHLAN M L, HAILE J, HOUSTON J, et al. Deep sequencing of plant and animal DNA contained within traditional Chinese medicines reveals legality issues and health safety concerns [J]. PLoS Genet, 2012, 4: e1002657.
- [76] HUANG Z H, XU J, XIAO S M, et al. Comparative optical genome analysis of two pangolin species: *Manis pentadactyla* and *Manis javanica* [J]. Giga Science, 2016, 5(1): giw001.
- [77] 陈士林, 宋经元. 本草基因组学 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(21): 3881-3889.

通信作者

陈士林, 中国中医科学院首席研究员, 现任中国中医科学院中药研究所所长, 世界卫生组织传统医学合作中心主任, 国际欧亚科学院院士, CGCM(中药全球化联盟)副主席, 教育部长江学者和创新团队计划负责人。曾任中国医学科学院药用植物研究所所长、香港理工大学客座教授, 并在英国皇家植物园邱园接受专业培训、哈佛医学院 Mclean 医院做访问学者等。现兼任日本东京药科大学客座教授、中国药学会中药与天然药物专业委员会主任委员、美国药典传统中药咨询组委员等。



科研成果: 在国际上创建了基于 ITS2 的中草药 DNA 条形码鉴定方法体系, 完成专著《中国药典中药材 DNA 条形码标准序列》, 从基因层面解决中草药物种真伪鉴定的难题, 被评为 2016 中国十大医学进展。

通过全基因组解析提出灵芝为首个中药基原药用模式真菌, 被 Nature China 选为中国最佳研究亮点推介; 完成并发表人参、丹参、赤芝、菊花、卷柏、穿心莲、紫芝等全基因组图谱和相关组学研究, 成功培育并获批 4 个中药材新品种证书或良种证书, 开拓奠定《本草基因组学》学科基础并由科学出版社出版, 列为全国高等医药院校规划教材; 完成并编著《中国药材产地生态适宜性区划》, 避免中药材盲目引种栽培, 主持无公害种植项目成功推广应用。

获国家发明专利和美国专利授权 36 项, 发表论文 400 余篇, 其中 SCI 论文 200 余篇, 包括国际著名期刊 Nature Com-

munications, PNAS等, 论文被他引1.5万余次, H指数58 (Google Scholar), 连续4年入选Elsevier高被引中国学者榜单。

荣获吴阶平医药创新奖、Agilent Thought Leadership Award等荣誉, 获教育部高校成果科技进步一等奖1项, 国家科技进步二等奖3项。

张辉, 二级教授, 博士生导师, 金达莱学者。原长春中医药大学吉林省人参科学研究院党委书记。国家中医药管理局药用动物可持续利用重点研究室主任, 国家中医药管理局药用动物学重点学科主任, 国家中医药管理局中药动物药三级实验室主任。吉林省教育厅药用动物可持续利用重点研究室主任, 吉林省卫生健康委员会中药化学重点实验室主任。



兼任国家自然科学基金委员会评议专家、国家科学技术奖励评审专家、中华中医药学会科学技术奖励评审专家、国家创新基金评审专家、中国自然资源学会中药与天然药物资源研究专业委员会副主任委员、中国中药协会人参属药用

植物研究发展专业委员会副主任委员、全国人参专业标准化技术委员会委员、中国药学会动物药专业组秘书长。曾荣获吉林省第一批重点学科骨干教师、吉林省第六、第十批有突出贡献中青年专家、吉林省第一批拔尖创新人才等荣誉称号。

主要研究方向为中药有效成分与应用开发。建立了中药三级资源、肽键热振荡2个理论。形成了基于遗传多样性理论对野生与种养殖居群的长白山大宗道地药材的种质研究、基于DNA条形码技术对动物药材品种鉴定研究、基于临床和民间有效性对中药复方的物质基础研究、基于化学修饰理论方法对中药前体药物的合成研究、基于酶工程理论方法对水解动植物蛋白质获得生物活性多肽的研究、基于肽键热振荡理论对中药材加工炮制作用的对比研究、基于生物网络学对中药基因调控治疗作用的研究等关键技术。承担国家自然科学基金、重大药物创制、行业专项20余项。

作为第一研究者获中国专利10项、国家新药证书1项、保健品证书4项、院内制剂8项、林下参播种器1项; 获吉林省优秀教学成果一等奖1项, 吉林省科技进步二等奖3项、三等奖6项, 中华中医药学会科技进步二等奖1项, 中华保健品学会科技进步一等奖1项; 以通信/第一作者发表学术论文240余篇, 其中SCI收载近20篇, 主编出版《药用动物学》《鹿茸生产技术》等著作6部。培养硕士研究生140名, 博士研究生6名。

(收稿日期: 2019-02-13 编辑: 王丽英)