

## · 基础研究 ·

麝香的微型 DNA 条形码鉴别方法研究<sup>△</sup>

赵玉洋, 周骏辉, 袁媛\*, 黄璐琦, 金艳, 蒋超\*

中国中医科学院 中药资源中心 道地药材国家重点实验室培育基地, 北京 100700

**[摘要]** 目的: 建立一种麝香药材的 DNA 分子鉴别方法, 并与全长 DNA 条形码鉴别方法进行比较。方法: 通过比较麝香及其混伪品的 COI 序列, 设计出一对约 180 bp 的麝香微型 DNA 条形码鉴别引物, 对麝香及其混伪品进行测序鉴定。结果: COI 全长扩增引物能在 72.1% 的样本中扩出条带, 而微型条形码引物能扩出所有麝香样本, 且微型条形码片段物种鉴别能力与全长片段一致。使用建立的微型 DNA 条形码鉴别市售麝香样品, 检出 2 批混伪品, 其基原物种为鸡 *Gallus gallus*。结论: 微型 DNA 条形码可用于鉴别麝香原动物及药材。

**[关键词]** 麝香; 分子鉴定; DNA 条形码; 微型条形码

**[中图分类号]** R282.74; R282.5; R284 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2019)09-1186-06

**doi:**10.13313/j.issn.1673-4890.20190104002

**Mini-DNA Barcoding Molecular Identification of Traditional Chinese Medicinal Moschus**

ZHAO Yu-yang, ZHOU Jun-hui, YUAN Yuan\*, HUANG Lu-qi, JIN Yan, JIANG Chao\*

State Key Laboratory Breeding Base of Dao-di Herbs, National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

**[Abstract]** **Objective:** To identify accurately *Moschus* powder or the sachet by establish a new DNA mini barcoding, and compare the new method to cytochrome C oxidase subunit I (COI) DNA barcoding. **Methods:** 46 musk deer products and 15 secretion samples (include the adulterants) were analyzed using different extraction kits, and by amplifying full-length (-700 bp) as well a mini-length (-180 bp) barcode belonging to COI. **Results:** In total, full barcode were generated for 72.1% of the analyzed products, and mini-barcode were successfully obtained from all *Moschus* samples. Mini-barcode could also identification of *Moschus* at species level as the full-length barcode. Furthermore, two products labeled as *Moschus* were detected as *Gallus gallus* by the established mini-barcode identification method. **Conclusion:** The results demonstrated that mini-barcode provide a valid contribution to barcoding-based identification across severe degraded products.

**[Keywords]** moschus; molecular authentication; DNA barcoding; mini-barcode

麝香为麝科动物林麝 *Moschus berezovskii* Flerov、马麝 *M. sifanicus* Przewalski (*M. c. sifanicus* Büchner) 或原麝 *M. moschiferus* L. 成熟雄体香囊中的干燥分泌物<sup>[1-2]</sup>。麝香为安宫牛黄丸、片仔癀等中成药的重要药味, 具有开窍醒神、活血通经、消肿止痛等功效, 临床应用很广, 价格昂贵。近年来, 麝科动物野生居群快速减小<sup>[3-4]</sup>, 天然麝香已不能满足中药临床药用的需求<sup>[5]</sup>, 麝香药材掺伪、混伪现象不断出现, 而麝香药材及其香囊缺乏必要的性状特征, 鉴别

困难。

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<sup>[6]</sup>。COI 片段 (Cytochrome c oxidase subunit 1) 是最广为接受的动物药材鉴定用 DNA 条形码片段<sup>[7-10]</sup>, 此外, 其他片段如 cytochrome b (Cyt b), 12S rRNA 线粒体控制区 control region (CR) 也常用于动物的分类和药材的鉴别研究。已有研究通过提取麝类动物的肌肉组织、毛发等的 DNA, 使用 COI 或

<sup>△</sup> **[基金项目]** 公益性行业科研专项(201507002-4-4); 中央本级重大增减支项目(2060302); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(ZZ10-008)

\* **[通信作者]** 蒋超, 助理研究员, 研究方向: 中药分子鉴定; Tel: (010)64087649, E-mail: jiangchao0411@163.com  
袁媛, 研究员, 研究方向: 中药鉴定与分子生药学; Tel: (010)64087649, E-mail: y\_yuan0732@163.com

Cyt b 通用引物扩增对麝类动物进行 DNA 条形码鉴别<sup>[5,11-12]</sup>。然而,麝香药材中残留的 DNA 含量很少,降解严重,难以扩出 658 bp 的全长 COI 片段,致使 DNA 条形码分子鉴定法难以用于麝香药材的分子鉴定。微型 DNA 条形码是从全长序列中设计出新的 PCR 引物,用于扩增短 DNA 片段(约 100 ~ 300 bp)并进行测序的一种方法<sup>[13]</sup>。源于 COI 的微型 DNA 条形码序列可区分 90% 以上动物物种<sup>[14-15]</sup>。本文根据麝香及其混伪品 COI 序列设计出一对微型 DNA 条形码引物,可从肌肉组织、毛发、香囊及药材中扩出约 180 bp 的片段并能准确区分麝香及其混伪品。

## 1 材料

### 1.1 样品

共采集 61 批麝香及其混伪品样品(见表 1),其中包括养殖场采集的林麝毛发 15 份、麝香 2 份,马麝毛发 10 份、麝香 1 份,原麝毛壳 4 份、麝香 5 份,麝鼠原动物 6 份、麝鼠香 3 份,常见混伪品鸡、牛、羊、猪原动物组织各 3 份,市售麝香毛壳 2 份、麝香仁 2 份。样品采集后置 -80 °C 冰箱存于中国中医科学院中药资源中心。

表 1 61 批麝香及其混伪品样品信息

序号	样品数	样品号	物种	类别	采集地
1	15	LS001 ~ 015	<i>M. berezovskii</i>	毛发	福建龙岩
2	2	20150918001 ~ 002	<i>M. berezovskii</i>	麝香	福建龙岩
3	10	MS001 ~ 010	<i>M. sifanicus</i>	毛发	甘肃兰州
4	1	X20170227001	<i>M. sifanicus</i>	麝香	甘肃兰州
5	1	XN003	<i>M. moschiferus</i>	香囊	福建龙岩
6	2	X001 ~ 002	<i>M. moschiferus</i>	麝香	安徽亳州
7	3	X20161019001 ~ 003	<i>M. moschiferus</i>	麝香	吉林延边
8	3	20161019001 ~ 003	<i>M. moschiferus</i>	香囊	吉林延边
9	6	SS001 ~ 006	<i>Ondatra zibethicus</i>	肌肉	吉林长春
10	6	SSX001 ~ 006	<i>O. zibethicus</i>	麝香	吉林长春
11	3	J001 ~ 003	<i>Gallus gallus</i>	肌肉	北京
12	3	Y001 ~ 003	<i>Ovis aries</i>	肌肉	北京
13	3	Z001 ~ 003	<i>Sus scrofa</i>	肌肉	北京
14	3	HN001 ~ 003	<i>Bos taurus</i>	肌肉	北京
15	2	XN001 ~ 002	未鉴定	香囊	安徽亳州
16	2	SX001 ~ 002	未鉴定	麝香	河北安国

### 1.2 试剂

Dneasy 血液及组织核酸提取试剂盒(上海凯杰企业管理有限公司,批号:69506),TIANamp 微量 DNA 提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司,批号:DP316],Wizard 基因组 DNA 提取试剂盒(Promega 公司,批号:A2360),QIAamp 粪便 DNA 提取试剂盒(上海凯杰企业管理有限公司,批号:51504),SpeedSTAR HS *Taq* DNA 聚合酶(批号:RR070A),2000 bp DNA Marker(北京全式金生物技术有限公司,批号:BM101),十六烷基三甲基溴化铵(CTAB,批号:02194004)。

### 1.3 仪器

Veriti™ 型 PCR 扩增仪(美国 Applied Biosystem 公司),SYNGENE SYNGENE 型凝胶成像系统(GENE 公司);Nanodrop 2000 型微量核酸定量分析仪(美国 Thermo Scientific 公司)。

### 1.4 序列

从 Genbank 数据库中下载麝类及其混伪品 COI 序列或全长线粒体 DNA 作为参考序列进行系统发育树分析,其中全长线粒体 DNA 序列 Genbank 登录号:林麝(GQ329032.1, JX627397.1),原麝(EU835717.1, JN632662.1),马麝(KP684123.1, JF700176.1),安徽麝(*M. anhuiensis*, NC020017.1, KC013352.1)。

## 2 方法

### 2.1 DNA 提取

肌肉组织、香囊使用 DNeasy 组织血液 DNA 提取试剂盒按说明书进行 DNA 提取。对毛发样品,取约 20 根带有毛囊的毛发,剪除毛囊 1 cm 以上的部分,使用 TIANamp 微量 DNA 提取试剂盒(北京天根公司)提取 DNA。

麝香仁使用改良 CTAB 法进行 DNA 提取:取麝香仁 0.2 g 置 15 mL 离心管中,加入 60% 乙醇 10 mL,充分旋涡振荡混匀,65 °C 水浴 20 min,6000 g 离心 30 min,弃尽上层清液;沉淀加入已灭菌的 CTAB 提取液 1000 μL,65 °C 水浴 30 min;加入 900 μL 三氯甲烷-异戊醇抽提 2 次;转移 500 μL 上层清液至另一新的 2.0 mL 的微量离心管中,加入 330 μL 异丙醇溶液,置 -20 °C 放置 1 h;12 000 g

离心 10 min, 弃上层清液, 加入 70% 乙醇 2 次; 无水乙醇漂洗 1 次, 12 000 g 离心 10 min, 弃上层清液, 挥干乙醇后, 加入 30  $\mu\text{L}$  灭菌水溶解沉淀,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存。

## 2.2 引物设计

使用 MEGA 6.0 软件对麝类及其混伪品物种 COI 序列及全线粒体基因组序列进行序列比齐。在正品和混伪品 DNA 差异最大的区域两侧相对保守的位置使用 Premier primer 5.0 软件设计引物, 扩增产物大小为 120 ~ 200 bp, 设计出麝香微型 DNA 条形码鉴别引物对 SX-178. F 和 SX178. F(见表 2)。

## 2.3 PCR 扩增、电泳检测

25  $\mu\text{L}$  PCR 反应体系包含 10  $\times$  FBI buffer 2.5  $\mu\text{L}$ , dNTP(10 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ ) 1.5  $\mu\text{L}$ , 上游及下游引物各 0.5  $\mu\text{L}$ , SpeedSTAR HS *Taq* DNA 聚合酶(大连宝生物公司) 0.2  $\mu\text{L}$ , DNA 模板(约 10 ng $\cdot\text{L}^{-1}$ ) 1  $\mu\text{L}$ , 加灭菌蒸馏水补足至 25  $\mu\text{L}$ 。引物序列及 PCR 反应程序见表 2。PCR 反应结束后, 取反应产物, 加入 6  $\times$  Loading buffer 5  $\mu\text{L}$ (Takara 公司), 混匀后于 EtBr 染色的 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, SYNGENE 凝胶成像系统观察、成像。

## 2.4 序列分析

取阳性扩增产物送由睿博兴科生物技术有限公司进行双向测序。使用 BioEdit 7.2.6 软件对测序峰图进行校对、去除引物序列及拼接, 获得对应测序结果。从 GenBank 获取的麝香及其混伪品物种 COI 序列及全线粒体基因组序列, 与测序序列一起经多重序列比对后利用 MEGA 6.0 基于 Kimura-2-parameter 模型计算种内和种间遗传距离, 使用 Neighbour Joining 法构建系统发育树, bootstrap 值设定为 100 次重复。

## 3 结果

### 3.1 麝类药材全长 COI 序列 DNA 条形码鉴别能力

麝类不同材料 DNA 提取效率具有明显区别, 从肌肉或香囊囊皮中提取的 DNA 质量浓度为 60.2 ~ 230.7 ng $\cdot\mu\text{L}^{-1}$ , 毛发中则减至 16.5 ~ 31.4 ng $\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 。麝香药材 DNA 提取效率最低, 分别使用 Wizard 基因组 DNA 提取试剂盒、QIAamp 粪便 DNA 提取试剂盒、DNeasy 组织血液 DNA 提取试剂盒, 经典 CTAB 法及改良 CTAB 法进行 DNA 提取, 仅改良 CTAB 法能从麝香中提出 DNA, 质量浓度为 5.5 ~ 16.1 ng $\cdot\mu\text{L}^{-1}$ , 使用全长 COI 引物 LCO1490 和 HCO2198 进行扩增, 肌肉组织、香囊和毛发样品均能扩出约 700 bp 条带, 而在麝香样品中无条带。

除 5 批毛发样品 PCR 产物浓度过低, 其余样品均成功测序, 测序峰图经校对、去除引物区后获得 658 bp 全长 COI 序列。将获得的测序结果及 GenBank 上下载的序列比齐后进行序列分析发现, 麝类及其混伪品 COI 序列包含 419 个保守位点和 239 个变异位点, 其中 158 个为 4 个麝属物种的变异位点。麝属物种序列 A、T、C、G 碱基平均含量分别为 27.4%、30.3%、26.1%、15.9%。各麝种种内和种间遗传距离有较大区别, 安徽麝平均种内遗传距离为 0, 种间遗传距离为 0.145 8, 安徽麝与林麝遗传距离最近, 为 0.015。原麝具有最大的种内距离(0.006), 是其他物种的 2 倍(见表 3)。系统发育树结果表明, 除安徽麝外其他物种均能聚成相对独立的支(99% 支持率), 麝香基原动物原麝、林麝、马麝与混伪品麝鼠、猪、牛、羊、鸡等可相互鉴别(见图 1)。

表 2 麝香 DNA 条形码鉴别反应条件

片段	引物序列	PCR 反应程序	产物大小/bp
全长 COI DNA 条形码	ATA TTG G-3' HCO2198 5'-TTA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3'	94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 1 min, 5 循环(94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 45 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min), 然后 35 循环(94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 50 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min), 72 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸 5 min	709
微型 DNA 条形码	SX-178. F 5'-TTC TGA TTY TTT GGH CAC CCR GAA-3' SX-178. R 5'-TAA AYA TAT GGT GGG CTC ATA C-3'	94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 1 min, 45 循环(94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s), 72 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸 5 min	178

表3 麝香与其混伪品种内、种间遗传距离( $\bar{x} \pm s, n = 32$ )

物种	林麝	马麝	原麝	安徽麝	麝鼠	鸡	山羊	猪	黄牛
林麝	0.004								
马麝	0.063 ± 0.010	0.001							
原麝	0.062 ± 0.010	0.067 ± 0.011	0.006						
安徽麝	0.014 ± 0.004	0.063 ± 0.010	0.057 ± 0.010	0					
麝鼠	0.221 ± 0.021	0.230 ± 0.021	0.234 ± 0.021	0.230 ± 0.021	0.002				
鸡	0.248 ± 0.022	0.250 ± 0.021	0.252 ± 0.022	0.246 ± 0.022	0.259 ± 0.023	0.005			
山羊	0.169 ± 0.018	0.180 ± 0.020	0.166 ± 0.018	0.166 ± 0.018	0.233 ± 0.020	0.261 ± 0.023	0.002		
猪	0.219 ± 0.020	0.226 ± 0.021	0.210 ± 0.020	0.212 ± 0.020	0.233 ± 0.020	0.268 ± 0.023	0.195 ± 0.019	0.007	
黄牛	0.179 ± 0.019	0.195 ± 0.020	0.195 ± 0.020	0.178 ± 0.019	0.213 ± 0.019	0.224 ± 0.020	0.164 ± 0.017	0.220 ± 0.021	0

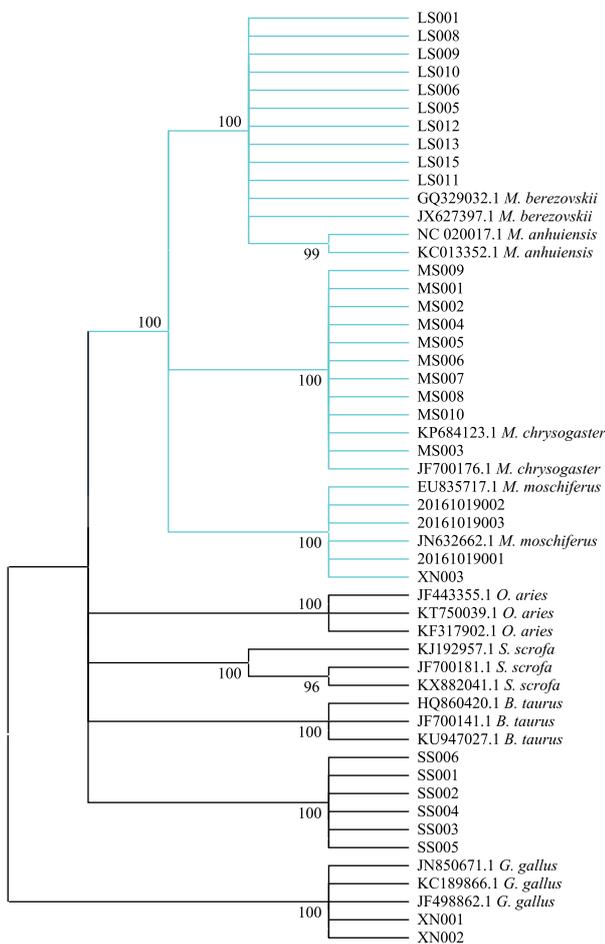
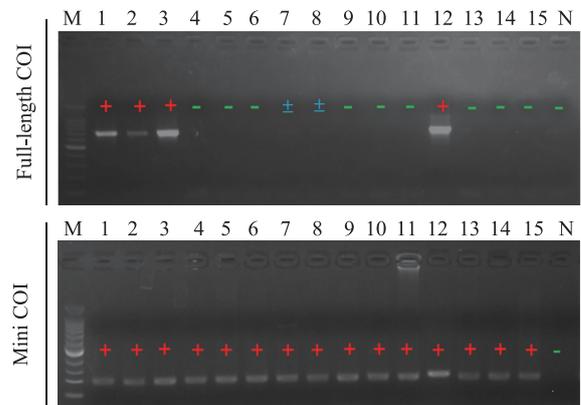


图1 麝香及其混伪品的 COI NJ 系统发育树结果

### 3.2 麝香微型 DNA 条形码与全长 DNA 条形码鉴别能力的比较

COI 全长 DNA 条形码引物无法从麝香样品中扩出条带(见图2,泳道1~3),而使用微型 DNA 条形码可从麝香和麝鼠香中扩出约 178 bp 的条带(见图2)。序列去除引物区后长 132 bp, 包含 111 个保守位点和 21 个变异位点, 其中 12 个变异位点为麝

属 4 个物种的差异位点。麝香微型 DNA 条形码多态性(10.81%) 低于全长 DNA 条形码(24.01%)。麝属物种微型 DNA 条形码序列 A、T、C、G 碱基平均含量分别为 31.3%、35.5%、15.2%、18.0%。该微型 DNA 条形码引物也能从鸡、羊、牛等混伪品中扩出 178 bp 的条带, 且各物种均只有一种单倍型序列, 种内遗传距离为 0。林麝与马麝、林麝与原麝、马麝与原麝种间遗传距离分别为 0.066、0.063、0.029。构建 NJ 系统发育树各物种均能聚成相对独立的支(99% 支持率), 麝香基原动物原麝、林麝、马麝与混伪品麝鼠、猪、牛、羊、鸡等可相互鉴别, 其鉴别结果与全长 DNA 条形码结果一致。



注: M. 100 bp DNA ladder; 1. 林麝毛发; 2. 马麝毛发; 3. 原麝肌肉; 4~8. 原麝香仁; 9~10. 林麝香仁; 11. 马麝香仁; 12~15. 麝鼠香; 16. 空白对照(dd H<sub>2</sub>O 为模板); + 表示明亮条带; ± 表示暗条带; - 表示无条带。

图2 麝香原动物及麝香仁 PCR 扩增结果

### 3.3 市售样品的 DNA 条形码鉴别

所有麝香及麝鼠香样品, 包括 2 批标为“原麝”的毛壳香囊(XN001~002)和 2 批标为“麝香”的市售样品, 用于测试全长 DNA 条形码和微型 DNA 条

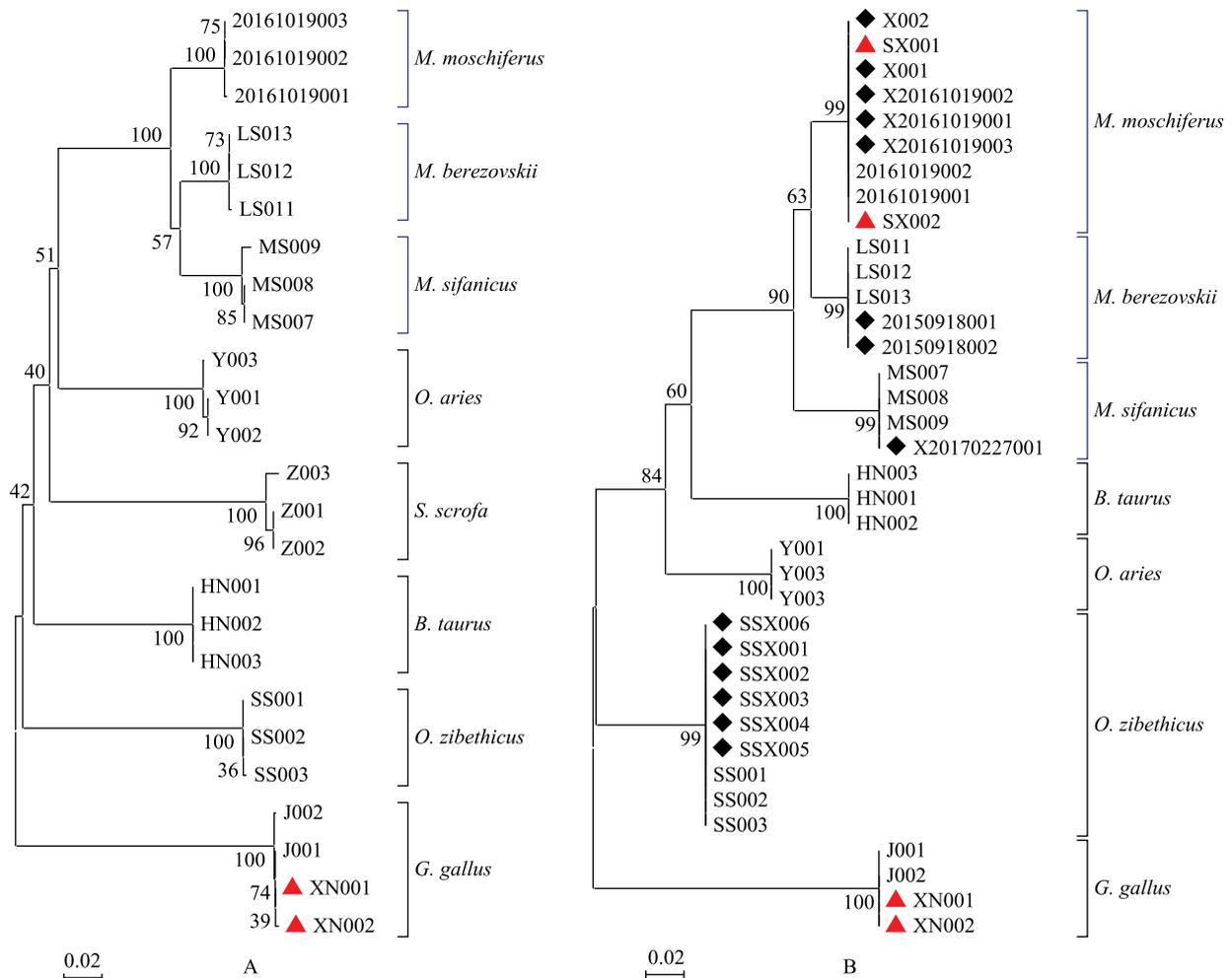
形码的鉴别能力,原麝、林麝、马麝、麝鼠、猪、牛、羊、鸡肌肉组织或毛发样品各3批作为阳性对照同时实验。扩增和测序后使用系统发育树根据聚类结果进行鉴别,结果样品 XN001 和 XN002 全长 DNA 条形码和微型 DNA 条形码均与鸡聚为一支,表明其物种基原为鸡。麝香样品 SX001 和 SX002 只能用微型 DNA 条形码鉴别,测序和系统发育树结果表明其基原为原麝(见图3)。

#### 4 讨论

麝是亚欧大陆珍稀濒危物种,自1979年开始,所有麝属物种均已列入《濒危野生动植物国际贸易公约》附录进行保护。目前天然麝香产量低,人工养殖规模小,国内外市场麝香供需的巨大缺口导致我国麝资源面临严重危机,存在较为严重的掺伪、混伪现象,需要建立准确的基原鉴别方法。

尽管全长 DNA 条形码已用于多种动物及其制品的分子鉴定,该方法用于麝香样品鉴定仍存在较大不足。除改良的 CTAB 法外,其他多种 DNA 提取方法均无法从麝香样品中回收 DNA,且提取的 DNA 浓度均远低于肌肉组织和毛发样品。改良 CTAB 法提出的 DNA 可能来源于麝香香囊囊皮或毛发脱落的微量细胞或组织碎片,其 DNA 含量很低、严重碎片化,且存在大量 PCR 抑制物,使用全长 DNA 条形码扩增引物扩增具有困难。

研究发现,高度降解或 DNA 含量低微的样本可扩出短 PCR 产物片段。而 100 bp 左右的微型 DNA 条形码也具有与全长 DNA 条形码相似的物种鉴别能力<sup>[14,16-17]</sup>。本研究根据麝香及其混伪品 COI 序列差异,从中设计出短扩增片段的通用引物对,可从原麝、林麝、马麝与混伪品麝鼠、牛、羊、鸡中扩出 178 bp 的微型 DNA 条形码条带,该微型 DNA 条形码



注: A. 全长 COI DNA 条形码; B. 微型 DNA 条形码。

图3 麝香药材 DNA 条形码 NJ 系统发育树鉴别

片段与 Genbank 数据库中的 COI 序列有 98% ~ 100% 一致性。该结果表明, 微型 DNA 条形码可用于麝香药材的鉴定, 该方法也有望推广至猪胆粉、熊胆粉、阿胶等 DNA 降解或 DNA 含量低微的材料, 解决动物类中药鉴别难题。

### 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,2015:384-385.
- [2] 蒋超,黄璐琦,袁媛,等.《中国药典》动物药材基原物种中文名和拉丁学名引证规范[J].中国科学:生命科学,2018,48(7):772-782.
- [3] ZHOU Y, MENG X, FENG J, et al. Review of the distribution, status and conservation of musk deer in China[J]. Folia Zool, 2004, 53:129-141.
- [4] YANG Q, MENG X, XIA L, et al. Conservation status and causes of decline of musk deer (*Moschus* spp.) in China[J]. Biol Conserv, 2003, 109(3):333-342.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] HEBERT P, CYWINSKA A, BALL S. Biological identifications through DNA barcodes [J]. P R Soc B, 2003, 270(1512):313-321.
- [8] 荆礼,苏航,睢博文,等. DNA 条形码分子鉴定在动物药中的研究进展[J].中国中药杂志,2018,43(23):4587-4591.
- [9] 黄璐琦,袁媛,蒋超,等.动物药材分子鉴别现状与策略[J].中国现代中药,2017,19(1):1-10.
- [10] 王孟虎,许亮,康廷国,等.动物类中药 DNA 条形码鉴定研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(15):227-234.
- [11] PAN T, WANG H, HU C, et al. Species delimitation in the genus *Moschus* (Ruminantia: Moschidae) and its high-plateau origin[J]. PLoS One, 2013, 10(8):e0134183.
- [12] YANG C, XIAO Z, ZOU Y, et al. DNA barcoding revises a misidentification on musk deer [J]. Mitochondrial DNA, 2015, 26(4):605-612.
- [13] 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, 2011, 5(3):181-184.
- [14] ARMANI A, GUARDONE L, CASTIGLIEGO L, et al. DNA and mini-DNA barcoding for the identification of Porgies species (family Sparidae) of commercial interest on the international market[J]. Food Control, 2015, 50:589-596.
- [15] SHOKRALLA S, HELLBERG R S, HANDY S M, et al. A DNA mini-barcoding system for authentication of processed fish products[J]. Sci Rep, 2015, 5(1):15894.
- [16] HAJIBABAEI M, SMITH M, JANZEN D H, et al. A minimalist barcode can identify a specimen whose DNA is degraded[J]. Mol Ecol Resour, 2006, 6(4):959-964.
- [17] JANJUA S, FAKHAR-I-ABBAS, WILLIAM K, et al. DNA Mini-barcoding for wildlife trade control: a case study on identification of highly processed animal materials [J]. Mitochondrial DNA A, 2017, 28(4):544-546.

(收稿日期: 2019-01-04 编辑: 王丽英)