

· 基础研究 ·

全蝎 DNA 条形码分子鉴定研究[△]

庞中化, 王志刚, 成小兰, 胡春萍, 曹鹏*

江苏省中医药研究院/南京中医药大学附属中西医结合医院, 江苏 南京 210028

[摘要] 目的: 本研究通过 COI 序列对全蝎及其混伪品进行 DNA 条形码鉴别, 为全蝎药材分子鉴定提供科学依据。方法: 通过野外采集东亚钳蝎正品, 对采集样品形态学鉴定、DNA 提取、PCR 扩增 COI 序列, 测序建立东亚钳蝎的正品 COI 数据库, 通过比对确定东亚钳蝎正品和伪品的 DNA 条形码。结果: 实验共获取 310 份东亚钳蝎样本。通过序列分析, 确定东亚钳蝎 COI 序列长度为 658 bp。采用 MEGA 6.0 软件对东亚钳蝎样品及混伪品进行序列比对, 构建邻接(NJ)树。结果表明东亚钳蝎 COI 序列扩增成功, 与混伪品 COI 序列明显区分。结论: 本研究运用 COI 条形码序列可准确鉴定全蝎的基原动物及其混伪品, 为后续全蝎药材的分子鉴定提供了新的可行性方法。

[关键词] 全蝎; 东亚钳蝎; COI 序列; DNA 条形码; 分子鉴定

[中图分类号] R282.74; R282.5; R284 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2019)09-1192-06

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20190325004

Identification of Scorpion Using DNA barcoding Technique

PANG Zhong-hua, WANG Zhi-gang, CHENG Xiao-lan, HU Chun-ping, CAO Peng*

Jiangsu Province Academy of Traditional Chinese Medicine, Affiliated Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China

[Abstract] **Objective:** DNA barcoding is becoming more and more attractive as a new method for species identification. In this paper, we discussed the validation of COI gene sequence to identify *Buthus martensii*. **Methods:** Genomic DNA of scorpion were extracted, and the COI regions were PCR amplified and sequenced. The COI database of scorpion was established, the authentic and fake products of scorpion was compared using MEGA 6.0 software. **Results:** A total of 310 scorpion samples were collected. Through sequence analysis, 658 bp length of the COI sequence was determined. Phylogenetic analysis was carried out with different methods, including neighbor joining and bayesian analysis. The results showed that the COI gene sequence of the *Buthus martensii* was successfully amplified, and could be clearly distinguished from the fake products. **Conclusion:** DNA Barcoding is efficient and useful for species identification. This study could provide a new method for the molecular identification of scorpion.

[Keywords] Scorpion; COI sequence; DNA barcode; molecular identification

全蝎为钳蝎科动物东亚钳蝎 *Buthus martensii* Karsch 的干燥体, 具有息风镇痉、通络止痛、攻毒散结的功效^[1-2]。全蝎作为动物入药在我国有着悠久的历史, 临床上广泛用于治疗类风湿关节炎、小儿惊风、癫痫、无名肿痛等^[3-6]。由于全蝎药材价格高, 且通常以粉末、中成药等形式入药, 外部形态不完整或被破坏, 混伪品增多, 给全蝎药材鉴定带来极大的困难。线粒体 COI 基因

被公认为动物界中标准的 DNA 条形码基因^[7]。基于 COI 基因的中药 DNA 条形码技术建立和推广应用, 有利于实现中药鉴定客观化、规范化和标准化。本研究拟利用 DNA 条形码 COI 序列对全蝎进行鉴定研究, 通过对样品标准序列进行测序, 建立全蝎 DNA 条形码数据库, 实现全蝎的标准化快速化鉴定, 为后续全蝎药材的分子鉴定提供新的方法。

[△] [基金项目] 公益性行业科研专项(201507002)

* [通信作者] 曹鹏, 博士生导师, 研究方向: 中药药理; Tel: (025)85608666, E-mail: njpcao@126.com

1 材料

1.1 样品采集及鉴定

东亚钳蝎采自山东泗水、山西吕梁、河南伊川、河北邯郸、陕西绥德、内蒙古清水河、宁夏盐池、甘肃天水、青海贵德等地。所采集样本经南京师范大学戴建华教授鉴定,均为钳蝎科动物东亚钳蝎 *Buthus martensii* Karsch,标本均保存于江苏省中医药研究院资源中心。伪品家鸡鸡肉购买自南京月苑菜市场。全蝎及其混伪品信息见表1。

1.2 仪器及试剂

水浴锅(XMTD-8222,上海精宏实验设备有限公司);超速离心机(Eppendorf 22331 Hamburg,德国Eppendorf公司);ABI PCR仪(美国Applied Biosystems公司);琼脂糖凝胶电泳仪(PowerPac Universal™ Power Supply,美国伯乐Bio-Rad公司);凝胶成像系

统 Gel Doc XR(美国伯乐 Bio-Rad 公司)。

琼脂糖凝胶粉(BIOWEST REGULAR AGAROSE G-10);染料(GelRed™ 10000X inwater);聚合酶(EneraldAmp Max PCR Master Mix 2X Premix);引物(金斯瑞生物科技有限公司合成);ddH₂O;DL 2000 DNA Marker [宝日医生物技术(北京)有限公司];基因组DNA小量试剂盒购买自AxyPrep。测序工作委托金斯瑞生物科技有限公司完成。

2 方法

2.1 全蝎基因组DNA提取

从液氮中取出保存的全蝎样本,放入研钵进行研磨使组织充分破碎,后加入1.5~2.0 mL 56℃预热的PBS溶液,继续研磨至组织溶液分布均匀。后续提取DNA步骤按照AxyPrep基因组DNA小量试剂盒依次完成实验。

表1 全蝎样品及混伪品来源信息

样品编号	中文名	拉丁名	数量	样品来源
QX0001SSY	东亚钳蝎	<i>B. martensii</i> Karsch	10	山东泗水野生种群
QX0001SSZ	东亚钳蝎	<i>B. martensii</i> Karsch	10	山东泗水养殖种群
QX0001YSQ	东亚钳蝎	<i>B. martensii</i> Karsch	18	山东沂水前官庄村附近野生种群
QX0001LLY	东亚钳蝎	<i>B. martensii</i> Karsch	11	山东兰陵县卞庄镇龙沂庄村野生种群
QX0001MSY	东亚钳蝎	<i>B. martensii</i> Karsch	8	山东蒙山养殖场种群
QX0001YCY	东亚钳蝎	<i>B. martensii</i> Karsch	15	山西运城平陆县曹川镇下涧村野生种群
QX0001Y CZ	东亚钳蝎	<i>B. martensii</i> Karsch	10	山西运城平陆安铺养殖场种群
QX0001LYY	东亚钳蝎	<i>B. martensii</i> Karsch	13	河南洛阳伊川县鸦岭乡楼子头村野生种群
QX0001HDY	东亚钳蝎	<i>B. martensii</i> Karsch	9	河北邯郸武安县北安乡南安东村野生种群
QX0001YLY	东亚钳蝎	<i>B. martensii</i> Karsch	13	陕西榆林绥德满堂川镇王家沟村野生种群
QX0001YLZ	东亚钳蝎	<i>B. martensii</i> Karsch	12	陕西榆林开源蝎业有限公司王家沟养殖场种群
QX0001NMY	东亚钳蝎	<i>B. martensii</i> Karsch	13	内蒙古呼和浩特清水河县城关镇八龙湾村野生种群
QX0001NXY	东亚钳蝎	<i>B. martensii</i> Karsch	15	宁夏盐池县青山乡海子塘野生种群
QX0001NXZ	东亚钳蝎	<i>B. martensii</i> Karsch	10	宁夏盐池繁衍平蝎子养殖场种群
QX0001LZY	东亚钳蝎	<i>B. martensii</i> Karsch	13	甘肃兰州榆中县冯湾村野生种群
QX0001QHY	东亚钳蝎	<i>B. martensii</i> Karsch	10	青海海南藏族自治州贵德县河西镇园艺村野生种群
DJ0001CYC	家鸡	<i>Gallus gallus domesticus</i>	3	购买自南京月苑菜市场

2.2 COI 基因的 PCR 扩增

用试剂盒提取获得的基因组 DNA, 利用通用引物 (LCOI490: GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG 与 HCO2198: TAAACTTTCAGGGTGACCAAAAAATCA) 进行扩增^[8]。40 μ L PCR 体系中包括: PCR Master Mix 20 μ L, 引物 LCOI490 与 HCO2198 各 1 μ L, DNA 4 μ L 以及去 RNA 无菌水 14 μ L。PCR 循环参数: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 50 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 40 个循环; 4 $^{\circ}$ C 保存。

2.3 琼脂糖凝胶电泳及测序工作

用电子天平称取 1 g 琼脂糖粉, 置于装有 50 mL 1X TAE 溶液的锥形瓶中, 用微波炉加热至完全溶解, 冷却片刻后加入 5 μ L 染料, 摇晃至充分混匀, 倒入胶槽等待其完全冷却凝固。取 3 μ L PCR 扩增产物和 DL2000 DNA Marker 在 2% 的琼脂糖凝胶中电泳分离, 在凝胶成像系统中拍照并保存, 以确定 COI 目的序列被准确扩增。PCR 产物进行双向测序, 由南京金斯瑞生物科技有限公司完成。

2.4 测序数据的拼接及分析

返回的序列数据采用 Chromas 软件打开。样品经送测序完成后均获正向和反向两条序列, 将同正向序列比对, 反向序列进行反向补, 校正结果, 确定序列准确无误。然后在 NCBI 中用 Blast 程序进行相似性检索, 以确定基因片段的准确性。用 Mega 软件对上述序列进行比对。整理所得数据, 采用 NJ (邻接) 法对序列构建一个系统聚类树, 同时再把所有序列用 MEGA 6.06 软件比对并对其进行遗传距离等分析。

3 结果

3.1 东亚钳蝎样本的野外采集及流通市场调研

我们采集的东亚钳蝎正品均为野外采集, 蝎子为昼伏夜出物种, 晚上出来活动及捕食。采样过程: 东亚钳蝎在紫外灯光的照射下发荧光, 很容易辨别, 通常在蝎子容易出没的农村山脚下, 石头缝内容易捕捉到, 采集的样本为东亚钳蝎主产区的大部分范围, 具体的采样地点参见表 1。活体样本放入整理箱内带回南京实验室, 由南京师范大学戴建华教授进行个体鉴定。我国国内蝎子的主要流通方式: 当地农民采集, 每隔几天会有相应的小贩到农民处收

购, 后有更大的商贩再从小商贩手中收购, 最后主要于洛阳中药材市场集散交易, 也有药厂直接从大商贩处定点产地采购, 最终东亚钳蝎被炮制成全蝎饮片进入中药厂或各大药店及中医医院入药使用。

至于混伪品, 全蝎打成粉后呈土黄色, 与鸡肉粉颜色相仿, 通过常规的形态学鉴定往往很难区分, 加上不法商家的一些伪造手段, 导致药材相对混乱。因此亟需一种新的快速鉴定方法, 来鉴定全蝎药材中的混伪品, 继而有效帮助建立良好的全蝎药材市场秩序。

3.2 东亚钳蝎 DNA 提取与 PCR 扩增

实验结果表明, 东亚钳蝎的 COI 基因片段可用通用引物扩增出来, 长度与 DL2000 marker 700 bp 序列相近, 与理论大小 (658 bp) 一致, 且无非特异性扩增 (见图 1)。PCR 产物可用于测序, 测序成功率为 100%。本实验共测序东亚钳蝎正品 310 份, 前期实验凝胶电泳验证东亚钳蝎的 COI 基因片段被成功扩增出来, 且无非特异性条带, 证明引物序列及 PCR 条件稳定可靠, 后续样本 PCR 产物直接送至金斯瑞公司测序。

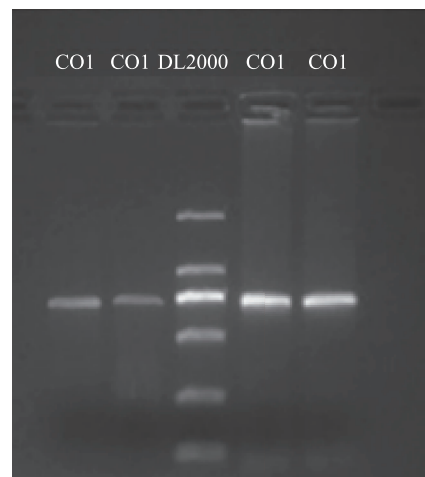


图1 COI 基因 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳鉴定

3.3 全蝎单元型间遗传距离及种群遗传结构分析

本次研究共采集东亚钳蝎正品 310 条序列共有 35 个单元型。35 个全蝎单元型之间的遗传距离在 0.14% ~ 5.42%, 在种内遗传距离范围之内, 表明所分析的个体为同一个种。东亚钳蝎单元型多样性 $H_d = 0.970$, 核苷酸多样性 $P_i = 0.03127$ 。整个种群高的单元型多样性和核苷酸多样性 ($h > 0.5$, $\pi > 0.5\%$) 意味着种群是由多个地方种群混合而成的大

而稳定的群体,或分化支系的二次接触形成。

如表2所示,对不同采集地区的东亚钳蝎进行分析,显示种群内遗传距离范围为0.00%~3.48%。其中种群1(山东泗水野生种群)、种群2(山东泗水养殖场种群)、种群4(山东沂水凤凰养殖场种群)、种群5(山东兰陵野生种群)、种群6(山东蒙山养殖场种群)、种群8(山西平陆安铺养殖场种群)、种群12(陕西榆林开源养殖场种群)内遗传距离在2.56%~3.46%,明显大于其他种群内的遗传距离。东亚钳蝎养殖场种群的遗传距离明显高于其他野生种群,推测为因适应养殖的需要,养殖场对当地捕获的东亚钳蝎与其他地区的优势种进行了杂交,因此其遗传距离明显高于其他野生种群。

3.4 系统发生分析

如图2所示,基于东亚钳蝎COI序列构建分子系统发育树,研究东亚钳蝎物种的进化关系。本次分析同时加入已经报道的东亚钳蝎序列JF700146.1、JF700145.1^[8]和ZGYD0186^[9],已报道的3条序列均涵盖于本研究采样分析的35个单元型中。JF700146.1、

JF700145.1和ZGYD0186序列均可以有效聚类,其中JF700146.1与QX0006MSY(山东蒙山地区)为同一单元型,JF700145.1与QX0003HDY(河北邯郸地区)为同一单元型,ZGYD0186与QX0001LYY(河南伊川地区)为同一单元型。伪品家鸡肌肉粉末(鸟纲)可以很明显地与东亚钳蝎(蛛形纲)正品分开,显示出COI基因在种间鉴定的准确性。基于COI基因的全蝎DNA条形码技术鉴定正伪品有效、可行。在我们的样本采集中,来自宁夏盐池县青山乡海子塘野生种群、山东沂水前官庄村附近野生种群和青海海南藏族自治州贵德县河西镇园艺村野生种群可以聚类在一起;而来自陕西榆林开源蝎业有限公司王家沟养殖场种群、内蒙古呼和浩特清水河县城关镇八龙湾村野生种群及山西运城平陆县曹川镇下涧村野生种群较为离散,分布在不同的分支,显示出该地区东亚钳蝎样本的基因多样性。东亚钳蝎作为地球生物的“活化石”,已在地球上存活超过2亿年,进化上即便相对保守的COI基因,在种内的突变也要显著高于其他物种。

表2 全蝎种群内(对角线值)及种群间遗传距离

	Gp7	Gp8	Gp15	Gp4	Gp10	Gp2	Gp13	Gp5	Gp6	Gp12	Gp1	Gp3	Gp11	Gp14	Gp16	Gp17
Gp7	0.001 8															
Gp8	0.015 8	0.025 6														
Gp15	0.012 6	0.020 9	0.018 5													
Gp4	0.022 4	0.027 5	0.024 2	0.034 6												
Gp10	0.015 0	0.022 6	0.015 8	0.021 5	0.010 3											
Gp2	0.025 7	0.030 1	0.028 9	0.023 5	0.029 7	0.028 0										
Gp13	0.033 2	0.036 7	0.037 7	0.041 0	0.037 7	0.040 5	0									
Gp5	0.031 3	0.034 0	0.035 3	0.036 2	0.036 7	0.031 8	0.045 5	0.032 0								
Gp6	0.032 9	0.035 6	0.037 5	0.038 6	0.040 1	0.035 8	0.048 2	0.029 3	0.029 5							
Gp12	0.030 3	0.026 5	0.034 4	0.034 5	0.036 1	0.035 1	0.043 4	0.035 7	0.036 4	0.031 2						
Gp1	0.033 3	0.036 1	0.038 8	0.041 1	0.040 5	0.036 6	0.048 1	0.029 3	0.024 9	0.037 8	0.030 4					
Gp3	0.035 4	0.037 4	0.039 3	0.041 0	0.039 3	0.034 2	0.049 2	0.029 1	0.037 3	0.039 4	0.035 8	0				
Gp11	0.036 4	0.028 9	0.039 3	0.041 0	0.041 8	0.038 9	0.042 5	0.036 9	0.038 0	0.018 7	0.037 2	0.041 0	0			
Gp14	0.035 6	0.028 4	0.038 5	0.040 1	0.041 3	0.038 1	0.043 3	0.036 5	0.037 9	0.017 9	0.037 5	0.040 2	0.000 8	0.001 5		
Gp16	0.036 4	0.028 9	0.039 3	0.041 0	0.041 8	0.038 9	0.042 5	0.036 9	0.038 0	0.018 7	0.037 2	0.041 0	0	0.000 8	0	
Gp17	0.035 6	0.028 4	0.039 3	0.041 0	0.040 9	0.038 9	0.041 7	0.036 9	0.038 5	0.018 7	0.037 5	0.040 2	0.000 8	0.001 5	0.000 8	0.001 5

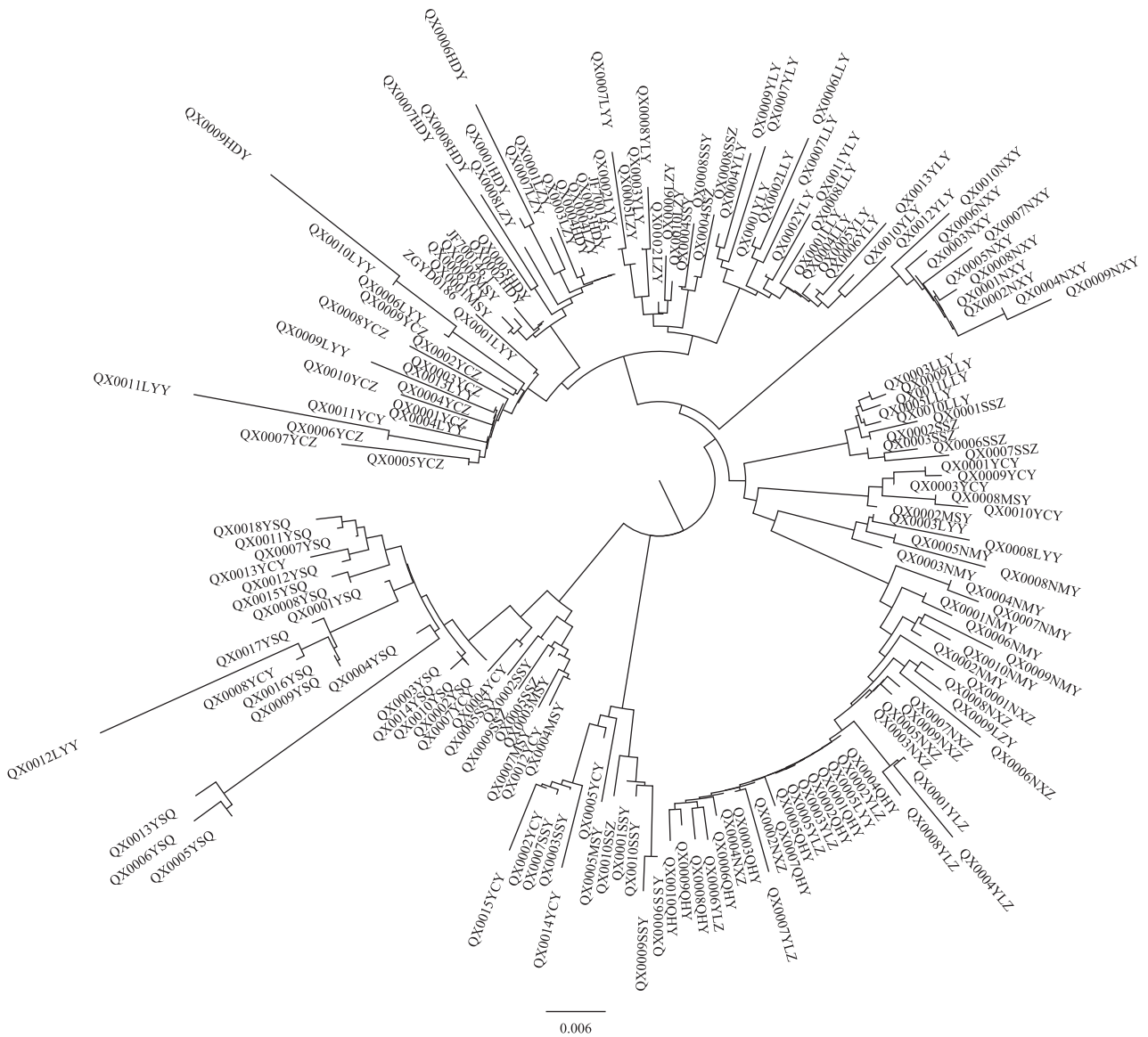


图2 基于 COI 序列构建的全蝎 NJ 树

4 讨论

全蝎是一种名贵的中药材，又名钳蝎、全虫、蝎子，古书上称蚤。在中国产地达十几个省份，有十余种，统称东亚钳蝎。《蜀本草》记载，入药有1100多年的历史，因主要产于沂蒙山区腹地的临朐、沂水、沂源、蒙阴、平邑等县，故名沂蒙全蝎。但是随着我国人口的不断增长以及中药产业的快速发展，全蝎药材市场出现大量的混伪品，比如全蝎打成粉后与鸡肉颜色相仿，通过传统方法很难鉴别。本课题通过野外样本采集，采集了主产区的东亚钳蝎正品，并从市场上购买伪品家鸡鸡肉，通过DNA提取、PCR扩增COI基因，建立基于COI基因的东

亚钳蝎正品数据库；通过数据库比对，很容易将正品全蝎与伪品家鸡进行区分，而且两者相差很大。东亚钳蝎为无脊椎动物蛛形纲下的生物，而家鸡为卵生的脊椎动物，在进化上两者差得较远，通过COI数据库比对很容易进行快速鉴定，可以看出，DNA条形码技术能高效、准确地鉴别中药材全蝎及其混伪品，继而有效帮助建立良好的全蝎药材市场秩序。

参考文献

[1] 孔成诚,张传标,方成武,等.不同提取方法全蝎镇痛、镇静、抗惊厥作用的考察[J].中国医药科学,2012,2(4): 39-41.

(下转第1205页)

- Plant Sci,2016,7(e8613):367.
- [24] 张月云,莫新春,曾维铭,等. 从12S rRNA基因序列差异分析黑斑蛤蚧和红斑蛤蚧的进化关系[J]. 广西医学,2006,28(6):793-796.
- [25] 顾海丰,夏云,徐永莉,等. 中药材蛤蚧的特异性PCR鉴定[J]. 四川动物,2012,31(2):226-231.
- [26] 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.
- [27] 蒋超,赵群,金艳,等. 快速PCR技术鉴别中药材蛤蚧的方法研究[J]. 中国现代中药,2017,19(1):21-25.
- [28] SZYDL P P,MADEJ J P,MAZURKIEWICZ K M. Histology and ultrastructure of the integumental chromatophores in tokay gecko (*Gekko gecko*) (Linnaeus, 1758) skin [J]. Zoomorphology,2017,136(2):233-240.
- [29] 申琳,邹爱英,孟庆安. 蛤蚧的辨析[J]. 天津中医药,2010,27(6):518-519.
- [30] GU H F,XIA Y,PENGA R,et al. Authentication of Chinese crude drug gecko by DNA barcoding. [J]. Nat Prod Commun,2011,6(1):67-71.
- [31] 李力,顾海丰,夏云,等. 蛤蚧及其伪品微型DNA条形码的引物筛选[J]. 时珍国医国药,2011,22(1):202-205.
- [32] LIU Z,WANG Y,ZHOU K,et al. Authentication of Chinese crude drug, *Gecko*, by allele-specific diagnostic PCR [J]. Planta Med,2001,67(4):385-387.
- [33] REN X,FU Y,XU C,et al. High resolution melting(HRM) analysis as a new tool for rapid identification of *Salmonella enterica* serovar Gallinarum biovars Pullorum and Gallinarum[J]. Poultry Sci,2016,96(5):1088-1093.
- [34] SAKARIDIS I,GANOPOULOS I,ARGIRIOU A,et al. A fast and accurate method for controlling the correct labeling of products containing *buffalo* meat using high resolution melting(HRM) analysis[J]. Meat Sci,2013,94(1):84-88.

(收稿日期:2019-03-25 编辑:戴玮)

(上接第1196页)

- [2] WANG Z,LI M,MENG H,et al. Effects of antigliomatin from the scorpion venom of *Buthus martensii* Karsch on chloride channels on C6 glioma cells [J]. Neural Regen Res,2011,6(18):1365-1369.
- [3] MARTIN-EAUCLAIRE M F,ABBAS N,SAUZE N,et al. Involvement of endogenous opioid system in scorpion toxin-induced antinociception in mice[J]. Neurosci Lett,2010,482(1):45-50.
- [4] 吴福林,董庆海,王涵,等. 中药全蝎研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报,2018,20(12):108-111.
- [5] LI M,MENG H,WANG S,et al. Extract from *Buthus martensii* Karsch is associated with potassium channels on glioma cells[J]. Neural Regen Res,2011,6(15):1147-1150.
- [6] 葛贤秀,曹鹏,卢悟广,等. 重组东亚钳蝎镇痛抗肿瘤肽抑制人胆管癌细胞生长作用及其机制研究[J]. 医学研究生学报,2013,26(4):343-347.
- [7] 陈士林,庞晓慧,姚辉. 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):747-754.
- [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] 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,2015:216.

(收稿日期:2019-03-25 编辑:王丽英)