

鹿血的 PCR-RFLP 鉴定研究

王凤霞^{1,2}, 陈媛媛², 任贵奇², 王春民^{2*}

1. 承德医学院 河北省中药研究与开发重点实验室, 河北 承德 067000

2. 颈复康药业集团有限公司 河北省中药新辅料工程技术研究中心, 河北 承德 067000

摘要: **目的** 建立鹿血聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性 (PCR-RFLP) 种间及种内鉴定方法并确定检测限度。**方法** 根据梅花鹿、马鹿、猪、牛、羊、鸭的细胞色素 b (cytb) 基因序列的差异, 设计并选取 DNA 限制性内切酶 *EcoRV* 和 *MseI* 分别作为区分鹿和非鹿, 梅花鹿和马鹿的工具。采用试剂盒法提取样品基因组 DNA, 经 PCR 扩增 cytb 片段后, 分别进行 RFLP 分析; 在梅花鹿血基因组 DNA 中分别加入不同比例非鹿类动物血基因组 DNA 或马鹿血基因组 DNA, PCR 产物用限制性内切酶 *EcoRV* 和 *MseI* 进行切割, 确定检测限。**结果** 经 PCR-RFLP 分析, *EcoRV* 切割鹿和非鹿 cytb 片段, 前者得到 2 个片段 (287、185 bp), 后者未被切割; *MseI* 切割梅花鹿与马鹿 cytb 片段, 前者被切成 2 个片段 (281、191 bp), 后者被切成 3 个片段 (281、126、65 bp), 191 bp 的片段作为梅花鹿血的特征片段, 126 bp 的片段作为马鹿血的特征片段。梅花鹿血中加入非鹿类动物血基因组 DNA 的检测限为 3%, 加入马鹿血基因组 DNA 的检测限为 6%。**结论** 建立的 PCR-RFLP 方法可以快速鉴定鹿血及相关伪品或掺伪品, 也可区分鉴定梅花鹿源的鹿血或马鹿源的鹿血, 为鹿血相关产品的质量控制提供了新的技术手段。

关键词: 鹿血; 梅花鹿; 马鹿; 细胞色素 b; 限制性内切酶; PCR-RFLP

中图分类号: R282.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)08-1914-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.08.027

Identification of deer blood by PCR-RFLP method

WANG Feng-xia^{1,2}, CHEN Yuan-yuan², REN Gui-qi², WANG Chun-min²

1. Institute of Chinese Materia of Chengde Medical College, Chengde 067000, China

2. Jingfukang Pharmaceutical Group, Chengde 067000, China

Abstract: Objective To establish a polymerase chain reaction coupled with restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method which can identify deer blood. **Methods** We analyzed DNA sequences of cytochrome b (cytb) from different species (i.e. sika deer, red deer, pig, ox, sheep, and duck) and selected two DNA restriction enzymes of *EcoRV* and *MseI* to distinguish deer from other species and to sika deer from red deer, respectively. Genomic DNA of every sample was extracted by blood genomic DNA extraction kit. After PCR of cytb fragment, digestion by *EcoRV* or *MseI* was conducted and the results were analyzed. The capacity of this method to identify different proportional blood mix from different species also was determined. **Results** Using the PCR-RFLP method, *EcoRV* digestion made two fragments of 287 bp and 185 bp in deer, but no digestion in other species; *MseI* digestion made two fragments of 281 bp and 191 bp in sika deer, but three fragments of 281 bp, 126 bp, and 65 bp in red deer. The 191 bp fragment was a characteristic marker of sika deer, and the 126 bp was for red deer. The minimum detected proportion added to blood of deer with other sample was 3%, 6% of sika deer with red deer. **Conclusion** A PCR-RFLP method according to the sequences of cytb gene is established. This method can identify the blood of sika deer rapidly and conveniently.

Key words: deer blood; *Cervus nippon* Temminck; *Cervus elaphus* Linnaeus; cytb; restriction enzymes; PCR-RFLP

鹿血系鹿科动物梅花鹿 *Cervus nippon* Temminck 或马鹿 *C. elaphus* Linnaeus 的血液, 具有养血益精、行血祛瘀、消肿等功效。因资源稀缺, 致使一些伪品出现, 表现为用其他种类动物血替

代鹿血, 或者在鹿血中掺入其他动物血液等^[1], 也有以马鹿血冒充梅花鹿血的现象。性状鉴定、显微鉴定、理化鉴定等传统中药鉴定方法在血液类中药的鉴定中有一定的局限性, 因此, 鹿血的鉴定和质

收稿日期: 2017-12-03

作者简介: 王凤霞 (1987—), 女, 在读硕士, 研究方向为分子生药学。Tel: 18803042550 E-mail: 952115681@qq.com

*通信作者 王春民 (1968—), 男, 主任中医师, 研究方向为中药的新技术与新应用。Tel: 13603140779 E-mail: 13603140779@139.com

量评价需要新的技术方法。分子鉴定快速、准确，是传统鉴定方法的有效补充，蛇类（乌梢蛇和蕲蛇）药材分子鉴别法成为《中国药典》2015 年版收录的第 1 个中药分子鉴定方法^[2-3]。近些年，分子鉴别技术已经在很多动植物鉴定中得到了成功应用，如陈士林等^[4-5]用分子鉴别技术对植物的研究；鹿源类中药材的鉴定研究也有相关报道^[6-8]。

2003 年加拿大学者 Hebert 等提出 DNA 条形码 (DNA barcoding)，并选择线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 I (COI) 作为动物种属鉴定的首选片段^[9-10]。虽然 COI 作为动物条形码鉴定标签片段的研究已有很多报道^[11-17]，但是 COI 序列并非适用于所有动物的鉴定，在 94.1% 的腔肠动物中，COI 序列之间的差异均小于 2%，说明 COI 不适合鉴定该类群^[18]。本研究初期对鹿血及非鹿类动物血提取的 COI 基因进行序列扩增，部分样品得到的结果不稳定，经实验最终选择了线粒体细胞色素 b (cytochrome b, *cytb*) 作为研究的目的基因^[19-21]。本研究采用聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性 (PCR-RFLP) 法^[22-28]分析鹿血及非鹿类 (猪、牛、羊、鸭) 血液 *cytb* 基因的特异性，为鹿血的真伪及掺伪鉴定提供依据。

1 材料与仪器

1.1 材料

梅花鹿血和马鹿血购自河北省承德市承德县鹿养殖场，非鹿类动物血 (猪血、牛血、羊血、鸭血) 购自市场，经 COI、*cytb* 基因片段测序确认；Blood & Cell Culture DNA Mini Kit (25) 试剂盒 (QIAGEN, 货号 13323)；限制性内切酶 *EcoRV*、*MseI* 及 DNA Marker (New England Biolabs 公司)；DNA 聚合酶 (Genstar 公司, 2× Hotstart Taq PCR StarMix, A033-101)；引物 *cytb*、COI (华大基因)；Mighty TA-cloning Kit、A-overhang mixture (Takara 公司)。

1.2 仪器

Sub-cell GT 型 BIO-RAD 电泳仪、Gel DocTM XR 型 BIO-RAD 照胶仪、S100™ Thermal Cycler 型 BIO-RAD PCR 仪 (TOYOBO 公司, 日本)；Eppendorf 型 Centrifuge 5424 离心机 (张家港市九洲特种离心机制造有限公司)。

2 方法

2.1 血液基因组 DNA 提取

严格按照试剂盒 (QIAGEN, 货号 13323) 说

明书进行。

2.2 *cytb* 基因片段的 PCR 扩增及测序

以“2.1”项下提取的基因组 DNA 为模板，*cytbF* 和 *cytbR* 为引物^[29] (通用引物序列 *cytbF*: 3'-TACCATGAGGACAAATATCATTCTG-5'; *cytbR*: 3'-CCTCCTAGTTTGTAGGGATTGATCG-5')，PCR 扩增。扩增体系：Genstar 聚合酶 (1 U/μL) 5 μL，上下游引物各 0.2 μL，模板 DNA 0.3 μL，加灭菌去离子水至总体积为 10 μL，共 7 个 10 μL PCR 体系。扩增条件：94 °C 预变性 3 min 后，94 °C、30 s，57 °C、30 s，72 °C、1 min，34 个循环，72 °C 延伸 5 min，4 °C 保存。

取上述 PCR 产物 2 μL 用 1.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 结果，剩余 68 μL 用试剂盒 (TianGen, 货号 04217) 进行纯化，连接到 pMD20-T 载体 (Takara, 货号 AK4602)，并转化到 DH5α 感受态细胞中，LB Amp⁺ 平板培养基 (Tryptone 10 g、Yeast Extract 5 g、NaCl 10 g 去离子水配制 1 L)，37 °C 恒温箱中培养 16 h，挑取阳性克隆，放入 400 μL LB Amp⁺ 液体培养基中 37 °C 振荡培养 2 h。重组子经菌液 PCR 检测后，由华大基因测序。

2.3 限制性内切酶的选择

用 NEB Cutter 2.0 (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>) 软件分析“2.2”项下得到的序列，找到鹿血区分非鹿类血及梅花鹿血区分马鹿血特有的酶切位点，示意图见图 1。

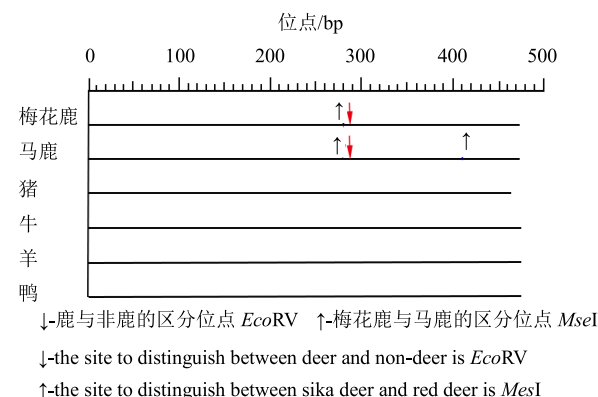


图 1 不同物种中限制性内切酶位点的选择示意图

Fig. 1 Schematic representation of target sites of selected restriction enzymes in different species

2.4 PCR 产物的 RFLP 分析

2.4.1 PCR-RFLP 法区分梅花鹿血、马鹿血及非鹿类动物血基因组 DNA 限制性内切酶 *EcoRV* 切割鹿血和非鹿类动物血基因组 DNA 的 PCR 产物，10

μL 体系中含 PCR 产物 $2\ \mu\text{L}$, $0.3\ \mu\text{L}$ *EcoRV* 酶, $1\ \mu\text{L}$ $10\times\text{Buffer}$, $6.7\ \mu\text{L}$ 灭菌去离子水, 混匀, 放入 $37\ ^\circ\text{C}$ 恒温箱中 $1\ \text{h}$, 切割产物用 3.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。同法 *MseI* 切割梅花鹿血和马鹿血基因组 DNA 的 PCR 产物。

2.4.2 PCR-RFLP 法分析鹿血基因组 DNA 中掺入非鹿类动物血基因组 DNA 的检测限 采用 DeNovix 型号超微量紫外可见分光光度计 (DS-11+) 测定提取的基因组 DNA 浓度, 并稀释至相似浓度且 A_{260} 在 $0.1\sim 1.0$ 。

(1) 在鹿血基因组 DNA 中加入 $10\%\sim 90\%$ 非鹿类动物血基因组 DNA, 混匀, 经 PCR 扩增, 按照“2.4.1”项下步骤用 *EcoRV* 切割及电泳检测。

(2) 根据项“2.4.2 (1)”项下的结果, 在鹿血基因组 DNA 中加入 $1\%\sim 9\%$ 非鹿类动物血基因组 DNA, 混匀, 进行 PCR。按照“2.4.1”项下步骤用 *EcoRV* 切割及电泳检测。

(3) 同法分析梅花鹿血基因组 DNA 中掺入马鹿血基因组 DNA 的检测限。且所有的实验独立重复 3 次以上。

3 结果与分析

3.1 限制性内切酶选择结果

PCR 扩增后, 得到各样品 *cytb* 基因通用序列长度: 梅花鹿血 $472\ \text{bp}$ 、马鹿血 $472\ \text{bp}$ 、猪血 $463\ \text{bp}$ 、牛血 $473\ \text{bp}$ 、羊血 $473\ \text{bp}$ 、鸭血 $473\ \text{bp}$ 。经软件分析, 找到鹿血区别于非鹿血的酶切位点 *EcoRV*: 前者基因序列被切成大小为 287 、 $185\ \text{bp}$ 的 2 个片段, 后者基因未被切开; 梅花鹿区别于马鹿的位点为 *MseI*: 前者基因序列被切成大小为 281 、 $191\ \text{bp}$ 的 2 个片段, 后者被切成大小为 281 、 126 、 $65\ \text{bp}$ 的 3 个片段。结果见图 1。

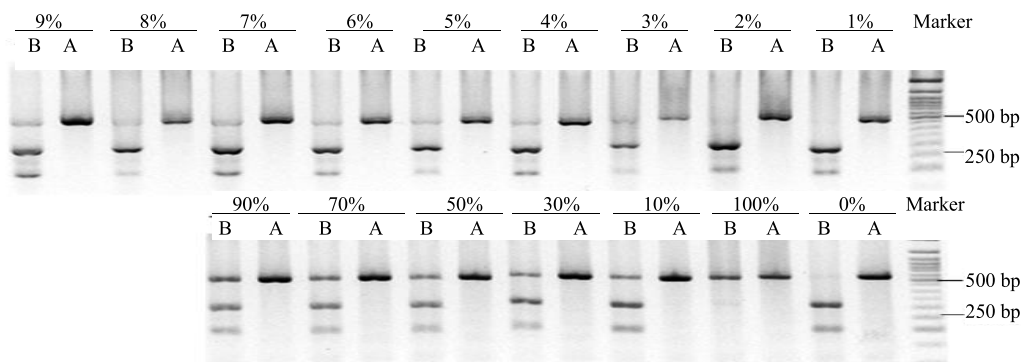


图 3 鹿血基因组 DNA 中加入不同比例非鹿血基因组 DNA 酶切结果

Fig. 3 Results of *EcoRV* digestion in different proportional mix by non-deer blood genomic DNA

3.2 限制性内切酶 *EcoRV* 切割鹿血和非鹿血基因组 PCR 产物结果

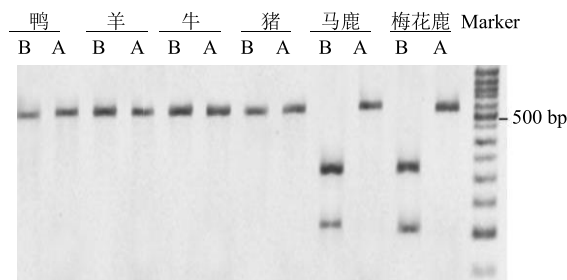
经 *EcoRV* 切割后, 鹿血基因组被切为 2 个片段 (287 、 $185\ \text{bp}$), 非鹿血基因组未被切开, 与“3.1”项下软件分析结果一致。结果见图 2。

3.3 鹿血基因组 DNA 中加入不同比例非鹿类基因组 DNA 酶切结果

由图 3 可知在鹿血基因组 DNA 中加入的非鹿血 (猪、牛、羊、鸭的结果相似, 未一一列出) 基因组 DNA 少于 3% 时, *EcoRV* 切割后只有大小为 $287\ \text{bp}$ 和 $185\ \text{bp}$ 的 2 条带 (鹿血), 在 $500\ \text{bp}$ 左右处未见明显条带, 即未能检测到样品中的非鹿血 DNA。

3.4 限制性内切酶 *MseI* 切割梅花鹿血和马鹿血基因组 PCR 产物结果

经 *MseI* 切割后, 梅花鹿血和马鹿血基因组 DNA 分别得到 2 条带 (281 、 $191\ \text{bp}$) 和 3 条带 (281 、 126 、 $65\ \text{bp}$), 与“2.1”项下软件分析结果一致 (图 4)。



A-PCR 产物 B-限制性内切酶切割产物, 下同
A-results of PCR B-results of restriction enzymes digestion, same as below

图 2 不同样品 *EcoRV* 酶切割结果

Fig. 2 Results of *EcoRV* digestion in different samples

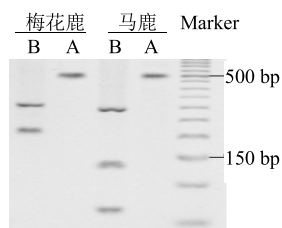


图 4 *MseI* 切割梅花鹿血和马鹿血基因组 DNA
Fig. 4 Results of *MseI* digestion in different samples

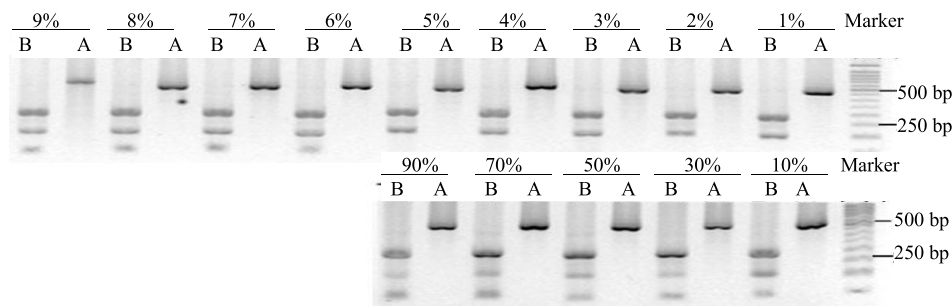


图 5 梅花鹿血基因组 DNA 中加入不同比例马鹿血基因组 DNA 酶切结果
Fig. 5 Results of *MseI* digestion in different proportional mix between deer blood genomic DNA

中加入的非鹿类动物基因组 DNA 比例小于 3%，或者加入的马鹿血基因组 DNA 的比例小于 6% 时，此方法将无法鉴别。

4 讨论

市售掺伪鹿血是加入一定比例的其他动物血液，但由于本实验中购买的几种血液含水量、杂质等有差异，等量的血液用同一个试剂盒在相同的试验条件下提取基因组 DNA，其含量差别较大，所以在鹿血中直接加入不同比例的非鹿类或者不同基原鹿血互掺，然后提取基因组 DNA，将无法准确定量各血液基因组 DNA 的含量。本试验采用先单独提取不同血液的基因组 DNA 并稀释至浓度相近，然后在基因组 DNA 加入不同比例其他血液基因组 DNA 的方法进行试验，所以本研究得到的检测限度是否适用于血液直接掺伪，还需进一步验证。

鹿血为梅花鹿和马鹿的血液，从经济学角度考虑，市场上只存在以马鹿血代替梅花鹿血的情况，故只做了梅花鹿血基因组 DNA 中加入马鹿血基因组 DNA 的检测限度，未做马鹿血基因组 DNA 中加入梅花鹿血基因组 DNA 检测限度的研究。

PCR-RFLP 方法虽已在生物鉴定中广泛应用，但其也存在一定的局限性，比如一些序列更改：单点突变、替换，以及目标序列中的缺失都可能导致限制位点的缺失，从而得到不正确的结果；另外，也有学者认为设计和建立一种 PCR-RFLP 方法需要

3.5 梅花鹿血基因组 DNA 中加入不同比例马鹿血基因组 DNA 切割结果

由图 5 可知，在梅花鹿血基因组 DNA 中加入的马鹿血基因组 DNA 少于 6% 时，*MseI* 切割后，只有 281 bp 和 191 bp 处的 2 条带（梅花鹿），即未能检测到样品中的马鹿 DNA。

上述结果可得出，方法 PCR-RFLP 可区分不同基源的鹿血及非鹿类血液，但在梅花鹿基因组 DNA

进行基因以及限制酶的种类和数量的选择，此过程比较繁琐^[26,30]。

本研究结果有一定的局限性。实验结果表明，在梅花鹿血中掺入马鹿血液及常见的猪、牛、羊、鸭的血液可被检测出，对于其他掺伪来源的血液能否被检出，需要收集更多样品来验证；*cytb* 是线粒体基因，为母系遗传基因，若采集血液的动物是杂交品种，本方法只能检测到母系基因组 DNA，则检测结果存在误差。

参考文献

- [1] 李欢霞, 邢秀梅, 杨福合, 等. 鹿产品检测的研究进展 [J]. 中国畜牧医, 2012, 39(5): 164-169.
- [2] 黄璐琦, 袁媛, 袁庆军, 等. 中药分子鉴定发展中的若干问题探讨 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(19): 3663-3667.
- [3] 陈士林, 郭宝林, 张贵军, 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.
- [4] 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.
- [5] 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): 747-754.
- [6] 白根本, 张林源, 刘春生, 等. 鹿源类中药材 DNA 序列分析及马鹿和梅花鹿的 PCR 鉴定 [J]. 中草药, 2006,

- 37(10): 1566-1569.
- [7] 刘向华, 王义权, 周开亚, 等. 鹿类中药材的位点特异性 PCR 鉴定研究 [J]. 药学学报, 2001, 36(8): 631-635.
- [8] 黄璐琦, 袁媛, 蒋超, 等. 一种基于 PCR-RFLP 鉴定中药材鹿茸的方法: 中国, CN 105176988 A [P]. 2015-12-13.
- [9] 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.
- [10] Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L, *et al.* Biological identifications through DNA barcodes [J]. *Proc R Soc Lond Ser B Biol Sci*, 2003, 270(1512): 313-321.
- [11] Ratnasingham S, Hebert P D N. BOLD: The Barcode of life data system (www.barcodinglife.org) [J]. *Mol Ecol Notes*, 2007, 7(3): 355-364.
- [12] Hajibabaei M, Janzen D H, Mburns J, *et al.* DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(4): 968-971.
- [13] Hebert P D N, Hpenton E, Mburns J, *et al.* Tenspecies in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptesfulgerator* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(41): 14812-14817.
- [14] 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.
- [15] Helmychowski K, Cracraft J. Recovering phylogenetic signal from DNA sequences: Relationships within the corvine assemblage (class aves) as inferred from complete sequences of the mitochondrial DNA cytochrome-b gene [J]. *Mol Biol Evol*, 1993, 10(6): 1196-1214.
- [16] Hubert N, Hanner R, Holm E, *et al.* Identifying canadian freshwater fishes through DNA barcodes [J]. *PLoS One*, 2008, 3(6): e2490.
- [17] Li D Z, Gao L M, Li H T, *et al.* Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants [J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2011, 108(49): 19641-19646.
- [18] 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.
- [19] Hebert P D N, Atnasingham S R, Waard J R D. Barcoding animal life: Cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 270(1): 96-99.
- [20] 黄璐琦, 唐仕欢, 李军德, 等. 动物药材分子鉴定研究策略 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(3): 234-236.
- [21] 汪琦, 钟金城, 柴志欣, 等. 三江黄牛 mtDNA Cytb 基因序列多态性及其系统进化分析 [J]. 中国畜牧杂志, 2016, 52(15): 20-27.
- [22] 林万华, 高军, 陈克飞, 等. 猪 MyoG 基因的 PCR-RFLP 多态性分析 [J]. 遗传, 2003, 25(1): 22-26.
- [23] 隆沂峰, 杨丽媛, 廖万金. 利用 PCR-RFLP 技术鉴定传粉榕小蜂隐种混合样品的物种组成 [J]. 生物多样性, 2010(4): 414-419.
- [24] 宋凤雅, 梁鹏, 何其光, 等. 应用 PCR-RFLP 技术分析橡胶林土壤真菌种群动态变化 [J]. 西南农业学报, 2014(6): 2469-2477.
- [25] 徐耀辉, 焦新安, 胡青海, 等. 鸡白痢和鸡伤寒沙门氏菌的 PCR-RFLP 分子鉴别 [J]. 扬州大学学报, 2005, 26(1): 1-4.
- [26] Kang J M, Lee J, Kim T I, *et al.* PCR-RFLP for rapid subtyping of plasmodium vivax Korean isolates [J]. *Korean J Para*, 2017, 55(2): 159.
- [27] Khan S N, Khan A, Khan S, *et al.* PCR/RFLP-based analysis of genetically distinct plasmodium vivax population of pvmsp-3 α and pvmsp-3 β genes in Pakistan [J]. *Malaria J*, 2014, 13(1): 355.
- [28] Li X, Zeng W, Liao J, *et al.* DNA Barcode-Based PCR-RFLP and diagnostic PCR for authentication of JinqianBaihua She (*Bungarus parvus*) [J]. *Evid Based Compl Alter Med*, 2015, 2015(402820): 1-7.
- [29] Verma S K, Singh L. Novel universal primers establish identity of an enormous number of animal species for forensic application [J]. *Mol Ecol Notes*, 2003, 3(1): 28-31.
- [30] Mandakovic D, Glasner B, Maldonado J, *et al.* Genomic-based restriction enzyme selection for specific detection of piscirickettsiasalmonis by 16 S rDNA PCR-RFLP [J]. *Front Microbiol*, 2016, 7(e19135): 643.