

· 基础研究 ·

穿山甲属动物的 DNA 条形码及在穿山甲
商品鉴定中的应用[△]

李婵, 谢雪那, 蔡炫, 张秋楠, 田恩伟, 晁志*

南方医科大学 中医药学院, 广东 广州 510515

[摘要] 目的: 完善基于 COI 序列的 DNA 条形码鉴定法, 用于穿山甲属动物及其商品药材的分子鉴定。方法: 从穿山甲属动物及穿山甲常见混伪品原动物的鳞甲、肌肉组织或蹄甲中提取 DNA, 扩增 COI 序列并双向测序, 对序列进行 K2P 遗传距离分析、Barcoding gap 检验、单倍型分析、系统发育树的聚类分析、条形码间隙自动检索法 (ABGD) (Automatic barcode gap discovery) 划分。用建立的 DNA 条形码方法对收集的 35 份穿山甲商品进行鉴定。结果: COI 序列扩增成功, 对齐后序列长度为 600 bp。遗传距离分析显示, 种间差异大于种内差异, 物种间具有一定遗传间隔; 系统发育树的聚类分析和 ABGD 划分能够有效鉴别穿山甲及其混伪品。对 35 份甲片商品进行了准确鉴定; 发现近来出现较多的印度穿山甲甲片, 对其进行性状描述。结论: 基于 COI 序列的 DNA 条形码是鉴定穿山甲的有效手段。

[关键词] 穿山甲; DNA 条形码; COI 序列; 商品鉴定

[中图分类号] R282.74; R284; R282.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2019)09-1221-08
doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20190217002

DNA Barcode of Pangolins and Its Application in Identification of Manis Squama Commodities

LI Chan, XIE Xue-na, CAI Xuan, ZHANG Qiu-nan, TIAN En-wei, CHAO Zhi*

School of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

[Abstract] **Objective:** To improve the DNA barcoding method based on COI sequence for molecular identification of pangolin and commercial medicinal materials. **Methods:** DNA was extracted from the scales, muscle tissues or hoofs. COI sequences were amplified and bidirectional sequenced, and the sequences were analyzed by K2P genetic distance analysis, Barcoding gap test, haplotype analysis, phylogenetic tree clustering analysis, and ABGD (Automatic barcode gap discovery). The established DNA barcoding method was used to identify 35 pangolin commodities. **Results:** The COI sequence was amplified successfully, and the aligned sequence length was 600 bp. Genetic distance analysis indicated that the difference between species was greater than the difference within species, and there was a certain genetic interval between species. Phylogenetic tree cluster analysis and ABGD classification can effectively identify pangolin and its adulterants. 35 samples of pangolins were accurately identified. Identification results show that more *Manis crassicaudata* which characters were described appeared in market recently. **Conclusion:** DNA barcoding based on COI sequence is an effective method to identify pangolin.

[Keywords] Manis Squama; DNA barcode; COI; identification

穿山甲为鲛鲤科动物穿山甲 *Manis pentadactyla* Linnaeus 的鳞甲, 始载于《名医别录》^[1], 具通经下乳、消肿排脓、搜风通络之功, 可用于经闭癥瘕、乳汁不通、痈肿疮毒、风湿痹痛、中风瘫痪、麻木拘挛^[2]。现代药理研究表明, 穿山甲在降低血液黏度、升高白细胞、镇痛、抗炎和促使炎症修复等方面也有重要作用^[3]。

穿山甲以白蚁为食, 生活习性特殊, 繁育困难, 迄今未能成功实现人工养殖, 供应完全依赖野生资源。近二三十年来, 由于乱捕滥猎和栖息地的破坏, 野生资源急剧减少, 穿山甲药材的供应量大幅下降, 价格日益增长, 市场上出现从东南亚和非洲走私其他穿山甲属物种的甲片替代入药, 以及多种其他掺假行为^[4]。调查发现, 药材市场上, 中华穿山甲

[△] [基金项目] 公益性行业科研专项(201507002-4-2)

* [通信作者] 晁志, 教授, 研究方向: 中药资源、鉴定与质量评价; Tel: (020)61648764, E-mail: chaozhi@smu.edu.cn

M. pentadactyla、马来穿山甲 *M. javanica*、印度穿山甲 *M. crassicaudata*、南非穿山甲 *M. temminckii*、大穿山甲 *M. gigantea*、树穿山甲 *M. tricuspis* 和长尾穿山甲 *M. tetradactyla* 均有发现^[5-6]。其他用于掺假的有猪、牛、羊的蹄甲等。为保证临床用药的安全有效,有必要对穿山甲的来源进行准确鉴定。

目前,过度捕猎和走私猖獗使穿山甲属所有物种均濒临灭绝。世界自然保护联盟《濒危物种红色名录(2017)》将中华穿山甲和马来穿山甲列为“极度濒危”物种,将其他穿山甲物种列为“濒危”或“易危”物种。2017年,8种穿山甲均被列入《濒危野生动植物种国际贸易公约》(CITES)附录一。穿山甲的准确鉴定也是保护穿山甲的必要条件。

目前,穿山甲常用的鉴别方法为性状鉴别法,某些种类的穿山甲甲片的性状极相似,即使有专业的技术与丰富的经验,也难以对其基原进行准确鉴定。另外有薄层色谱法、红外光谱法、荧光分析法、离子色谱法、高效液相色谱法、高效毛细管电泳法等,这些方法多用在鉴别掺杂穿山甲、塑料制品、猪蹄甲等掺伪品^[6-13]。与上述鉴别方法相比,DNA分子技术不受样品形态、数量等限制,对于其基原鉴定具有独特的优势,因此近年来有不少研究者开始利用DNA分子鉴定法对穿山甲进行研究,如尹艳等^[14]建立了穿山甲特异性多聚酶链式反应(PCR)鉴别方法,邢亚琳等^[15]运用 *cytb* 基因、12S rRNA 基因、随机扩增多态性 DNA 标记(RAPD)引物及微卫星引物对穿山甲进行鉴定等。

DNA 条形码是目前公认可以对生物物种进行准确鉴定的技术。部分研究者应用此方法对穿山甲进行了研究,如邢亚琳^[16]的 DNA 条形码研究中对3种穿山甲进行了分析;贾静等^[17]对中华穿山甲及混伪品猪、牛、羊进行分析,但均缺乏对穿山甲属所有种及混伪品的全面分析。鉴于我国药材市场穿山甲来源复杂多样,利用DNA条形码技术鉴别穿山甲药材的基原,了解其商品流通的情况,对加强其质量控制具有一定的意义。因此,为进一步充实穿山甲DNA条形码鉴定的内容,本研究基于COI序列探讨DNA条形码鉴定穿山甲属及其他混伪品的可行性。

1 材料与方法

1.1 仪器

高速冷冻离心机(HC-3018R,安徽中科中佳科学仪器有限公司);电热三用水箱(BOS2,北京市医

疗设备厂);电泳仪(DYY-6C,北京市六一仪器厂);多功能暗箱式紫外分析仪(CBIO-UV6A1,北京赛百奥科技有限公司);分析天平(ALC-210.4,ACCULAB);自动振荡器(MX-S,SCILOGEX);PCR仪(2720,Applied Biosystem);Nanodrop 分光光度计(ND2000C,Thermo Fisher Scientific);迷你笔型电磨笔(18 V,上海辰灵贸易有限公司)。

1.2 试剂

琼脂糖(VetectM REAGENT grade Sigma-Aldrich, 111860);无水乙醇(天津市大茂化学试剂厂,20180801);Proteinase K(TIANGEN BIOTECH, R6830);血液/细胞/组织基因组DNA提取试剂盒(离心柱型)(TIANGEN BIOTECH, R6725);SuperRed/GelRed(Biosharp, 68110160);D2000(TIANGEN BIOTECH, MD114);6×DNA loading buffer(TIANGEN BIOTECH, R6116);2×Taq PCR MasterMix(TIANGEN BIOTECH, R6525)。

1.3 材料

本研究收集了中华穿山甲及其混伪品共计11个物种38份样品,并从NCBI上下载了37条序列(均经质量检验,以确定下载序列与物种对应关系的准确性^[18-19]),具体信息详见表1~2。中华穿山甲来自广州市野生动物救护中心。实验样品均经广州市野生动物救护中心邹洁建工程师和作者鉴定。另外,从各地药店及药企收集了35份穿山甲生甲片商品,具体商品信息详见表3。

1.4 方法

1.4.1 DNA提取 穿山甲甲片和蹄甲类伪品用无水乙醇浸泡12 h,每3 h将乙醇换一遍,同时通过振荡器轻轻振荡清洗;之后以去离子水重复以上步骤。在60℃烘干,在紫外灯下正反面分别各照射灭菌30 min。^[16]然后用已灭菌的刀片刮去角质层的外层污染,取内层,用小型电磨机磨成细粉。取细粉约0.2 g,在裂解步骤中加500 μL GA、100 μL 二硫苏糖醇(DTT)^[20]、50 μL 蛋白酶K,56℃水浴过夜,12 000 r·min⁻¹离心2 min后取上清液,其余步骤按照血液/细胞/组织基因组DNA提取试剂盒(TIANGEN)说明书步骤提取样品DNA。

舌头及其他肌肉组织取约25 mg,按照血液/细胞/组织基因组DNA提取试剂盒(TIANGEN)说明书步骤提取样品DNA。

表 1 穿山甲及其混伪品样品信息

种名	部位	数量	样品编号	样品来源
中华穿山甲 <i>M. pentadactyla</i>	鳞甲	3	ST01、ST02、ST03	广州市野生动物救护中心
马来穿山甲 <i>M. javanica</i>	舌头	7	MS1 ~ MS7	肇庆市野生动物救护中心
	舌头	9	S1 ~ S9	广州市野生动物救护中心
	鳞甲	3	C1 ~ C3	广州市野生动物救护中心
印度穿山甲 <i>M. crassicaudata</i>	鳞甲	4	S101 ~ S104	中量药业
树穿山甲 <i>M. tricuspis</i>	鳞甲	1	SH1	中量药业
大穿山甲 <i>M. gigantea</i>	鳞甲	1	F1	中量药业
猪 <i>Sus scrofa domesticus</i>	蹄甲	2	Z1、Z2	广东省广州市
	肌肉	1	Z3	广东省广州市
山羊 <i>Capra hircus</i>	蹄甲	1	Y1	青海省西宁市
绵羊 <i>Ovis aries</i>	蹄甲	1	Y2	青海省西宁市
水牛 <i>Bubalus bubalis</i>	蹄甲	1	SN1	广东省广州市
黄牛 <i>Bos taurus</i>	蹄甲	2	HN1、HN2	广东省广州市
牦牛 <i>B. grunniens</i>	蹄甲	2	MN1、MN2	青海省西宁市

表 2 GenBanK 下载的穿山甲及其混伪品的序列信息

种名	数量	GenBanK 登录号
中华穿山甲 <i>M. pentadactyla</i>	13	JN411577、MG196307、KT445978、LC145059、KT428153、KT428152、KT428151、KT428150、KT428149、KC690309、KC690308、KC690307、KC690306
树穿山甲 <i>M. tricuspis</i>	2	MG196298、KJ192848
大穿山甲 <i>M. gigantea</i>	2	KJ192837、MG196303
菲律宾穿山甲 <i>M. culionensis</i>	3	NC 036434、MG196308、KX356690
南非穿山甲 <i>M. temminckii</i>	3	MG196300、MF536687、MF536686
长尾穿山甲 <i>M. tetradactyla</i>	3	MG196299、KX012678、KX012679
山羊 <i>C. hircus</i>	2	MH229952、LS992662
绵羊 <i>O. aries</i>	2	KU681224、KU681223
水牛 <i>B. bubalis</i>	2	KX758402、KX758351
黄牛 <i>B. taurus</i>	1	HQ860420
牦牛 <i>B. grunniens</i>	1	KX859289
黄羊 <i>P. przewalskii</i>	3	KC679051、KC679048、KC679046

表 3 穿山甲商品信息表

数量	编号	来源
31	A101 ~ A131	北京三和药业
1	B101	广东省珠海市万生药业有限公司
1	B102	云南省昆明市福林堂药业
1	B103	山西省长治国大万民药房
1	B104	山东菏泽

1. 4. 2 PCR 扩增及测序 采用 COI 序列通用引物 MCOI-F(CAACAAATCACAAAGACATCGG)、MCOI-R(TTCTGGGTGTCCGAAAAATCA)^[16], 对提取的 DNA 进行 PCR 扩增。扩增程序: 95 ℃ 5 min; 94 ℃ 30 s, 50 ℃ 1 min, 72 ℃ 1 min, 35 个循环; 72 ℃ 10 min。PCR 反应体积为 15 μL, 包含 6 μL 2 × *Taq* PCR Mix (TIANGEN), 正反向引物各 0. 5 μL [生工生物工程

(上海)股份有限公司], 模板 DNA 2 μL , ddH₂O 6 μL 补足体积至 15 μL 。实验中设置无 DNA 模板的空白对照组。将 PCR 扩增产物送至上海美吉生物医药科技有限公司进行双向测序。

1.4.3 序列分析 用 DNASTAR 软件中的 Seqman 对所得序列进行拼接, 去除引物区, 并对碱基进行人工校对。将所有序列在 MEGA (6.0 版本) 中对齐后, 分析序列碱基组成和变异位点。

1.4.4 单倍型分析 用 DNAsp v5 软件对 COI 序列进行单倍型分析, 并计算中华穿山甲的平均核苷酸多样性 (π)^[21], 将中华穿山甲中数量最多的序列规定为核心单倍型, 其他序列则为稀有单倍型。以正品核心单倍型为标准序列, 以稀有单倍型和其之间的相似度为正品的相似度范围, 考察伪品所有单倍型与正品核心单倍型的相似度范围, 确定正品的相似度鉴别指标。

1.4.5 种内、种间遗传距离分析及 Barcode gap 分析 将所有序列用 MEGA 软件进行 K2P (Kimura 2-parameter) 遗传距离分析。并利用 TAXON DNA/Species identifier 软件计算种内及种间遗传距离的分布频率, 并在 Excel 中画出频率分布直方图, 进行条形码间隙 (barcode gap) 分析^[22]。

1.4.6 系统发育树的聚类分析 在 MEGA 软件中用邻接法 (neighbor joining method, NJ) 构建系统聚类树。系统树各分支的置信度用自举检验法 (bootstrap test), 检验各分支的支持率, 共进行 1000 次循环。

1.4.7 ABGD 划分 ABGD (Automatic barcode gap discovery) 基于遗传距离对样品进行划分, 划分在同一组的样品被认定为是一个种^[23]。将样品对齐的序列在线提交到 ABGD 网站 (<http://www.wabi.snv.jussieu.fr/public/abgd/abgdweb.htm>), 参数设置为: 种内差异先验值 (prior intraspecific divergence) P

为 0.001 到 0.1, 最小相对 gap 宽度值 (Minimum relative gap width) X 为 1.0 (K80)。

1.4.8 商品的鉴定 基于穿山甲及其混伪品的 COI 序列的单倍型信息及物种信息建立比对数据库, 穿山甲商品序列可通过 DNAMAN 软件与自建穿山甲条形码数据库中的序列进行比对, 从而确定商品的物种。通过邻接法与数据库的序列构建系统聚类树, 系统树各分支的置信度用自举检验法 (bootstrap test), 检验各分支的支持率, 共进行 1000 次循环。并用 ABGD 划分法对商品序列与数据库序列一起进行划分, 参数设置与 1.2.7 一致。

2 结果

2.1 DNA 条形码特征

2.1.1 COI 序列碱基组成和变异位点 测序结果拼接且去除引物后得到 658 bp 的序列, 所有序列对齐后长度为 600 bp, 其中变异位点有 232 个, 碱基 T、C、A、G 平均含量分别为 28.9%、27.6%、26.8%、16.7%。其中 A + T 含量 (55.7%) 明显高于 G + C 含量 (44.3%), 核苷酸碱基构成的偏倚是线粒体蛋白质编码基因的一个显著特征。

2.1.2 单倍型分析 穿山甲及其混伪品的 75 条 600 bp 的 COI 序列, 分为了 45 种单倍型。中华穿山甲不同来源样品序列有 16 条, 种内变异位点有 12 个, GC 含量为 0.44 ~ 0.45, 共获得 6 种单倍型 (Hap1 ~ Hap6)。中华穿山甲 COI 基因片段的平均核苷酸多样性 (π) 为 0.003 78, 单倍型多样性 (H_d) 为 0.743。COI 基因片段中, 正品的稀有单倍型与其核心单倍型之间的相似度为 98.83% ~ 99.67%, 而伪品所有单倍型与正品核心单倍型的相似度为 79.50% ~ 95.17%。表 4 和图 1 显示了中华穿山甲的单倍型类型及核心单倍型的序列。

表 4 中华穿山甲单倍型类型

单倍型类型	位置/bp											
	24	60	111	138	267	300	325	378	498	534	540	600
Hap1	G	A	G	C	G	A	G	C	C	A	T	A
Hap2	G	A	G	T	G	A	G	C	T	A	T	A
Hap3	G	G	A	T	A	A	G	T	T	G	C	G
Hap4	G	A	G	T	G	G	G	C	C	A	T	A
Hap5	A	A	G	T	A	A	G	C	T	A	T	A
Hap6	A	A	G	T	A	A	A	C	T	A	T	A

1	TTAAGCCTAC	TAATTCGCGC	TGAGCTAGGT	CAACCTGGGA	CTCTCCTAGG
51	AGATGATCAA	ATCTACAATG	TAATCGTCAC	CGCACATGCA	TTCGTAATGA
101	TCTTCTTAT	GGTCATACCA	ATTATAATTG	GTGGCTTTGG	AAACTGACTA
151	GTGCCCCTAA	TGATTGGAGC	TCCTGACATG	GCATTCCCCC	GTATAAATAA
201	CATAAGTTTC	TGACTACTCC	CCCCTTCCTT	CCTACTCCTC	CTAGCCTCTT
251	CCATAATTGA	AGCTGGGGCC	GGGACAGGAT	GAAGTGTATA	TCCTCCCCTA
301	GCAGGAAACT	TAGCACATGC	AGGAGCATCA	GTAGACCTAA	CCATTTTTTC
351	CCTCCACTTA	GCAGGTATTT	CCTCAATCCT	AGGGGCTATT	AATTTTATCA
401	CAACTATCAT	CAACATAAAA	CCCCCAGCAA	TAAACCAATA	CCAAACTCCA
451	CTGTTCGTGT	GATCAGTCCT	AATTACAGCC	GTACTTCTAC	TACTATCTCT
501	ACCCGTACTA	GCCGCCGGCA	TCACCATACT	ACTAACCGAT	CGCAACCTAA
551	ATACAACCTT	TTTGGACCCT	GCTGGAGGGG	GGGACCCTAT	TCTATATCAA

图1 中华穿山甲核心单倍型(Hap2)序列

2.1.3 种内及种间遗传距离分析 穿山甲及其混伪品的种内遗传距离为0~0.012, 种内平均遗传距离为0.003 7, 最大值出现在南非穿山甲 *Manis temminckii*。种间遗传距离值为0.044~0.334, 种间差异净值的最小值出现在马来穿山甲 *M. javanica* 与菲律宾穿山甲 *M. culionensis* 之间, 为0.044; 最大值出现在猪 *Sus scrofa domesticus* 与黄羊 *Procapra przewalskii* 之间, 达到了0.334。种间平均遗传距离为0.255, 远大于Hebert所推荐的物种鉴定最小种间遗传距离0.020^[24-25]。种间平均遗传距离约为种内平均遗传距离的69倍, 说明COI序列能够对穿山甲及其混伪品进行有效的鉴定。

2.1.4 Barcode Gap 检验 Barcode gap 检验结果(见图2)显示, 穿山甲及其混伪品的种内遗传距离为0%~2%, 种间遗传距离>3%, 存在GAP区, 即种内遗传距离最大值<种间遗传距离最小值, 说明穿山甲及其混伪品的COI序列具有较高的种内稳定性和种间差异性, 具有一定的遗传间隔。

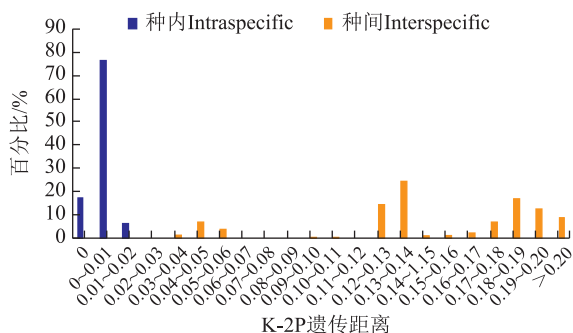


图2 种内和种间遗传距离的分布

2.1.5 系统发育树的聚类分析 由邻接法构建的系统聚类树(见图3)可知, 中华穿山甲与其他混伪品均单独聚为一支, 支持率均大于95%, 各物种可以

区分开。其中, 这75条序列分成了2大支系, 为穿山甲属和其他混伪品。穿山甲属又分成了2个支系: 第一个支系为产于亚洲的种类, 即马来穿山甲、菲律宾穿山甲、印度穿山甲、中华穿山甲, 这个支系中又分为2个支系, 马来穿山甲与菲律宾穿山甲聚为一支, 印度穿山甲与中华穿山甲聚为一支。第二个支系为产于非洲的大穿山甲、南非穿山甲、树穿山甲、长尾穿山甲, 在这个支系中也出现2个分支, 大穿山甲、南非穿山甲为一分支, 树穿山甲、长尾穿山甲为另一分支。

2.1.6 基于距离的分类分析 用ABGD对75个样品进行划分, 结果包括初始划分和递归划分2种情况(见图4): 初始划分较稳定, 75个样品被分成12组。递归划分把75个样品分成1~31组; *P*值介于0.01~0.03时, 75个样品被稳定地划分成15个组; 这15个分组分别代表了研究的15个物种, 与聚类分析结果呈一一对应关系(见图3)。

2.2 穿山甲商品的鉴定

35批穿山甲甲片商品COI序列与自建的穿山甲条形码数据库比对结果见表5。在商品序列与自建数据库的序列通过邻接法构建的系统聚类树中, A114、B103与中华穿山甲聚为一支; A101~A113、A115、A116、A130与印度穿山甲聚为一支; A117~A128、B101、B104与马来穿山甲聚为一支; A129、B102与大穿山甲聚为一支; A131与树穿山甲聚为一支。同样地, ABGD递归划分将35个样品分别划分进中华穿山甲组(A114、B103)、马来穿山甲组(A117~A128、B101、B104)、印度穿山甲组(A101~A113、A115、A116、A130)、大穿山甲组(A129、B102)和树穿山甲组(A131)。3种方法结果一致。

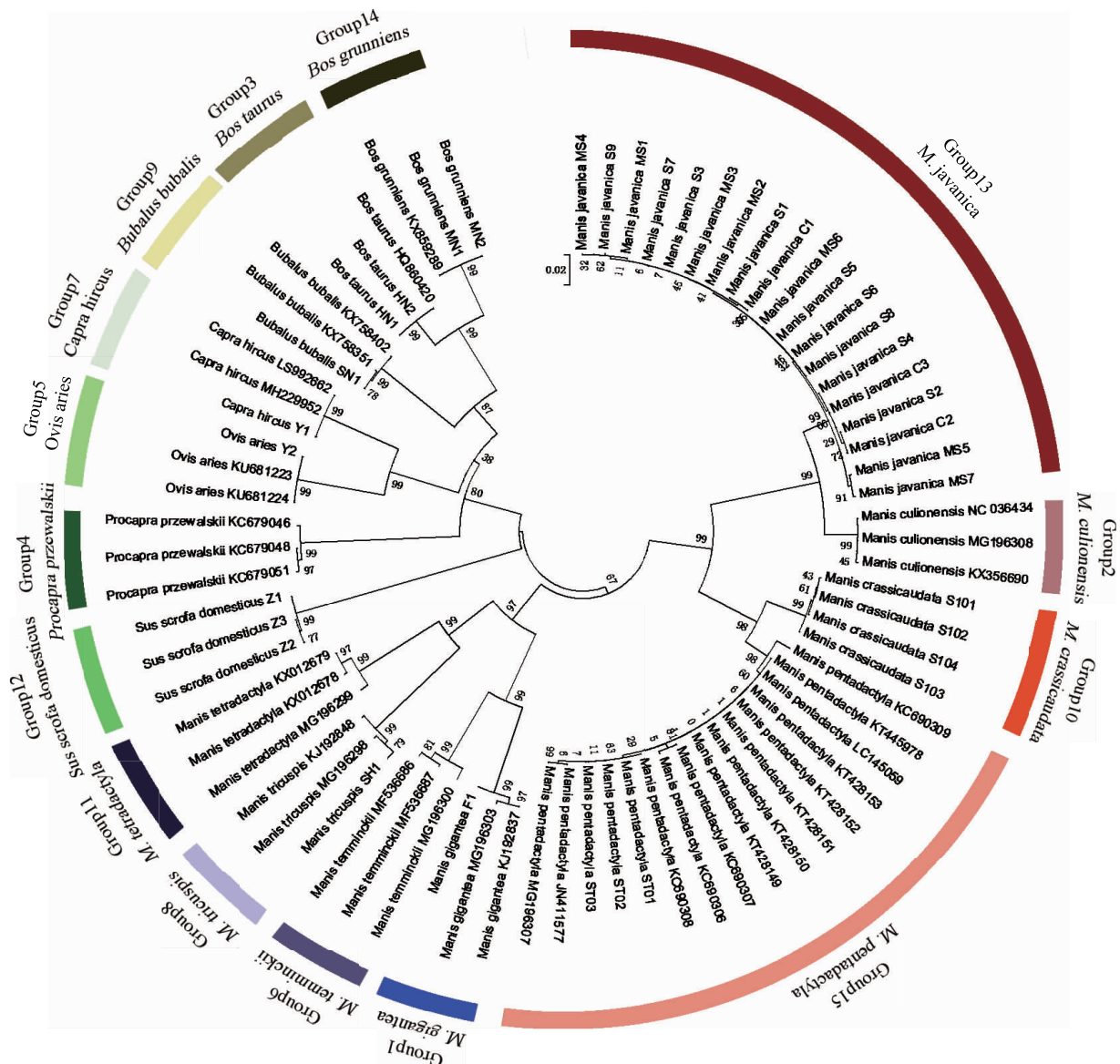


图3 基于 COI 序列构建中华穿山甲及其混伪品的 NJ 树及 ABGD 递归划分结果

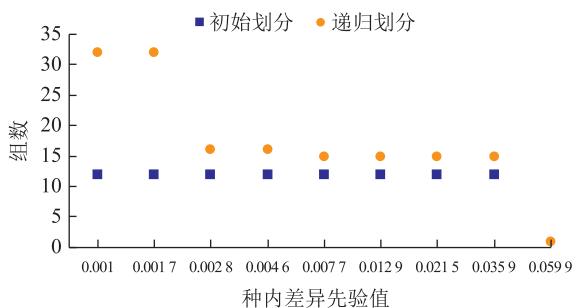


图4 75个样品的 ABGD 划分结果

综合以上结果可知, 35 份穿山甲商品中, 仅有 A114 与 B103 为中华穿山甲 (5.7%), 其他样品均为伪品。其中, 以印度穿山甲 (45.7%)、马来穿山甲 (40%) 为最多。

2.3 印度穿山甲甲片性状特征

印度穿山甲甲片 (见图 5) 因生长部位不同, 形状大小也不一致。一般多呈扇面形, 长 1.8 ~ 6.2 cm, 宽 2.1 ~ 6 cm, 厚 1.76 ~ 4.66 mm。甲片外表呈褐色。背面宽端较厚, 窄端较薄, 中央较厚, 边缘较薄。边缘圆滑整齐或被磨损, 有的有皮肉残留。背面有多数纵向排列的线纹及在靠近顶端边缘的地方会有数条横线纹, 背面的窄端较光滑, 常有零乱与砂石摩擦的痕迹。内表面色较浅, 中部有一条明显突起的弓形横向棱线, 其下方有数条与棱线相平行的细纹, 偶有残留油脂飞边或毛, 纵向凸起纹理的面向上隆起呈弧形。角质质地较轻 (平均密度为 $1.57 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$), 半透明。气微腥, 味淡。

表5 35批穿山甲甲片商品比对结果

编号	比对结果	数量	相似度/%
A101 ~ A113、A115、A116、A130	印度穿山甲 <i>Manis crassicaudata</i>	16	99 ~ 100
A117 ~ A128、B101、B104	马来穿山甲 <i>Manis javanica</i>	14	99 ~ 100
A114、B103	中华穿山甲 <i>Manis pentadactyla</i>	2	99
A129、B102	大穿山甲 <i>Manis gigantea</i>	2	99 ~ 100
A131	树穿山甲 <i>Manis tricuspis</i>	1	99

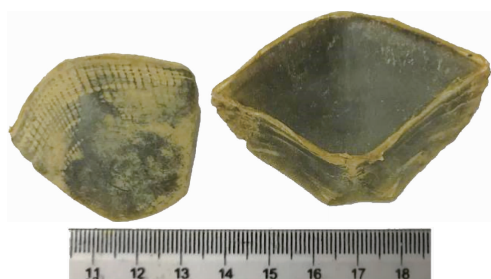


图5 印度穿山甲甲片

3 讨论

成功 DNA 提取是分子鉴定的基础。穿山甲甲片及混伪品蹄甲为高度角质化的材料,一般方法难以提取 DNA。在本研究中,曾尝试用结合酶消化的酚-三氯甲烷法提取^[24],耗时近一周;而用 DTT 结合试剂盒^[26]的方法提取,仅需 1 d 即可提取成功。前者提取的 DNA 浓度高于后者,但因后者效率更高且扩增效率也好,最终选择 DTT 结合试剂盒的方法进行提取。在 DNA 提取之前,甲片及蹄甲应用无水乙醇浸泡消毒,再用无菌水浸泡,充分烘干后在紫外灯下照射消毒。在取样时,需刮去甲片及蹄甲表层,取内层,否则容易出现外源 DNA 的污染的情况,影响测序结果甚至出现扩增出菌的现象。

本研究利用 COI 通用引物对穿山甲及其混伪品的 DNA 进行扩增,均得到了 100% 的扩增效率与测序效率。采用 Kimura-2-parameter 模型计算遗传距离,发现种间平均遗传距离为种内平均遗传距离的 69 倍,满足种间差异是种内差异的 10 倍的条件,并且种间最小遗传距离大于种内最大遗传距离。Barcoding gap 检验表明,穿山甲及其混伪品的 COI 序列具有一定的遗传间隔。

从构建的 NJ 树可以看出,15 个物种 75 份样品均得到了较好的区分,各物种形成相对独立的支。其中,产于亚洲的穿山甲物种和产于非洲的穿山甲物种形成两个明显的分支,说明亚洲产穿山甲和非洲产穿山甲有明显分化,亲缘关系较远,将其区分成不同的属是合适的。亚洲支和非洲支又分别形成两

个分支,即中华穿山甲与印度穿山甲、马来穿山甲与菲律宾穿山甲、大穿山甲与南非穿山甲、树穿山甲与长尾穿山甲。在新的分类系统中,穿山甲属仅包括 4 种亚洲产穿山甲。其中中华穿山甲与印度穿山甲能爬树,但主要营地栖生活,有观点将两者列为指名亚属 *Manis*; 马来穿山甲和菲律宾穿山甲均倾向树栖,后者以前一直作为前者的亚种,2005 年才上升为独立的种;两者为另一亚属 *Paramanis*。大穿山甲和南非穿山甲形体大,地栖,几乎不上树,在新的分类系统中归属于地穿山甲亚属,或另立地穿山甲属 *Smutsia*。树穿山甲和长尾穿山甲则为树栖,基本不下地,分别代表树穿山甲亚属 *Phataginus* 和长尾穿山甲亚属 *Uromanis*,或组成树穿山甲属 *Phataginus*^[26]。

ABGD 法是一种基于 barcode gap 对序列进行分类的方法,它的优点是快速、简单,即便出现种内和种间遗传距离分布重叠的现象,也可以对数据集进行有效的划分^[23]。在本研究中将 ABGD 法作为对数据分类的一种补充方法,与聚类分析结合,可为分类结果的正确性提供支持,使得研究更加完善。用 ABGD 法进行划分,初始划分只能对 80% (12/15) 的物种进行解析。在递归划分中,*P* 值介于 0.01 ~ 0.03 时,为较可靠的分组^[22];本研究中,15 个物种在 *P* 值为 0.01 ~ 0.03 时,得到了稳定的划分,结果与形态鉴定结果、聚类分析结果呈对应关系。

综合以上结果可知,基于 COI 序列的 DNA 条形码是穿山甲属物种鉴定的有效手段,能够为穿山甲的快速鉴定提供可靠依据。

近年来已有穿山甲 COI 条形码研究的报道^[14-17]。本研究中,除增加了大穿山甲实体样本外,更为重要的是建立的数据库中包含了目前全球穿山甲属物种所有的 COI 单倍型序列。另外,采取了序列相似性分析、系统发育树构建和 ABGD 递归划分 3 种方法进行综合鉴定。全面的数据库和综合鉴定手段,提高了穿山甲的鉴定效率和准确性。

应用 DNA 条形码的方法在穿山甲商品的鉴定中发现正品穿山甲甚少,主流商品为马来穿山甲和印度

穿山甲。印度穿山甲以前较少报道,目前市场上逐渐增多。我们对印度穿山甲的性状特征进行了详细描述,发现其与中华穿山甲、马来穿山甲在形态上极为相似(树穿山甲和大穿山甲有比较明确的性状鉴别特征^[6])。我们又对3种穿山甲甲片密度进行了测定,发现马来穿山甲、印度穿山甲、中华穿山甲的平均密度分别为1.49、1.57、1.60 g·cm⁻³;马来穿山甲质地较轻,而印度穿山甲与中华穿山甲的质地接近。虽然三者从性状上难以区分,但用DNA条形码可准确鉴定其基原。

基于COI序列的DNA条形码鉴别方法,可从分子水平实现对穿山甲的有效鉴定,为穿山甲的市场监管、打击非法贸易及保护穿山甲资源提供技术支持,具有重要的实用价值。目前,这种方法在市售鹿茸粉、僵蚕、海马等药材中也取得了成功,说明DNA条形码技术在动物药商品鉴定中是行之有效的,值得推广应用^[27-29]。

参考文献

- [1] 陶弘景. 名医别录[M]. 北京:人民卫生出版社,1986:285.
- [2] 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,2015:268.
- [3] 杨熙东. 穿山甲的药理作用和临床应用[J]. 中国社区医师(医学专业),2012,14(26):194.
- [4] 郭珊珊,彭建军,刘双,等. 中国境内野生穿山甲现状及相关非法贸易概况[J]. 重庆师范大学学报(自然科学版),2019,36(1):1-6.
- [5] 刘逊,朱纓,胡芳,等. 濒危物种穿山甲的商品调查及其基源鉴定[J]. 亚太传统医药,2015,11(15):35-36.
- [6] 吴芝园,巢建国,刘逊. 四种穿山甲属动物的生药学研究[J]. 现代中药研究与实践,2015,29(2):25-28.
- [7] 谭永梅,刘冠军,孙光娟,等. 豕甲与穿山甲成分薄层分析对比试验[J]. 世界最新医学信息文摘,2017,17(60):36-37,48.
- [8] 汪冶,高春花,肖聪颖. 掺硫酸镁穿山甲洗脱后不能作正品入药[J]. 时珍国医国药,2007,18(7):1623-1624.
- [9] 石尚友,黄淑君,邓顺超. 对穿山甲与混淆品猪蹄甲快速鉴别方法探讨[J]. 中医药导报,2017,13(11):73.
- [10] 许重远,张焜,李亦蕾,等. 高效毛细管蛋白电泳法对鸡内金和穿山甲的鉴别[J]. 解放军药科学,2007,23(6):464-466.
- [11] 陈林,温家欣,刘潇潇,等. HPLC结合LC-MS/MS法快速检测穿山甲中掺加的12种黄色色素[J]. 中成药,2017,39(3):556-560.
- [12] 刘潇潇,李雪,张丽丹,等. 离子色谱法检测穿山甲饮片 中非法掺加硫酸盐或盐酸盐增重[J]. 药学研究,2018,37(1):27-29.
- [13] 刘灿黄,张继,康帅,等. 中国穿山甲、非洲树穿山甲及伪制品的鉴别研究[J]. 中药材,2014,37(7):1178-1182.
- [14] 尹艳,刘逊,王兵,等. 中药穿山甲的DNA分子鉴定研究[J]. 中国中药杂志,2017,42(11):2078-2084.
- [15] 邢亚琳,彭建军,胡慧建,等. 穿山甲标本和甲片的DNA提取及PCR扩增[J]. 动物学杂志,2013,48(1):49-57.
- [16] 邢亚琳. 穿山甲标本、甲片的DNA提取及mtDNA分子鉴定标记研究[D]. 北京:中国科学院大学,2013.
- [17] 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.
- [18] 陈源源,沈微,樊游,等. Genbank数据库中微生物rDNA序列准确性研究[J]. 食品与发酵工业,2012,38(3):28-31.
- [19] SANDERSON M, BOSS D, CHEN D, et al. The PhyLoTA Browser: Processing GenBank for Molecular Phylogenetics Research [J]. Systematic Biol, 2008, 57(3):335-346.
- [20] 张小慧,席啸虎,王世伟,等. 角类动物药DNA提取方法研究[J]. 中草药,2017,48(24):5242-5246.
- [21] LIBRADO P, ROZAS J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data [J]. Bioinformatics, 2009, 25(11):1451-1452.
- [22] MEYER C P, PAULAY G. DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling [J]. PLoS Biology, 2006, 3(12):e422.
- [23] PUILANDRE N, LAMBERT A, BROUILLET S, et al. AB-GD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation [J]. Mol Ecol, 2012, 21(8):1864-1877.
- [24] HEBERT P D, CYWINSKA A, BALL S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes [J]. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 2003, 270(1512):313-321.
- [25] HEBERT P D, RATNASINGHAM S, DEWAARD J R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit I divergences among closely related species [J]. Proc Biol Sci, 2003, 270(Suppl1):S96-S99.
- [26] GAUDIN T, EMRY R, WIBLE J. The Phylogeny of Living and Extinct Pangolins (Mammalia, Pholidota) and Associated Taxa: A Morphology Based Analysis [J]. J Mammal Evol, 2009, 16(4):235-305.
- [27] 贾静,石林春,徐志超,等. 市售鹿茸粉药材的DNA条形码鉴定[J]. 药科学,2015,50(10):1356-1361.
- [28] 贾静,石林春,姚辉,等. 市售动物药材僵蚕的DNA条形码鉴定研究[J]. 药科学,2016,51(11):1784-1790.
- [29] 蒋超,刘富艳,金艳,等. 基于形态和DNA序列分析的海马类药材商品基原调查[J]. 中国中药杂志,2018,43(23):4553-4561.

(收稿日期:2019-02-17 编辑:王笑辉)