

· 基础研究 ·

基于 DNA 条形码分子技术的海龙及其混伪品鉴定研究[△]

张红印, 金平, 刘冬, 高晓晨, 张辉*

长春中医药大学, 吉林 长春 130117

[摘要] 目的: 基于 DNA 条形码分子技术对动物药海龙及其混伪品进行鉴别, 建立一种统一的海龙鉴定技术手段。方法: 对收集到的动物药海龙及其混伪品进行 DNA 提取、PCR 扩增和双向测序检测, 运用 Codon Code Aligner 进行序列拼接, 采用 MEGA 7.0 软件进行序列比对分析, 比较种内、种间序列差异, 构建动物药海龙及其混伪品的系统发育树。结果: 所有海龙药材及其混伪品均可以使用中药材 DNA 条形码分子鉴定技术进行鉴别, 共得到 7 个物种 129 条序列, 各物种之间序列区分明显。结论: 中药材 DNA 条形码鉴定技术能够准确有效地鉴别动物药海龙及其混伪品, 可以作为海龙类中药的统一鉴定方法, 为海龙的临床用药安全提供了新的分子技术手段。

[关键词] 海龙; 中药材 DNA 条形码鉴定技术; 混伪品

[中图分类号] R282.74; R282.5; R284 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2019)09-1181-05

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20190215003

Identification of *Syngnathus* and Its Adulterants Using DNA Barcoding

ZHANG Hong-yin, JIN Ping, LIU Dong, GAO Xiao-chen, ZHANG Hui*

Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China

[Abstract] **Objective:** To establish a standard method to identify the traditional Chinese medicine of *Syngnathus* basing on the DNA barcoding. **Methods:** The *Syngnathus* and its adulterants were performed on DNA extraction, PCR amplification and bi-directional DNA sequencing, sequence assembly and consensus sequence generation were performed using the CodonCode Aligner. Neighbor-joining tree construction was carried out by MEGA 7.0. The intra-specific variation and the inter-specific divergence were calculated. **Results:** All the species could be identified based on DNA sequences database of TCM of deer which contained 129 samples of 7 species. **Conclusion:** DNA barcoding of TCM can accurately and effectively identify *Syngnathus* and its adulterants. It can be used as a unified identification method of *Syngnathus* and provide a new molecular technology for the clinical medication safety of TCM.

[Keywords] *Syngnathus*; DNA barcoding of TCM; adulterants

中药海龙在我国有悠久的历史, 是常用的名贵珍稀动物药之一, 具有温肾壮阳、散结消肿的功效。首载于《本草纲目拾遗》, 表述其药效“功倍海马”。2015 版《中华人民共和国药典》(《中国药典》) 中规定, 海龙药材为海龙科动物刁海龙 *Solenognathus hardwickii* Gray、拟海龙 *Syngnathoides biaculeatus* Bloch 或尖海龙 *Syngnathus acus* Linnaeus 的干燥体^[1]。于夏、秋二季捕捞; 刁海龙、拟海龙, 洗净, 除去皮膜, 晒干; 尖海龙个体较小直接洗净, 晒干。

随着人们生活水平的提高, 健康意识的增强, 中医药保健应用已成为我国人民的日常需求, 海龙、海马等海洋中药, 在补益身体使用上由来已久, 据

相关研究表明, 海龙药材含有丰富的生物活性成分, 包括总甾体类化合物、蛋白质、人体必需氨基酸、微量元素锌、锰、铜等^[2]。具有温肾壮阳、延缓衰老、抗肿瘤、增强机体免疫力、加强心肌收缩力、缓解骨质疏松、降低胆固醇、治疗老年性痴呆症等作用^[3-6]。但随着市场需求逐年增加, 海龙野生资源的紧缺, 价格持续增长, 市售海龙药材中出现了掺伪、掺假等现象, 2015 版《中国药典》未收录的不同来源海龙药材销售比例逐年加大, 致使海龙药材市场流通混乱。常见的混伪品有宝珈海龙 *Microphis boaja* Bleeker、粗吻海龙 *Trachyrhamphus serratus* Temminck et schlegel、海蠋鱼 *Halicampus koilomatodon*

[△] [基金项目] 公益性行业科研专项(201507002)

* [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

Bleeker 和贡氏柄领海龙 *Solenognathus guntheri* Dunjker 等种类^[7]。

中药材 DNA 条形码鉴定技术是 20 世纪新兴的分子鉴定手段,其基于中国传统医药的特点,与最新的分子生物学技术相结合,突破了传统的中药鉴定技术手段,在基因分子水平对药材来源进行分析,达到了准确、快速鉴别中药材真伪的目的^[8]。随着关注度的持续增长,相关研究和实验技术已日益完善,已于 2014 年被增录到 2010 版《中国药典》(增补版)中,并被 2015 版《中国药典》第四部正式收录,成为了具有国家标准的中药鉴定新手段^[9]。DNA 条形码鉴定技术,不限于药材来源物种的生长周期和形态学变化影响,能够有效改善传统鉴定技术鉴定周期长、适用性低的特点,有效维护中药材流通的正常秩序,为人们的健康生活提供保障。本项目通过前期文献研究考察,拟定了海龙样品采集

计划,并通过中药材 DNA 条形码鉴定技术对海龙及其市售样品进行鉴别,以达到快速、高效鉴别海龙的目的。

1 材料

1.1 仪器

PCR 仪(Bio-Rad, USA); 1-14K 型高速冷冻离心机(Sigma 公司); 球磨仪(Retsch MM400, Germany); Nano Drop 2000/2000C 分光光度计(Thermo Fisher Scientific, USA); 微量移液器(Eppendorf, Germany); 凝胶成像系统。

1.2 样品

本实验共收集海龙及其混伪品 7 个物种 129 份样品(见表 1)和 66 条来自 GenBank 数据库的样品序列(见表 2),经长春中医药大学张辉教授鉴定,凭证样本保存于长春中医药大学。

表 1 海龙及其混伪品样品信息

中文名	拉丁名	样品编号	样品数	样品来源
刁海龙	<i>S. hardwickii</i> Gray	HL0001QP001-0011; Y17058MT01-05	16	广州清平药市、广西玉林药市、安徽亳州药市、山东青岛、海南文昌
拟海龙	<i>S. biaculeatus</i> Bloch	HL0004QD001-005; HL0004YL001-004; Y17060MT01-04	11	广州清平药市、广西玉林药市、山东青岛
尖海龙	<i>S. acus</i> Linnaeus	HL0006QP001-004; HL0006YL001-003; Y17059MT01-05	12	广州清平药市、广西玉林药市、安徽亳州药市、山东青岛、海南文昌、海南临高
宝珈海龙	<i>M. boaja</i> Bleeker	HL0002BZ001-004; HL0002QD001-015; HL0002QP001-012; HL0002YL001-003;	34	广州清平药市、广西玉林药市、安徽亳州药市、山东青岛
粗吻海龙	<i>T. serratus</i> Temminck et schlegel	HL0003BZ001-003; HL0003QD001-027; HL0003QP001-006; HL0003YL001-008;	44	广州清平药市、广西玉林药市、安徽亳州药市、山东青岛
海蠲鱼	<i>H. koilomatodon</i> Bleeker	HL0005QP001-004; HL0005YL001-004;	8	广州清平药市、广西玉林药市
贡氏柄领海龙	<i>S. guntheri</i> Dunjker	HL0007YL001-004;	4	广州清平药市

表 2 GenBank 来源序列信息

中文名	拉丁名	样品数	GenBank 登录号
刁海龙	<i>S. hardwickii</i> Gray	14	NC_037044; KJ184524; KP140463; KP140458; KP140478; KP140473; KP140482; KP140481; KP140480; KP140479; KP140477; KP140476; KP140475; KP140474;
拟海龙	<i>S. biaculeatus</i> Bloch	10	MG728097; JF700183; NC_037045; KJ184525; GQ502179; KP140518; KP140517; KP140514; KP140513; KP140509
尖海龙	<i>S. acus</i> Linnaeus	15	NC_037520; MG637145; KR152219; MG637144; KR152217; KP861226; KP140620; KP140619; KP140616; KP140615; KP140612; AP012318; MG637143; KP260464; KR152213
宝珈海龙	<i>M. boaja</i> Bleeker	16	MH237607; NC_037046; KJ184527; KP140445-57
粗吻海龙	<i>T. serratus</i> Temminck et schlegel	11	NC_037047; KJ184528; KF265022; KP140665-70; KY066156; KU943316;

2 方法

2.1 DNA 提取

对收集到的海龙样品,用75%乙醇擦拭表面后,采用紫外灯照射消毒。取样品腹部部位时,需用手术刀片刮去内外腐烂残留,避免污染;取样品尾部部位时,刮去样品表皮即可。取样量约为40 mg,用球磨仪研磨2 min(30次/s),样品DNA使用血液、细胞、组织基因组提取试剂盒(Tiagen Biotech Co. Ltd., China)进行提取。因海龙蛋白含量较高,在样品裂解消化结束后,加入1.5倍体积的三氯甲烷-异戊醇(24:1)溶液,充分混匀,离心($12\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 5~10 min),用于去除蛋白类杂质,防止对后续实验产生影响。所得样品DNA,采用Nano-Drop 2000/2000c紫外-可见分光光度计检测,根据测得的样品浓度和A260/A280比值判断样品DNA质量。

2.2 PCR 扩增及测序

扩增引物采用中药材DNA条形码分子鉴定法指导原则规定的COI序列通用引物^[9-10],正向引物为HCO2198: 5'-TAAACTTCAGGCTGACCAAAAAATCA-3',反向引物LCO1490: 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'; PCR反应体系为25 μL 体系,包含2 \times Taq PCR Mix(Takara Bio, China) 12.5 μL ,灭菌ddH₂O 8.5 μL 、引物各1.0 μL (2.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)(Sangon Biotech Co., Ltd., China),样品DNA约2 μL 。反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性1 min,开启1循环,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性1 min,45 $^{\circ}\text{C}$ 退火1.5 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸1.5 min,共5循环;开启2循环,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性1 min,50 $^{\circ}\text{C}$ 退火1.5 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸1 min,共35个循环;循环完成后72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸5 min。PCR扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测合格后,使用ABI3730XL测序仪(Applied Biosystems Co., USA)进行双向测序。

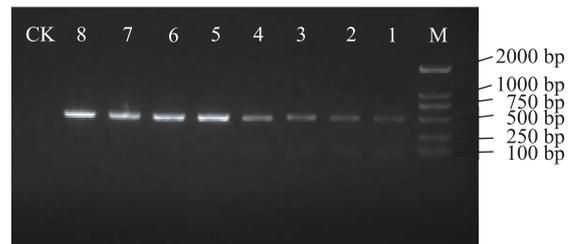
2.3 序列处理及结果分析

测序峰图利用CodonCode Aligner V8.0.2(Codon-Code Co., USA)和DNA man(Lynnon Biosoft, USA)拼接并校正,切除正反引物,获得长度为650 bp左右的样品序列,对于从GenBank获得的COI序列,通过分析软件,与所得的海龙样品序列比对后,切除与海龙样品序列相对应以外的区段,保留长度 ≥ 600 bp的有效序列。最后将全部序列用MEGA7.0(molecular evolutionary genetics analysis)分析软件比对,基于K2P模型进行遗传距离分析,用邻接(NJ)法构建系统聚类树,利用bootstrap(1000次重复)检验各分支的支持率。

3 结果

3.1 海龙药材样品DNA提取与PCR扩增

海龙及其市售药材均以干燥体出售,部分药材经过晾晒、烘干处理,导致药材DNA出现了不同程度的降解,本实验所提取的海龙样品DNA琼脂糖凝胶电泳检测显示部分样品条带呈弥散状,表明DNA有一定程度降解。海龙所有样本均可以成功进行PCR扩增,见图1。



注: M. Marker; CK. 空白对照; 1~8. 海龙样品。

图1 部分海龙样品的PCR扩增电泳图

3.2 海龙种内及种间变异分析

海龙及其混伪品COI序列片段长度为658 bp。刁海龙不同来源样品共16份,变异位点较少,在622 bp位置A-G变异;拟海龙不同来源样品共16份,变异位点较少,在641 bp位置G-A变异。尖海龙不同来源样品共16条,变异位点较少,在547 bp位置C-T变异。混伪品宝珈海龙不同来源样品共35份,变异位点较少,在301 bp位置C-T变异,511 bp位置G-A变异,512 bp位置A-G变异;粗吻海龙不同来源样品共45份,在44、345、502 bp位置C-T变异,249 bp位置T-C变异,312、315、432、627 bp位置A-G变异,351、513 bp位置G-A变异;海蠋鱼共6份,在103、178、265、550 bp位置T-C变异,100、322 bp位置G-A变异。贡氏柄颌海龙不同来源样品共4条。基于K2P模型计算遗传距离,3种正品海龙药材来源种内最大K2P距离均小于0.017,种内平均K2P距离为0.005,均远远小于海龙药材与其混伪品序列种间最小K2P距离。

3.3 海龙及其混伪品的序列鉴定

通过邻接(NJ)法利用所得实验序列和GenBank数据库中序列所构建的系统聚类树(见图2)可以看出,海龙药材不同来源个体均聚在一起,单独聚为一支,具有明显单系性,各类混伪品的对应序列也分别单独聚为一支。因此,COI序列条形码可准确鉴别海龙及其混伪品。

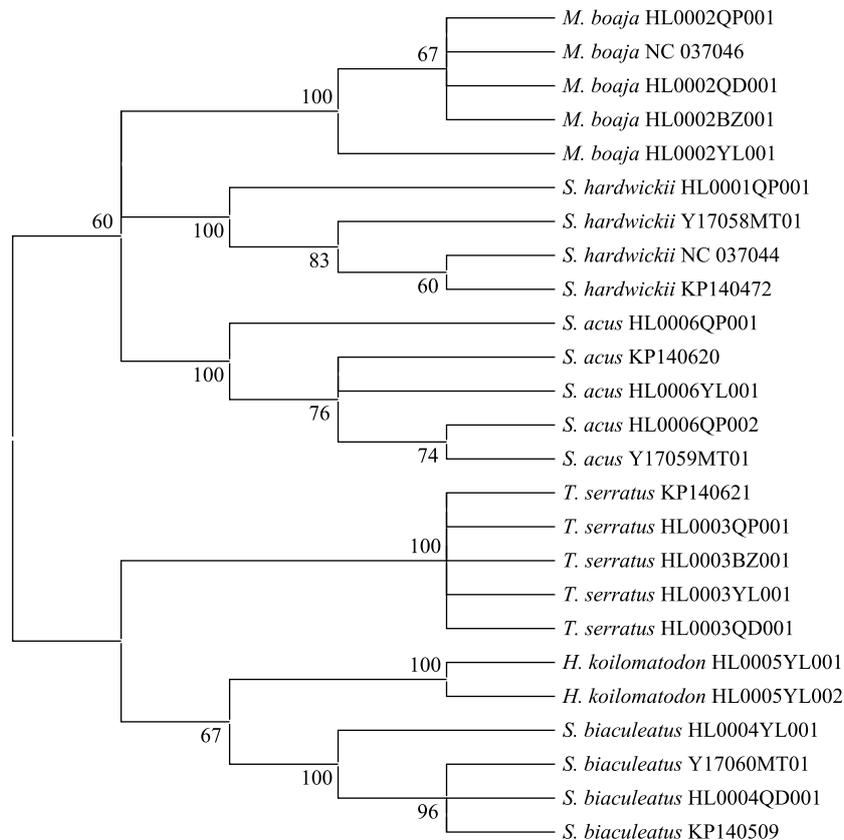


图2 海龙及其混伪品的邻接(NJ)树(bootstrap 1000次重复)

4 讨论

4.1 海龙及其混伪品样品 DNA 提取

海龙质地坚韧,骨质化程度高,提取 DNA 时,难以裂解完全,且市售海龙均经过晒干和烤干等炮制处理;部分商家为使样品美观,还进行了熏硫漂白,致使 DNA 含量减少。本研究经过预实验,按 DNA 提取试剂盒说明操作,所得样品 DNA 质量不能达到后续的实验要求,因此对 DNA 提取试剂盒操作进行部分优化,成功获得了较为理想的样品 DNA。样品前处理时,使用工具清除样品外皮及内脏残留,用 75% 乙醇进行表面擦拭,紫外灯照射消毒处理,防止外源性污染;提取 DNA 时,增加了 GA、GB、蛋白酶 K 的加入量和样品的裂解时间,以达到更好的裂解效果,在裂解完成后加入 1.5 倍体积的三氯甲烷-异戊醇(24:1)进行抽提,12 000 r·min⁻¹离心 5~10 min,吸取上层清液。

4.2 DNA 条形码鉴定技术在动物药鉴定中的应用

2015 版《中国药典》中共收录了 51 种动物药,

包含 76 种药用动物来源,所收录的动物类药除鹿类、蛤蚧、乌梢蛇、水蛭、中华大蟾蜍等已具备规范化养殖外,其余大部分药材来源还是以野生资源为主,如穿山甲、海龙、海马等,随着野生资源的大量开发,药源逐渐紧缺,致使价格持续增长,为追求利益,药材市场上混伪品充斥现象较为普遍,严重扰乱了药材市场秩序,增加了临床用药的安全隐患。中药材 DNA 条形码鉴定方法的提出,有效补充了传统中药鉴定方法的不足,在名贵动物药鉴定中的作用尤为重要。贾静等^[11]基于 DNA 条形码分子鉴定技术对传统名贵珍稀动物药穿山甲进行了成功鉴别,并对穿山甲常见的混伪品进行了序列比对分析,结果表明, DNA 条形码鉴定技术能够有效鉴别穿山甲及其混伪品。张改霞等^[12]基于 COI 条形码对海马及其混伪品 21 个物种 211 份样品进行了种间种内序列分析、DNA Barcoding gap 检测,构建了系统发育树,研究结果表明,各不同来源海马正品与混伪品均能明显区分开。严华等^[13]采用优化的 DNA 提取方法对阿胶原材料及其混伪品进行了 DNA 条形码鉴定,结果表明,鉴定结果准确可行。

4.3 海龙药材市场考察及 DNA 条形码鉴定的意义

本研究在样品采集过程中,研究人员亲自现场考察,在走访过程中发现,在安徽亳州药市、广西玉林药市、广州清平药市上销售的海龙药材,主要以刁海龙(四角龙,商家习称,下同)、拟海龙(三角龙)、尖海龙(海针)、宝珈海龙(六角龙)、粗吻海龙(小海龙)、贡氏柄颌海龙(大肚海龙)等种类为主,混伪品贡氏柄颌海龙售价高于正品及其余混伪品,销量最好的海龙是尖海龙、宝珈海龙、粗吻海龙;同时,在收集粗吻海龙样品过程中,还发现粗吻海龙中混有少量海蠋鱼进行销售。通过对海龙药材产地的文献进行整理总结^[14-16],研究人员对海龙产地进行了实地考察,结果发现,在山东省青岛市码头、海南省海口市码头和文昌市环球码头等地,海龙药材产量相对较少,种类以粗吻海龙为主。药材市场中海龙药材多采用库存式销售,其货源多以进口为主,随着海龙价格的持续走高,也刺激了亚洲、非洲等地走私海龙的积极性,其来源多为亚洲沿海国家菲律宾、马来西亚和非洲沿海国家索马里、坦桑尼亚等地,这些非法的海龙药材来源,销售价格远低于刁海龙,对药材市场海龙行情冲击较大。

本研究基于 DNA 条形码鉴定技术,对海龙及其市售样品 DNA 条形码鉴定研究,证实了中药材 DNA 条形码鉴定技术在海龙及其混伪品鉴定中的可行性,为海龙鉴定的标准化提供了新的思路,也为名贵珍稀动物类中药市场的规范化提供可靠的市场管理和监控手段。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:294.

- [2] 吴筱丹,李士敏,王思平. 粗吻海龙中总甾体的含量测定[J]. 中草药,2002,33(7):40-41.
- [3] 张朝晖,徐国钧,徐璐珊,等. 海龙类乙醇提取物的激素样作用[J]. 中药材,1995,18(4):197-199.
- [4] 刘宇欣. 海龙中蛋白质的提取分离纯化及诱导宫颈癌 Hela 细胞凋亡的机制[D]. 锦州:辽宁医学院,2014.
- [5] 胡建英,李八方. 海洋生药尖海龙的抗疲劳作用研究[J]. 中国海洋药物,2002,21(4):48-53.
- [6] 刘冬,张红印,鲍悦,等. 海龙药理作用研究进展[J]. 吉林中医药,2015,35(10):1040-1042.
- [7] 李莹,赵子佳,孙佳明,等. 海龙鉴别研究进展[J]. 吉林中医药,2017,37(8):811-813.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] HEBERT P D N, RATNASINGHAM S, DEWAARD J R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species[J]. Proc R Soc Lond B,2003,270(Suppl):S96.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] 许东晖,谢江海,梅雪婷,等. 我国海龙的研究进展[J]. 中国海洋药物,2005,24(2):51-56.
- [15] 张朝晖,徐国钧,徐璐珊,等. 海龙科药用资源调查[J]. 中药材,1997,20(5):224-226.
- [16] 吴艳,刘佳,王梦月,等. 海龙及其常见伪品的 RAPD 鉴别[J]. 中国中药杂志,2009,34(14):1758-1760.

(收稿日期:2019-02-15 编辑:王丽英)