

## • 综 述 •

## 线粒体 DNA 标记在动物类药材分子鉴定中的应用进展

陈 梦, 方 昀, 程汝滨, 黄 真, 张光霁, 陈建真\*

浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 311402

**摘 要:** 动物类中药材是中华医药宝库中重要的组成部分, 药用历史悠久, 功效显著。随着野生动物资源的破坏和日益增长的市场需求, 动物类药物中混伪品掺杂现象时有发生, 为其临床应用带来了安全隐患。线粒体 DNA 因其严格的母系遗传特征和丰富的遗传多样性, 被广泛应用于动物群体遗传、谱系生物地理和系统发育等研究领域。近年来, 线粒体 DNA 标记在动物类药材分子鉴定中的应用日益广泛, 并取得了丰硕的成果, 为动物类药物的质量控制提供了技术保障。对 COI、Cyt b、12S rRNA 等线粒体 DNA 标记在动物类药材分子鉴定中的应用现状进行总结, 结合课题组前期的研究结果, 对线粒体 DNA 分子标记技术在动物类药材鉴定中的后续应用开发进行了展望, 以期为我国药用动物资源的合理利用提供参考和借鉴。

**关键词:** 线粒体 DNA; 动物类药材; COI 基因; Cyt b; 12S rRNA; 分子鉴定

**中图分类号:** R282.1

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0253-2670(2018)13-3134-09

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.13.027

## Application progress on mitochondrial DNA markers in identification of animal medicinal materials

CHEN Meng, FANG Yun, CHENG Ru-bin, HUANG Zhen, ZHANG Guang-ji, CHEN Jian-zhen

College of Pharmaceutical Science, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 311402, China

**Abstract:** Animal medicinal materials are important parts of traditional Chinese medicine (TCM) with a long history and remarkable efficacy. Due to the destruction of wild animal resources and increasingly market demands, the adulterations of animals medicinal materials have become more common in medicine market and bring security risks for clinical application. In recent years, mitochondrial DNA is widely used in the field of animal population genetics, phylogeography, and phylogenetic development due to its maternally inherited features and abundant genetic diversity, and has achieved fruitful results in the field of molecular identification, which provides technical support for quality control of animal medicinal materials. This paper summarizes the application value and research status of COI, Cyt b, and 12S rRNA in the identification of animal medicinal materials, and gives a brief discussion on the follow-up development of mtDNA marker technique in the identification of animal medicinal materials in combination with previous result, which provides technical support for reasonable utilization of medicinal animal resources.

**Key words:** mitochondrial DNA; animal medicinal materials; COI gene; Cyt b; 12S rRNA; molecular identification

动物类药材在我国有着悠久的历史, 具有品种丰富、资源广泛、药性峻猛、疗效显著等特点, 是中华医药宝库中重要的组成部分。《中国药典》2015 年版收载动物类药材有 90 余种<sup>[1]</sup>。近年来由于资源的破坏和市场需求的增加, 多种动物药材的药源紧缺, 市场上药材掺伪现象时有发生, 致使其质量良莠不齐, 药材的真伪鉴别工作变得愈加重要。

动物类药材由于外观性状相似, 市场混伪品繁多, 多以炮制品和药材粉末形式流通, 传统的形态和显微鉴别方法对操作人员的经验有较高要求, 结果的重现性和稳定性较低, 动物类药材仅依靠传统的鉴别方法已无法满足市场监管的需求<sup>[2]</sup>。分子鉴定技术 (molecular identification technique) 作为中药材传统鉴别方法的有益补充, 具有准确性高、重复性

收稿日期: 2018-03-16

基金项目: 国家中医药管理局公益性行业科研专项经费项目 (201507002-4-4)

作者简介: 陈 梦 (1993—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药开发研究。

\*通信作者 陈建真 (1965—), 女, 教授, 研究方向为中药活性成分研究与新药开发。Tel: (0571)61768149 E-mail: chjz102@aliyun.com

好和经验要求低的特点,近年来在中药材鉴定领域得到了长足的进步和发展,其中DNA条形码技术(DNA barcode technology)作为生物鉴定技术的最新发展,在中药鉴定领域受到了广泛关注与应用<sup>[3]</sup>。

线粒体是真核生物细胞中参与能量生产、代谢和体内平衡的半自主细胞器,线粒体DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)作为生物体内的核外遗传物质,具有进化速度快、结构简单和严格母系遗传等特点,被广泛应用于动物群体遗传、谱系生物地理和系统发育等研究领域,也是动物类药物分子鉴定过程中的重要DNA条形码来源。本文对mtDNA条形码在动物类药材分子鉴定中的应用现状进行系统综述,梳理了mtDNA标记在药材鉴定中的优势与不足,结合课题组前期的研究结果,对mtDNA分子标记在动物类药材鉴定中的应用前景和后续方向进行了展望,以期为我国动物类药材的合理高效利用提供参考和技术支撑。

## 1 mtDNA的结构特点

线粒体是真核生物细胞内基本且重要的自主性细胞器,其通过氧化磷酸化为真核细胞提供超过95%的能量,参与体内重要的代谢途径,发挥着细胞凋亡、信号转导调控等生化功能<sup>[4]</sup>。多细胞动物的线粒体基因组一般都较小,编码结构稳定,长度在15~20 kb,大多数动物的线粒体基因组为共价闭合环状双链DNA,易于获得相关的序列信息<sup>[5]</sup>。动物的线粒体基因组中碱基的使用节约、编码效率高、蛋白质编码基因无内含子<sup>[6]</sup>。mtDNA的序列分为编码区和非编码区,编码区包括13个蛋白编码基因,2个rRNA(12S、16S rRNA)和22个tRNA;非编码区是D-loop区和轻链复制起始区。线粒体基因组依据碱性氯化铯密度梯度离心中双链密度不同分为重(H)链和轻(L)链,其中蛋白编码基因ND6和8个tRNA基因由L链编码,其余基因基本都由H链编码,各基因间排列紧密,非编码序列比例小<sup>[7-8]</sup>。mtDNA具有很高的进化速率,研究表明mtDNA进化速率是单拷贝核DNA的5~10倍<sup>[9]</sup>,在不同物种间具有丰富的遗传差异,加之线粒体基因扩增的稳定性和可重复性较好,非常适合用于研究种、属、科、目间系统发育关系和生物物种种属鉴定的分子标记<sup>[10]</sup>,近年来在动物药材的分子鉴定中得到广泛的应用。

## 2 mtDNA在动物类药材鉴定中的应用

动物的mtDNA由于具有长度小、易于获取、进

化速率快和序列数据库信息丰富等优势,是研究物种遗传、系统进化和分子鉴定的理想工具<sup>[11]</sup>。动物类药材的分子标记可针对线粒体不同的基因片段的保守序列片段,设计通用引物后,利用各种通用的引物进行PCR扩增测序后,再根据已知的序列信息进行比对分析。在动物类药材中研究和应用较多的mtDNA条形码基因包括cytochrome oxidase I(COI)、cytochrome b(Cyt b)、12S rRNA和D-loop区等<sup>[12-13]</sup>。目前已通过mtDNA标记鉴定的动物药材包括以下几种:地龙*Pheretima*、水蛭*Hirudo*等虫类药材;蛤壳*Meretricis Concha*、珍珠母*Margaritifera Concha*等介类药材;乌梢蛇*Zaocys dhumnades* (Cantor)、蛤蚧*Gekko gecko* Linnaeus等蛇蜥类药材;穿山甲*Manis pentadactyla* Linnaeus、鹿茸*Cervi Cornu Pantotrichum*、鳖甲*Trionycis Carapax*等角甲类药材;麝香*Moschus*、蛇胆等囊胆类药材;海龙*Syngnathus*、海马*Hippocampus*等海洋药物类药材<sup>[2]</sup>。

### 2.1 COI基因及其应用

COI基因全称为细胞色素C氧化酶亚基1, Hebert等<sup>[11]</sup>发现COI基因5'端的一段序列能够对动物界的物种进行有效鉴定,且在多数动物类群中,COI基因都存在显著的序列变异,其进化速率较快,可用于分析和鉴定亲缘关系密切的种、亚种及地理种群之间的关系。基于线粒体COI基因的DNA条形码鉴别技术已得到了研究者们的广泛认可。张辉等<sup>[14]</sup>选取《中国药典》2015年版中的麝香、蛤蚧、海龙、海马、蟾酥*Bufonis Venenum*、全蝎*Buthus martensii* Karsch及水蛭等45种动物药材,通过分析样品COI序列的种内和种间变异情况、barcoding gap和鉴定效率,考察了COI序列鉴定动物药材的有效性和准确性,研究结果表明COI序列作为DNA条形码适用于《中国药典》中动物药材的鉴定。Luo等<sup>[15]</sup>采用线粒体COI基因对72个角甲类动物药材基因序列进行分析,通过构建系统发育树证实马鹿*Cervus elaphus* Linnaeus、麋鹿*Elaphurus davidianus* Milne、梅花鹿*C. Nippon Temminck*和鳖甲等分别独立地聚为一支,COI序列可有效地对它们进行区分。杜鹤等<sup>[16]</sup>对中华鳖*Pelodiscus sinensis* Wiegmann及其混伪品的COI序列进行研究,证实COI条形码可以作为中华鳖及其混伪品分子鉴定的有效手段。针对市场上穿山甲药材的掺伪现象,贾静等<sup>[17]</sup>以COI条形码为标准序列对穿山甲进行分

析,结果表明应用DNA条形码技术可以有效区分穿山甲正品及其混伪品,为市场监管提供了新的技术手段。陈静等<sup>[18]</sup>从赛加羚羊 *Saiga tatarica* Linnaeus 及藏原羚 *Procapra picticaudata* Hodgson、蒙原羚 *P. gutturosa* Pallas、鹅喉羚 *Gazella subgutturosa* Guldenstaedt 羊角样品中提取DNA,运用巢式PCR扩增技术获得了349 bp长度的COI片段,分析结果表明COI基因序列能够准确区分赛加羚羊角及其混淆品。刘冬等<sup>[19]</sup>通过COI基因对市场上所出售的40种鹿类药材进行序列分析,研究发现其中22种为非药典规定基原物种,药材市场中鹿类药材来源复杂,基于COI序列的DNA条形码分子鉴定技术可以作为鹿类药材鉴定的有效方法。Cao等<sup>[20]</sup>对17药用蛇类的51个样本的COI基因进行扩增,发现COI序列在种内、种间存在显著的barcoding gap,系统进化树(NJ)序列分析表明COI基因能够将乌梢蛇与其混伪品进行有效区分。Gu等<sup>[21]</sup>利用COI基因中的150 bp微型条形码作为标准序列,对蛤蚧及其伪品进行研究,发现蛤蚧类药材的种内最大变异率为4%,种间最小变异率为33.5%,种内最大变异率远远小于种间最小变异率,说明COI条形码能够用于蛤蚧及其伪品的鉴别。张红印等<sup>[22]</sup>利用COI条形码为标记,对蜈蚣 *Scolopendra subspinipes mutilans* L. Koch 及其混伪品进行研究,结果表明蜈蚣药材与其混伪品种间平均K2P距离为0.222,种间最小K2P距离为0.190,基于COI条形码序列可以准确鉴定蜈蚣及其混伪品。蛤蟆油 *Ranae Oviductus* 作为名贵动物药及滋补品,其混伪品较多,王孟虎等<sup>[23]</sup>利用基于COI序列的DNA条形码技术对东北林蛙、中国林蛙 *Rana temporaria chensinensis* David、桓仁林蛙 *R. huanrensis* Fei, Ye & Huang、黑龙江林蛙 *R. dybowskii* Gunther 进行扩增和测序,建立了4种林蛙COI基因数据库,计算K2P遗传距离并构建NJ系统聚类树,结果表明COI基因能够准确鉴定蛤蟆油的基原动物。杜鹤等<sup>[24]</sup>利用COI序列对麝香及其常见混伪品共7种12份样品进行鉴别,结果表明运用COI条形码序列能够准确鉴定麝香的正品来源及其混伪品。

## 2.2 Cyt b 基因及其应用

Cyt b 基因在动物线粒体基因组中编码细胞色素b,其进化速度适中,有一定的保守性,Cyt b 序列片段在种内个体间的序列差异很小,而种间的序列差异较大,是研究动物的群体遗传结构和分子鉴

定的理想标记序列<sup>[25]</sup>。Casey等<sup>[26]</sup>对包含4种海马基原动物的22个物种的Cyt b 基因进行扩增和测序,基于Cyt b 序列构建系统进化树分析,结果表明线纹海马 *Hippocampus kelloggi* Jordan et Snyder、三斑海马 *H. trimaculatus* Leach、刺海马 *H. histrix* Kaup 可与其他海马相互区分。蕲蛇 *Agkistrodon* 作为一种珍贵的动物药材,其药材来源复杂,依据形态对其进行真伪鉴别具有一定的难度,唐晓晶等<sup>[27]</sup>采用Cyt b 通用引物对蕲蛇及7种常见伪品进行序列扩增和测序后,基于Cyt b 的序列间差异设计了一对用于蕲蛇鉴定的特异引物,建立了一种准确、简便的蕲蛇药材DNA分子标记鉴别方法。Li等<sup>[28]</sup>利用Cyt b 引物对貂 *Martes zibellina* L. 心与其伪品鸡、鸭、鹅、兔心等样品进行PCR扩增后测序,依据序列差异设计一对专用于貂心的高特异性鉴别引物,利用该引物对样品DNA模板进行扩增,貂心可扩出310 bp条带,而伪品没有出现特异性条带,从而达到快速鉴别貂心真伪的目的。鸡内金 *Gallus Gigerhii Endothelium Corneum* 作为传统的中药,其来源为雉科动物家鸡的干燥沙囊内壁,但目前市场上有较多的伪品。曲萌等<sup>[29]</sup>根据Cyt b 基因设计家鸡及其常见伪品的差异序列引物,利用该引物分别扩增家鸡、3种伪鸡内金原动物和4种非伪鸡内金原动物的DNA,结果表明所设计的引物只扩增家鸡DNA,而不扩增其他伪品动物DNA,证实基于Cyt b 基因的特异引物可用于鸡内金药材的鉴定。Yang等<sup>[30]</sup>从Cyt b 序列上设计特异性引物,证实其可用于鉴别蛤蟆油基原动物中国林蛙及其8种伪品。张丽等<sup>[31]</sup>根据鹿科动物Cyt b 基因序列对中国5个马鹿群体的43头马鹿进行了分析,在分子水平上探讨马鹿的遗传多样性和系统发育关系,结果发现塔里木马鹿 *Cervus elaphus Yarkandensis* 与西方马鹿具有较近的亲缘关系,说明我国马鹿有2个母系起源,且一个母系起源与西方马鹿群体有关,揭示了马鹿的母系起源分衍史,为我国马鹿群体遗传资源的评价、保护与利用提供分子生物学依据。

## 2.3 12S rRNA 基因及其应用

12S rRNA是线粒体上的核糖体RNA,一般位于trn M和trn V之间,进化速率较慢,被广泛应用于动物的系统发育关系和分类鉴定研究<sup>[32]</sup>。刘忠权等<sup>[33]</sup>通过对龟甲 *Testudinis Carapax et Plastrum* 原动物乌龟 *Chinemys reevesii* (Gray) 及其18种混伪品的12S rRNA基因序列进行比较,设计了一对高

特异性 PCR 引物, 利用该引物对样品 DNA 模板进行扩增, 结果表明正品乌龟均可获得 180 bp 特异性条带, 而伪品没有出现此扩增条带, 这为龟甲的混伪品鉴定提供了一种简便、实用的方法。刘向华等<sup>[34]</sup>根据蛇胆的 12S rRNA 基因片段, 设计了一对特异性鉴别引物, 通过 PCR 扩增可将蛇胆从其伪品鸭胆中鉴别出来, 证明 12S rRNA 基因片段可应用于蛇胆药材的鉴定。Liu 等<sup>[35]</sup>利用蛤蚧及其伪品 12S rRNA 序列之间的差异, 设计特异性引物对蛤蚧及 15 种伪品进行 PCR 扩增, 结果表明仅正品蛤蚧可扩出 400 bp 的阳性条带, 该实验为蛤蚧的真伪品鉴定提供了方法参考。陈维明等<sup>[36]</sup>基于 12S rRNA 基因序列, 通过设计特异性引物对参环毛蚓 *Pheretima aspergillum* (E. Perrier) 及其 9 种伪品进行鉴别, 在相同的 PCR 条件下只有正品能扩出 360 bp 的目的条带, 据此可将广地龙与其伪品进行区分鉴别。吴平等<sup>[37]</sup>对中华鳖、山瑞鳖 *Pelea steindachneri* 以及一些龟类的 12S rRNA 基因进行扩增, 通过分析待检样品中 12S rRNA 基因片段的序列, 结合 GenBank 数据库建立 NJ 系统树, 可判断待检品的种类和亲缘关系。Gao 等<sup>[38]</sup>基于 12S 基因片段设计引物对正品海龙和伪品海龙进行鉴定区分, 结果表明该鉴定体系的结果稳定, 可快速准确地识别复杂多源的海龙样品, 为海龙药材的后续开发奠定了基础。黄娅琳等<sup>[39]</sup>对黑熊 *Ursus thibetanus* G. [Baron] Cuvier、藏羚羊 *Pantholops hodgsonii* Abel、鬣羚 *Capricornis milneedwardsii*、穿山甲样品的 12S rRNA 基因片段进行扩增, 样本序列经过 BLAST 搜索比对及同源性分析, 并构建进化树, 分析结果表明 12S rRNA 可以鉴定出这几种野生动物的种属, 确定了基因标记技术在野生动物物种鉴定中的有效性。

#### 2.4 D-loop 区及其应用

D-loop 区是线粒体上一段非编码区, 又称为控制区, 位于 mtDNA 的 tRNA-Pro 和 tRNA-Phe 之间, 是线粒体上进化速度最快、变异最丰富的区域, 也是研究动物的亲缘关系非常有效的分子标记之一<sup>[40]</sup>。袁吉贵等<sup>[40]</sup>对东山岛和泉州市的大海马 *Hippocampus kuda* Bleeker 的 D-loop 序列进行遗传变异分析, 结果表明 D-loop 序列在 2 个大海马群体之间变异较小, 极其保守, 提示 D-loop 基因可作为大海马的分子标记物用于鉴定。Lin 等<sup>[41]</sup>对中国 23 个地区的 285 个中华眼镜蛇 *Naja atra* Cantor 样本的线粒体 D-loop 进行了测序, 并从 GenBank

中获得了 18 个中国台湾特有的蛇类样本序列用于系统发育和种群分析, 结果显示这些样本分成了 2 个不同的进化枝, 造成该分支的原因可能是由于罗霄山脉和南岭山脉阻碍了基因的交换, 该结果证实 D-loop 序列可用于区分不同地区中华眼镜蛇。林麝 *Moschus berezovskii* Flerov 是国家一级保护动物, 为了对林麝进行有效的保护和管理, Feng 等<sup>[42]</sup>对陕西省的 3 个野生林麝种群的线粒体基因组 D-loop 区进行分析, 采用 NJ 法构建系统进化树发现, 所检测的 71 个样本个体被明显分为 3 个群体, 3 个野生林麝种群具有丰富的遗传多样性, 线粒体 D-loop 区可用于林麝的种群鉴别和物种鉴定。Feng 等<sup>[43]</sup>对藏羚羊的 mtDNA 控制区进行测序后, 与藏绵羊、藏山羊 *Capra hirus* 的控制区序列进行比较, NJ 聚类分析结果表明, 藏羚羊与藏绵羊 *Ovis aries* Linn. 的亲缘关系较藏山羊更为密切, 为藏羚羊的分子鉴定和替代品的开发研究奠定了基础。

#### 2.5 线粒体基因组全序列及其应用

线粒体基因组被广泛应用于系统发育关系和种群遗传结构的研究, 动物类药材的线粒体全序列可明确药材基原的进化地位, 对寻找和获取新的药源提供指导性信息<sup>[44]</sup>。对某些近缘的动物类药材, 单个的线粒体基因条形码无法有效区分, 影响分子鉴定结果的准确性。与上述的单个的线粒体条形码基因相比, 线粒体全序列包含的遗传信息丰富、变异位点和序列更加多样, 可通过不同药材品种间的线粒体全序列比对, 确定物种间最显著的差异序列, 为后续的 DNA 条形码开发奠定基础<sup>[45]</sup>。随着现代测序技术的发展, 动物类药材线粒体基因组序列获取变得更加容易, 基于线粒体全序列的 DNA 条形码开发已成为动物类药材分子鉴定研究中的热点之一<sup>[46]</sup>。

在蛇类药材的研究过程中, 众多学者采用了线粒体基因组测序的方法对药用蛇的物种鉴定和亲缘关系进行研究。陈念等<sup>[47]</sup>采用常规 PCR 扩增和步移测序技术对药用尖吻蝮蛇 *Deinagkistrodon* 原动物的线粒体基因组全序列进行扩增和分析, 结果表明尖吻蝮蛇线粒体基因组长 17 541 bp, 全序列的基因含量、排列及碱基组成与其他多数蛇类相似, 共编码 13 个蛋白、2 个 rRNA、22 个 tRNA 和 2 个非编码的控制区, 该研究进一步明确了蛇类物种线粒体基因组 L 链复制起点及 tRNA 的排列次序等结构信息可用于药用蛇的物种鉴定及亲缘关系分析。刘杰等<sup>[48]</sup>采用高通量测序的方法, 获得了药用动物乌梢

蛇线粒体基因组全序列,结果表明其共编码37个基因,其基因的排布顺序与大部分蛇类动物相同,该研究为药用蛇类种群分化的分子标记开发和资源普查与保护提供了数据参考。邵元臣等<sup>[49]</sup>通过常规PCR扩增获得了梅花鹿的线粒体全基因组,表明中国梅花鹿与日本梅花鹿的亲缘关系较近,梅花鹿基因组全序列对研究梅花鹿的起源、进化,以及遗传资源的保护、开发和利用均具有重要的理论和实际意义。豆市荣<sup>[50]</sup>测定了中华穿山甲 *Manis pentadactyla* Linn. 线粒体基因组全序列,其基因组序列全长16 578 bp,基因组中各个基因排列顺序和方向与其他哺乳动物相一致,通过序列比对,发现中华穿山甲与其伪品长尾穿山甲 *M. tetradactyla* 的线粒体基因组序列的同源性仅为79.30%,为穿山甲正品和伪品的系统发育关系和分子鉴定研究提供了基础的数据。此外,线粒体全序列被广泛用于海洋药物鱼类、贝类、头足类等的种群研究、分类鉴定和进化分析<sup>[51-52]</sup>。彭巧玲等<sup>[53]</sup>采用PCR产物直接测序法测得中华鳖线粒体基因组全序列,基于线粒体基因组编码的13个蛋白质的氨基酸序列构建系统进化树分析龟鳖类动物间的亲缘关系,结果表明淡水龟科与海龟科的亲缘关系比与龟科的亲缘关系要近。申欣等<sup>[54]</sup>通过测定仿刺参 *Apostichopus japonicus* Selenka 的线粒体全序列,分析了海参纲线粒体基因组特征和不同编码基因的多态性位点,结果表明海参纲的线粒体基因组的基因排列顺序与海胆纲物种排列相同,ND2、ND4、ND5基因多态位点的比例较高,多态位点数目多,表明ND2、ND4、ND5基因可作为COI基因辅助的分子标记用于海参类物种生物多样性的保护及生物资源合理、高效利用等诸多方面。Ma等<sup>[55]</sup>测定了海洋头足类重要经济物种栗色蛸 *Octopus conispadiceus* Sasaki 的线粒体全序列,其线粒体基因组全长16 027 bp,共编码37个基因,分子进化研究表明,栗色蛸与短蛸 *O. ocellatus* D'Orbigny、长蛸 *O. variabilis* 和真蛸 *O. vulgaris* Cuvier 等蛸科动物亲缘关系较远,为其后续分子鉴定和后续的开发利用奠定了基础。张艳红等<sup>[56]</sup>通过PCR扩增和测序获得了三斑海马mtDNA全序列,发现基因组全序列长度为16 534 bp,共编码37个基因,其线粒体基因组序列的结构与脊椎动物的典型结构近似,该研究为海马的进化研究及保护工作提供了基础数据。本课题组长期致力于中药资源的开发和活性评价方面的工作,近年

来在名贵动物类药材海马的分类鉴定和DNA条形码开发等领域做了部分工作<sup>[57]</sup>。目前在我国药材市场中,除《中国药典》2015年版规定的5种正品海马外,吻海马 *H. reidi* Ginsburg、棘海马 *H. spinosissimus* Weber 等同属海马药材伪品种类繁多,传统的鉴别手段不易区分。其中海马药材伪品吻海马和南非海马 *H. capensis* Boulenger 与正品海马大海马间因为亲缘关系较近,COI基因在种间的变异率小于1%,不足以将正品与伪品进行区分,无法保证分子鉴定结果的准确性。为建立适用于海马药材分子鉴定的技术体系,课题组通过获得线粒体全基因组序列,建立海马及其混伪品的系统发育关系,明确不同海马来源的分子进化地位,基于线粒体全序列对COI等不同基因在种内和种间的变异速率进行分析,筛选速度适中的可用于区分近缘海马药材的DNA条形码分子标签。目前,本课题组已获得包括线纹海马、棘海马、南非海马和欧洲海马 *H. hippocampus* Linn. 在内的6种海马线粒体基因组全序列,为规范海马中药材市场的技术开发奠定基础,也为我国海马资源的遗传多样性保护、资源开发与利用、海马良种选育提供了数据支撑<sup>[58-62]</sup>。

不同mtDNA条形码在动物类药材分子鉴定中的技术特点和应用比较见表1。

### 3 总结与展望

动物类中药材种类庞杂,药材市场上混伪品繁多,习用品、代用品以及多基原、同名异物、同物异名等现象严重影响了动物药临床应用的安全性和有效性,依靠传统的鉴别手段难以对动物药的质量进行有效的控制,迫切需要开发完善的鉴定体系,保障动物类药材的临床用药安全 and 人民群众的身体健康<sup>[65]</sup>。

随着分子生物学和生物信息学的发展,分子鉴定的应用领域越来越广泛,DNA条形码技术作为近年新兴的一种物种鉴定技术,其可利用一个短的、标准的DNA区域扩增达到物种鉴别的效果,具有鉴定结果重复性好、方法通用性好、易于推广和标准化等优点,在动物类药材的鉴定中应用日益广泛<sup>[3]</sup>。DNA条形码技术为快速的物种鉴定提供了分子水平的精细分类学标准,在医药、食品质量控制等领域具有广泛的应用前景,是传统形态鉴别方法的有效补充,也为突破现有检测技术与社会发展需求之间的矛盾提供了可行性。mtDNA条形码技术中COI基因扩增简便、快速,已成为许多鱼类、昆虫

表 1 不同 mtDNA 条形码在动物类药材分子鉴定中的技术特点和应用比较

Table 1 Comparison on technical characteristics and applications of different mtDNA barcodes in molecular identification of animal medicinal materials

| 种类          | 适用药材                                      | 技术特点                                                                                                                                     | 应用潜能                                                                               | 参考文献     |
|-------------|-------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| COI 基因      | 麝香、蛤蚧、海马、海龙、海蛇、水蛭、马鹿、麋鹿、梅花鹿、鳖甲、羚羊角、蜈蚣、蛤蟆油 | mtDNA 上的一段蛋白质编码基因, COI 在能够保证足够变异的同时容易被通用引物扩增, 自身 DNA 序列很少存在缺失和插入, 常使用通用引物 LCO1490、HCO1498 进行扩增, 扩增片段长度约 800 bp, 扩增技术和体系成熟, 供参考和比对数据信息库丰富 | 在多数动物类群中, COI 基因都存在显著的序列变异, 其进化速率较快, 可用于分析和鉴定亲缘关系密切的种、亚种及地理种群之间的关系, 在非药用动物的研究中应用广泛 | 14-24,63 |
| Cyt b 基因    | 海马、蕲蛇、貂心、鸡内金、蛤蟆油、马鹿、鹿血                    | 动物线粒体中编码 Cyt b, 常使用通用引物 L14841、H15149 进行扩增, 扩增片段长度约 700 bp, 结果准确性高, 鉴定效率高                                                                | 进化速度适中, 有一定的保守性, Cyt b 序列片段在种内个体间的序列差异很小, 而种间的序列差异较大, 是研究动物的群体遗传结构和分子鉴定的理想标记序列     | 26-31,64 |
| 12S rRNA 基因 | 龟甲、蛇胆、蛤蚧、广地龙、中华鳖、山瑞鳖、黑熊、羚羊角、穿山甲           | 线粒体上的小核糖体 RNA, 常使用通用引物 1069、1219 进行扩增, 扩增片段长度约 800 bp                                                                                    | 在分子鉴定的应用中, 12S rRNA 是 COI 基因的补充, 其进化速率较慢, 被广泛应用于动物的系统发育关系和分类鉴定研究                   | 33-39    |
| D-loop 基因   | 大海马、中华眼镜蛇、林麝、羚羊角                          | 线粒体上一段非编码区, 又称为控制区, 与其他基因相比, 扩增难度较大, 常用的测序方法为 TA 克隆, 扩增片段长度约 300 bp                                                                      | 线粒体上进化速度最快、变异最丰富的区域, 也是研究动物的亲缘关系非常有效的分子标记之一, 广泛用于药源动物的起源与进化、群体遗传结构、药材品种间的系统发育关系    | 41-43    |
| 线粒体基因组全序列   | 尖吻蝮蛇、乌梢蛇、梅花鹿、穿山甲、中华鳖、栗色蛸、海马               | 扩增难度大, 可采用常规的双脱氧末端终止法 (SANGER) 法测序和二代高通量测序技术获得, 其包含的信息全面, 可为近亲缘物种的 DNA 条形码序列引物设计提供借鉴参考, 为动物类药材的比对提供标准的对照序列                               | 线粒体基因组被广泛地应用于系统发育关系和种群遗传结构的研究, 动物类药材的线粒体全序列可明确药材基原的进化地位, 对寻找和获取新的药源提供指导性信息         | 47-62    |

和鸟类等动物分类与鉴别的理想 DNA 条码; Cytb 和 12S rRNA 条形码可作为鉴定的有效补充。DNA 条形码技术在动物类药材中处于起步阶段, 但其在非药用动物, 尤其是资源丰富且具有潜在药用开发前景的陆生和水生动物中已有大量的系统研究, 其中的一些鉴定理念、技术、方法、手段等可为药用动物类药材的鉴定提供借鉴<sup>[66-68]</sup>。随着二代测序技术方法的发展和完善, 序列信息的获取将更加容易, 基于动物类药材线粒体全序列和全基因组序列的大数据分析可开发更多的特异标签, 丰富分子鉴定标记的 DNA 条形码, 为动物类药材的准确鉴定和后

续开发提供技术保障。高质量的基因组 DNA 是分子鉴定的前期, 动物类药材受采收、加工、贮藏条件与贮藏时间等环节的影响, 导致药材中的 DNA 大分子降解严重, 影响了扩增鉴定的成功率。本课题组在研究海洋动物药材海马、海龙过程中发现, 利用 ITS2 的通用引物对上述药材进行 PCR 扩增的成功率不足 40%, 严重限制了 ITS2 条形码在动物类药材鉴定中的应用。与核基因组相比, mtDNA 具有结构简单、稳定好、拷贝数多等优点, 在动物类药材中易于扩增。经过优化设计后的 COI 引物序列对海马属药材及其常见的市场伪品的扩增成功率可

达99%以上,对海龙科药用动物干品的扩增成功率在97%以上。此外,通用引物的序列与扩增的成功率密切相关,目前已根据mtDNA的保守序列,针对COI、12S rDNA和Cyt b等成功开发出绝大多数动物类药材的通用引物,为基于mtDNA条形码的分子鉴定技术奠定了基础<sup>[69]</sup>。但针对某一特定的动物类药材,上述通用引物由于扩增的片段大于500 bp,且与目标片段间存在一定的错配几率,导致在分子鉴定过程中通用引物的扩增成功率不高,影响了分子鉴定的效率。后续的研究过程中,应在通用引物的基础上,设计开发针对特定动物类药材的特异引物扩增序列,降低扩增的片段长度,采用特异的微型条形码技术提高名贵珍稀动物类药材的扩增成功率。此外,目前GenBank中收录的动物类药材的mtDNA条形码有限,不同提交人由于所用扩增引物的差异导致片段长度不同,且缺乏标准的对照序列,严重影响了测序完成后分子比对的结果和鉴定的准确性。在加强条形码数据库建设的基础上,积极推广条形码的标准化引物,并在动物类药材准确基原鉴定的基础上完成线粒体全序列的测序工作,为动物类药材的比对提供标准的对照序列,确保分子鉴定结果的准确性。mtDNA条形码作为一种动物类药材鉴定的新兴技术,在使用过程中要与传统的药材鉴别方法和手段密切结合,重点应用于市场混伪品众多、亲缘关系较近且传统手段难以区分正伪品的同科同属的动物类药材中,努力探索微量药材的基因组提取和快速准确扩增、鉴定技术,确保动物类药材的质量,保障临床用药的安全和有效。

#### 参考文献

- [1] 中国药典[S].一部.2015.
- [2] 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.
- [3] 陈士林,郭宝林,张贵君,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):1123-1126.
- [4] Lang B F, Burger G O, Kelly C J, et al. An ancestral mitochondrial DNA resembling a eubacterial genome in miniature [J]. *Nature*, 1997, 387(6632): 493-497.
- [5] Boore J L. Animal mitochondrial genomes [J]. *Nucl Acids Res*, 1999, 27(8): 1767-1780.
- [6] Gissi C, Iannelli F, Pesole G. Evolution of the mitochondrial genome of Metazoa as exemplified by comparison of congeneric species [J]. *Heredity*, 2008, 101(4): 301-320.
- [7] Cheng R, Zheng X, Lin X, et al. Determination of the complete mitochondrial DNA sequence of octopus minor [J]. *Mol Bio Rep*, 2012, 39(4): 3461-3470.
- [8] Chang Y S, Huang F L, Lo T B. The complete nucleotide sequence and gene organization of carp (*Cyprinus carpio*) mitochondrial genome [J]. *J Mol Evol*, 1994, 38(2): 138-155.
- [9] Wolfe K H, Li W H, Sharp P M. Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84(24): 9054-9058.
- [10] 陆佳妮,赵志礼,倪梁红,等.线粒体基因在药用植物DNA分子鉴定中的应用[J].中草药,2016,47(10):1791-1796.
- [11] Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L. Biological identifications through DNA barcodes [J]. *Proc Biol Sci*, 2003, 270(1512): 313-321.
- [12] Cheng R, Zheng X, Ma Y, et al. The complete mitochondrial genomes of two octopods *Cistopus chinensis* and *Cistopus taiwanicus*: Revealing the phylogenetic position of the genus *Cistopus* within the order octopoda [J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e84216.
- [13] 郑小东,马媛媛,程汝滨.线粒体DNA标记在头足纲动物分子系统学中的应用[J].水产学报,2015,39(2):294-303.
- [14] 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.
- [15] Luo J Y, Yan D, Song J Y, et al. A strategy for trade monitoring and substitution of the organs of threatened animals [J]. *Sci Rep*, 2013, 3(10): 3108-3116.
- [16] 杜鹤,崔丽娜,张辉,等.鳖甲及其混伪品的DNA分子鉴定[J].世界科学技术—中医药现代化,2011,13(2):429-434.
- [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] 陈静,蒋志刚.利用COI基因序列鉴别赛加羚羊角与其代用品[J].中国现代中药,2013,15(7):548-551.
- [19] 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.
- [20] Cao S, Guo L, Luo H, et al. Application of COI barcode sequence for the identification of snake medicine (*Zaocys*) [J]. *Mitochond DNA*, 2016, 27(1): 483-489.
- [21] Gu H F, Xia Y, Peng R, et al. Authentication of Chinese crude drug gecko by DNA barcoding [J]. *Nat Prod Commun*, 2011, 6(1): 67-71.



- [22] 张红印, 陈俊, 贾静, 等. 中药材蜈蚣及其混伪品 DNA 条形码鉴别研究 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(12): 2208-2211.
- [23] 王孟虎, 康廷国, 许亮, 等. 基于 COI 序列的哈蟆油基原动物 DNA 条形码鉴定研究 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(8): 1572-1577.
- [24] 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.
- [25] 高天翔, 毕潇潇, 赵林林, 等. 基于线粒体 Cytb 基因全序列的松江鲈群体遗传结构分析 [J]. 水生生物学报, 2013, 37(2): 199-207.
- [26] Casey S P, Hall H J, Stanley H F, et al. The origin and evolution of seahorses (genus *Hippocampus*): A phylogenetic study using the cytochrome b gene of mitochondrial DNA [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2004, 30(2): 261-272.
- [27] 唐晓晶, 冯成强, 黄璐琦, 等. 蕲蛇及其混淆品高特异性 PCR 鉴别 [J]. 药物分析杂志, 2006, 26(2): 152-155.
- [28] Li M, Xia W, Wang M, et al. Application of molecular genetics method for differentiating *Martes zibellina* L. heart from its adulterants in traditional Chinese medicine based on mitochondrial cytochrome b gene [J]. *Mitochondr DNA*, 2013, 25(1): 78-82.
- [29] 曲萌, 崔继春, 董志恒, 等. 鸡内金的分子鉴定研究 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(24): 3192-3194.
- [30] Yang X G, Wang Y Q, Zhou K Y, et al. Authentication of oviductus ranae and its original animals using molecular [J]. *Biol Pharm Bull*, 2002, 25(8): 1035-1039.
- [31] 张丽, 滚双宝, 雷天云, 等. 应用 mtDNA Cytb 基因全序列分析中国 5 个马鹿群体的遗传多样性和系统发育 [J]. 华北农学报, 2010, 25(4): 12-16.
- [32] Jost M C, Shaw K L. Phylogeny of ensifera (hexapoda: orthoptera) using three ribosomal loci, with implications for the evolution of acoustic communication [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2006, 38(2): 510-530.
- [33] 刘忠权, 王义权, 周开亚, 等. 中药材龟甲及原动物的高特异性 PCR 鉴定研究 [J]. 药学报, 1999, 34(12): 941-945.
- [34] 刘向华, 王义权, 刘忠权, 等. 中药材蛇胆的 DNA 分子标记鉴定研究 [J]. 药学报, 2001, 36(3): 229-232.
- [35] 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.
- [36] 陈维明, 马梅, 龚玲, 等. 广地龙特异性 PCR 分子鉴定 [J]. 广州中医药大学学报, 2015, 32(3): 499-503.
- [37] 吴平, 周开亚, 杨群. 亚洲淡水和陆生龟鳖类 12S rRNA 基因片段的序列分析和系统发生研究 [J]. 动物学报, 1999, 45(3): 260-267.
- [38] Gao L, Yin Y, Li J, et al. Identification of traditional Chinese medicinal pipefish and exclusion of common adulterants by multiplex PCR based on 12S sequences of specific alleles [J]. *Mitochondrial DNA Part A*, 2017, 29(3): 340-346.
- [39] 黄娅琳. 12S rRNA、Cyt b 基因标记在几类野生动物检材鉴定中的差异 [J]. 四川农业大学学报, 2017, 35(2): 273-279.
- [40] 袁吉贵, 罗杰, 刘丽, 等. 基于 D-loop 和 Cytb 序列的大海马遗传变异分析 [J]. 安徽农业科学, 2017, 45(36): 140-143.
- [41] Lin L H, Hua L, Qu Y F, et al. The phylogeographical pattern and conservation of the Chinese cobra (*Naja atra*) across its range based on mitochondrial control region sequences [J]. *PLoS One*, 2014, 9(9): e106944.
- [42] Feng H, Feng C L, Huang Y, et al. Structure of mitochondrial DNA control region and genetic diversity of *Moschus berezovskii* populations in Shaanxi Province [J]. *Genet Mol Res*, 2016, doi: 10.4238/gmr.15027578.
- [43] Feng Z, Fan B, Li K, et al. Molecular characteristics of Tibetan antelope (*Pantholops hodgsonii*) mitochondrial DNA control region and phylogenetic inferences with related species [J]. *Small Ruminant Res*, 2008, 75(2/3): 236-242.
- [44] Lanave C. Evolution of the mitochondrial genetic system: An overview [J]. *Gene*, 2000, 261(1): 153-159.
- [45] 刘银梅. 动物线粒体基因与进化研究进展 [J]. 山西农业科学, 2007, 35(1): 80-82.
- [46] Gwenaelle D T, Serge H, Benjamin M, et al. Complete mitochondrial DNA sequence of the European flat oyster *Ostrea edulis* confirms Ostreidae classification [J]. *Bmc Res Notes*, 2011, 4(1): 400-409.
- [47] 陈念, 高慎淦, 赖小平, 等. 药用尖吻蝾蛇原动物的线粒体基因组全序列分析 [J]. 中药材, 2013, 36(5): 711-715.
- [48] 刘杰, 田晓轩, 崔英, 等. 药用动物乌梢蛇线粒体基因组全序列分析 [J]. 天津中医药大学学报, 2016, 35(3): 187-191.
- [49] 邵元臣, 邢秀梅, 杨福合, 等. 梅花鹿线粒体全基因组的测序及分析 [A] // 2013 中国鹿业进展 [C]. 湛江: 中国畜牧协会, 2013.
- [50] 豆市荣. 中华穿山甲线粒体基因组及分子系统学研究 (哺乳纲: 鳞甲目) [D]. 南宁: 广西师范大学, 2012.
- [51] Yokobori S, Lindsay D J, Yoshida M, et al. Mitochondrial genome structure and evolution in the living fossil vampire squid, *Vampyroteuthis infernalis*, and extant cephalopods [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2007, 44(2): 260-267.



- 898-910.
- [52] Akasaki T, Nikaido M, Tsuchiya K, *et al.* Extensive mitochondrial gene arrangements in coleoid Cephalopoda and their phylogenetic implications [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2006, 38(3): 648-658.
- [53] 彭巧玲, 蒲友光, 王志方, 等. 中华鳖线粒体基因组序列分析 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2005, 21(5): 591-596.
- [54] 申 欣, 田 美, 程汉良, 等. 海参纲线粒体基因组特征分析及分子标记探讨 [J]. 水产科学, 2011, 30(7): 400-404.
- [55] Ma Y, Zheng X, Cheng R, *et al.* The complete mitochondrial genome of *Octopus conispadiceus* (Sasaki, 1917) (Cephalopoda: Octopodidae) [J]. *Mitochondrial DNA A DNA Mapp Seq Anal*, 2012, 27(2): 1058-1059.
- [56] 张艳红, 刘帅帅, 王 信, 等. 三斑海马线粒体基因组核苷酸全序列结构与分析 [J]. 动物学杂志, 2016, 51(3): 413-422.
- [57] 陈 梦, 陈建真, 葛宇清, 等. 海马化学成分及药理活性研究进展 [J]. 中草药, 2017, 48(19): 4089-4099.
- [58] Cheng R, Liao G, Ge Y, *et al.* Complete mitochondrial genome of the great seahorse *Hippocampus kelloggi* Jordan & Snyder, 1901 (Gasterosteiformes: Syngnathidae) [J]. *Mitochondrial DNA Part A*, 2015, 28(2): 227-228.
- [59] Wang Z K, Ge Y Q, Cheng R B, *et al.* Sequencing and analysis of the complete mitochondrial genome of *Hippocampus spinosissimus* Weber, 1913 (Gasterosteiformes: Syngnathidae) [J]. *Mitochondrial DNA Part A*, 2015, 28(3): 303-304.
- [60] Ge Y, Zhu L, Chen M, *et al.* Complete mitochondrial genome sequence for the endangered Knysna seahorse *Hippocampus capensis*, Boulenger 1900 [J]. *Conserv Genet Resour*, 2017, doi: org/10.1007/s12686-017-0849-3.
- [61] Chen M, Zhu L, Chen J, *et al.* The complete mitochondrial genome of the short snouted seahorse *Hippocampus hippocampus* Linnaeus 1758 (Syngnathiformes: Syngnathidae) and its phylogenetic implications [J]. *Conserv Genet Resour*, 2017, doi: org/10.1007/s12686-017-0930-y.
- [62] Cheng R, Fang Y, Ge Y, *et al.* Complete mitochondrial genome sequence of the Jayakar's seahorse *Hippocampus jayakari* Boulenger, 1900 (Gasterosteiformes: Syngnathidae) [J]. *Mitochondrial DNA Part B*, 2017, 2(2): 593-594.
- [63] 张龙霏, 陈绍民, 田景振, 等. 利用 DNA 条形码检验中药制剂中的羚羊角药材 [J]. 中草药, 2014, 45(23): 3467-3471.
- [64] 王凤霞, 陈媛媛, 任贵奇, 等. 鹿血的 PCR-RFLP 鉴定研究 [J]. 中草药, 2018, 49(8): 1914-1918.
- [65] 陈珂蕊, 何震宇. DNA 条形码技术在中药领域的应用进展 [J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(1): 208-210.
- [66] 杨宗英, 汪登强, 陈大庆, 等. 基于 mtDNA 序列分析青鱼群体遗传结构 [J]. 淡水渔业, 2015, 45(2): 3-7.
- [67] Hua T, Que Y, Na Z, *et al.* The complete mitochondrial genome of the spotted longbarbel catfish, *Hemibagrus guttatus* (Siluriformes, Bagridae) [J]. *Mitochondr DNA*, 2016, 27(1): 467-468.
- [68] Teinlek P, Siripattarapratvat K, Tirawattanawanich C. Genetic diversity analysis of Thai indigenous chickens based on complete sequences of mitochondrial DNA D-loop region [J]. *Asian-Australas J Anim Sci*, 2018, doi: 10.5713/ajas.17.0611.
- [69] Li X, Yang Y, Henry R J, *et al.* Plant DNA barcoding: from gene to genome [J]. *Biol Rev*, 2015, 90(1): 157-166.