

基于 COI 条形码的市售蝉蜕及其混淆品 DNA 分子鉴定研究

张欢欢^{1,2}, 徐金娣², 周 静¹, 贾聪玲³, 吴啟南³, 郭梦斐^{1,2}, 沈纪晨^{1,2}, 伍城颖¹, 李松林^{1,2*}, 毛 茜^{1,2*}

1. 南京中医药大学附属中西医结合医院 中药质量研究室, 江苏 南京 210028
2. 江苏省中医药研究院/中国中医科学院江苏分院 中药代谢组研究室, 江苏 南京 210028
3. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023

摘要: 目的 利用 COI 序列对中药材蝉蜕 *Cicadae Periostracum* 及其混淆品进行 DNA 条形码鉴定研究, 为蝉蜕药材的快速准确鉴定提供新的技术手段。方法 收集全国市售蝉蜕药材、基地自采蝉蜕及其混淆品总 45 份样本, 同时采集江苏徐州黑蚱养殖基地不同树种中蝉卵样品 5 份作为对照。提取 DNA, 进行 PCR 扩增及双向测序, 测序结果采用 DNAMAN 和 SnapGene 进行拼接校对, 运用 MEGA11.0 进行比对分析, 计算种内及种间 Kimura 2-Parameter (K2P) 遗传距离并构建邻接法 (neighbor-joining, NJ) 系统发育树。结果 黑蚱种内遗传距离远小于种间最小遗传距离, NJ 树结果显示, 黑蚱蝉蜕样品全部聚集为独立的一支, 支持率为 99%。混淆品样品分别聚集为单独的一支, 支持率均大于 90%, 表明基于 COI 序列的 DNA 条形码技术可以有效鉴别蝉蜕药材真伪。结论 应用 COI 序列作为 DNA 条形码能够准确有效地鉴别蝉蜕及其混淆品。

关键词: 蝉蜕; 混淆品; DNA 条形码; COI 序列; 分子鉴定

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)06-2057-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.06.027

Molecular identification of commercial *Cicadae Periostracum* and its adulterants based on COI barcode sequence

ZHANG Huanhuan^{1,2}, XU Jindi², ZHOU Jing¹, JIA Congling³, WU Qinan³, GUO Mengfei^{1,2}, SHEN Jichen^{1,2}, WU Chengying¹, LI Songlin^{1,2}, MAO Qian^{1,2}

1. Department of Pharmaceutical Analysis, Affiliated Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China
2. Department of Metabolomics, Jiangsu Province Academy of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, China
3. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China

Abstract: Objective To provide new technique for accurate identification of Chantui (*Cicadae Periostracum*) and its adulterants using DNA barcoding method based on the COI sequence. **Methods** Forty-five batches of the commercial *Cicadae Periostracum* and its adulterants, as well as self-harvested *Cicadae Periostracum*, were collected from different localities of China, and five batches of cicada eggs from different tree species in Xuzhou, Jiangsu Province were collected as controls. The total genomic DNAs of *Cicadae Periostracum* and its counterfeits were extracted. The COI fragments of these samples were amplified by PCR and sequenced in both directions to obtain the COI sequence. A total of 28 COI sequences of *Cicadae Periostracum*, 17 adulterants and 9 related species were downloaded from Genbank database. The obtained sequences were assembled using the DNAMAN and SnapGene. MEGA11.0 was applied to calculate intraspecific and interspecific Kimura 2-Parameter (K2P) genetic distances and construct the neighbor-joining (NJ) phylogenetic tree. **Results** The intraspecific genetic distance of Heizha (*Cryptotympana pustulata* Fabricius) was much smaller than the minimum genetic distance between *C. pustulata* and its adulterants. The NJ tree showed that the genuine *C. pustulata* samples were

收稿日期: 2023-08-09

基金项目: 江苏省中医药科技发展计划重点项目 (ZD202103); 江苏省中医药科技发展计划面上项目 (MS202341); 南京中医药大学自然科学基金 (XZR2021031)

作者简介: 张欢欢 (1999—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向为蝉蜕质量控制。E-mail: Zhanghuanhuan0404@163.com

*通信作者: 毛 茜 (1984—), 女, 博士, 研究员, 研究方向为中药药效物质基础和质量控制研究。E-mail: nancymq@126.com

李松林 (1964—), 男, 博士, 研究员, 研究方向为中药药效物质基础、质量控制和新产品研发。E-mail: songlinli64@126.com

all gathered as a separate one, with a support rate of 99%. The counterfeit samples were aggregated into another separate unit, and the support rate was greater than 90%, indicating that the DNA barcoding technology based on COI sequence could effectively identify the authenticity of *Cicadae Periostracum*. **Conclusion** COI sequence can stably and accurately distinguish *Cicadae Periostracum* and its adulterants, which provide a new technique to ensure the quality and clinical safety in utilization of *Cicadae Periostracum*.

Key words: *Cicadae Periostracum*; adulterants; DNA barcoding; COI sequence; molecular identification

蝉蜕为黑蚱 *Cryptotympana pustulata* Fabricius, 若虫羽化时蜕下的皮壳, 是我国重要的虫类动物类药材, 在我国已有近两千年的临床应用历史^[1-3]。具有疏散风热、利咽透疹、平喘等功效, 临床常用于风热感冒、咽痛音哑、咳嗽等症^[4-6]。

蝉蜕不仅是医院药房常用的中药材, 也是众多中药制剂的重要原料, 如苏黄止咳胶囊、黄氏响声丸、克感利咽口服液、开喉剑喷雾剂等经典中成药均以蝉蜕为原料。蝉蜕疗效明确, 临床使用量逐年攀升。但蝉蜕为野生动物资源, 随着森林覆盖面积的减少, 其法定基原动物黑蚱的自然栖息地也日益缩减, 使得蝉蜕药材资源逐年减少, 市场价格居高不下, 各地药材市场中也出现了较多蝉蜕混淆品和习用品。根据文献报道和课题组前期对蝉蜕全国药材市场的调研, 发现当前蝉蜕基原动物除《中国药典》规定的黑蚱外, 华南蚱蝉、鸣蝉、螳蛄等多种蝉的皮壳也作为蝉蜕药用^[7]。不同品种蝉蜕外观性状多相似, 难以根据主观经验从性状上进行准确辨别, 且蝉蜕质轻, 易碎, 经采收、运输等环节后, 皮壳因挤压常出现破碎, 难以鉴别。因此, 对蝉蜕药材及其混淆品进行快速准确地鉴定, 将对保障蝉蜕质量和临床疗效有十分重要的应用价值。

DNA 条形码技术是利用基因组中一段公认标准的、相对较短的 DNA 片段来进行物种鉴定的分子诊断技术, 不依赖物种的形态特征和分类经验^[8-12]。2013 年, 陈士林研究团队在前期大量研究基础上, 构建了以动物细胞色素 C 氧化酶 I (cytochrome oxidase I, COI) 序列为核心的动物类药材 DNA 条形码鉴定体系^[13]。国家药典委员会已经将中药材 DNA 条形码分子鉴定指南纳入《中国药典》增补本^[14], 规定动物类药材的 DNA 条形码鉴定以 COI 序列为主^[13-14]。COI 在能够保证足够变异的同时又很容易被通用引物扩增, 其 DNA 序列本身很少存在插入和缺失^[15]。目前, 物种鉴定手段在动物类药材鉴定方面已有广泛应用^[16-24]。但国内尚未有运用 COI 序列鉴定蝉蜕及其混淆品的报道。

本研究利用 COI 序列对蝉蜕及其混淆品进行鉴别研究, 结合从 Genbank 所得的序列分析药材的正

品与混淆品之间的遗传距离、系统发育树中物种的聚类情况, 考察利用 COI 序列鉴别蝉蜕与其混淆品的可行性, 以期利用 DNA 条形码技术为准确鉴定蝉蜕基原提供科学依据。

1 材料

1.1 样品

2020 年 6 月~2023 年 7 月, 从全国各地收集蝉蜕商品药材及其混淆品 28 批, 从江苏徐州沛县黑蚱野生抚育基地、河南、山东等地自采药材 17 批, 由江苏省中医药研究院李松林教授依据《中国药典》^[1]、《中国蝉科志》^[2]和《中国药用动物志》^[3]鉴定基原物种分别为黑蚱蝉蜕 *C. atrata* Fabricius、震旦大马蝉蜕 *Macrosemia pieli* Kato、南蚱蝉蜕 *C. holsti* Fabr.、阳明山塘蝉蜕 *Tanna sozanensis* Kato。另从江苏徐州沛县黑蚱养殖基地收集不同树种蝉卵样品 5 份, 用于基原确认及实验阳性对照。凭证样本和数字影像信息保存于江苏省中医药研究院中药质量和代谢组研究室, 实验材料信息见表 1、2。从 GenBank 数据库中下载了相关的 COI 序列共 22 条, 信息见表 3。

1.2 仪器

LEGEND MICRO21R 型高速离心机 (美国 Thermo 公司); ABI PCR 仪 (美国 Applied Biosystems 公司); DYY-6C 型琼脂糖凝胶电泳仪 (北京六一生物科技有限公司); Gel Doc XR 型凝胶成像系统 (美国 Bio-Rad 公司); IKA-HB10 型水浴锅 (南京科尔仪器设备有限公司)。

1.3 试剂

琼脂糖凝胶粉 (擎科生物有限公司, TSINGKE TSJ001); 染料 (翌圣生物有限公司, Yea Red Nucleic Acid Gel Stain 10000X in water); 聚合酶 (Vazyme, 2×Rapid Taq Master Mix); 引物 (生工生物工程有 限公司合成); 5 000 bp DNA 相对分子质量标准 Marker (批号 B500351, 生工生物工程有 限公司); Zeup 柱式动物基因组 DNA 抽提试剂盒 (批号 B518251, 生工生物工程有 限公司); 血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒 (批号 DP304, 天根生化科技有 限公司)。

表 1 市售蝉蜕药材信息

Table 1 Information of commercial *Cicadae Periostracum*

序号	药材批号	购买地	拉丁名	GenBank 登录号
1	JSPACM-66-3	河北保定	<i>C. atrata</i>	MG954467
2	JSPACM-66-4	安徽亳州	<i>C. atrata</i>	MK807132
3	JSPACM-66-5-2	江苏连云港	<i>C. atrata</i>	MG954467
4	JSPACM-66-6-1	江苏南京	<i>C. atrata</i>	MG954467
5	JSPACM-66-8	山西晋中	<i>C. atrata</i>	MG954467
6	JSPACM-66-10	河南郑州	<i>C. atrata</i>	MK807132
7	JSPACM-66-11	贵州贵阳	<i>C. atrata</i>	MK807132
8	JSPACM-66-12	浙江宁波	<i>C. atrata</i>	MK807132
9	JSPACM-66-13	河北唐山	<i>C. atrata</i>	MG954467
10	JSPACM-66-16	吉林长春	<i>C. atrata</i>	MK807132
11	JSPACM-66-17	浙江杭州	<i>C. atrata</i>	MG954467
12	JSPACM-66-18	河南郑州	<i>C. atrata</i>	MK807132
13	JSPACM-66-21	江苏扬州	<i>C. atrata</i>	MG954467
14	JSPACM-66-22-2	山东青岛	<i>C. atrata</i>	MK807132
15	JSPACM-66-23	安徽亳州	<i>C. atrata</i>	MG954467
16	JSPACM-66-39	山东菏泽	<i>C. atrata</i>	MK807132
17	JSPACM-66-40	河北邢台	<i>C. atrata</i>	MG954467
18	JSPACM-66-45	安徽宣城	<i>M. pيلي</i>	MT639256
19	JSPACM-66-46	安徽亳州	<i>M. pيلي</i>	MT639256
20	JSPACM-66-47	安徽亳州	<i>M. pيلي</i>	MT639256
21	JSPACM-66-65	安徽泾城	<i>M. pيلي</i>	MT639256
22	JSPACM-66-66	四川成都	<i>M. pيلي</i>	MT639256
23	JSPACM-66-67	安徽亳州	<i>M. pيلي</i>	MT639256
24	JSPACM-66-48	四川成都	<i>C. holsti</i>	MZ914577
25	JSPACM-66-49	云南昆明	<i>C. holsti</i>	MZ914577
26	JSPACM-66-63	广东广州	<i>T. sozanensis</i>	LC508874
27	JSPACM-66-69	安徽霍山	<i>T. sozanensis</i>	LC508874
28	JSPACM-66-79	福建三明	<i>M. pيلي</i>	MT639256

表 2 自采蝉蜕药材信息

Table 2 Information of self-harvested *Cicadae Periostracum*

序号	编号	产地	野生/抚育	拉丁名	GenBank 登录号
29	JSPACM-66-50	江苏徐州沛县	抚育	<i>C. atrata</i>	MG954467
30	JSPACM-66-51	江苏徐州沛县	抚育	<i>C. atrata</i>	MG954467
31	JSPACM-66-52	江苏徐州沛县	野生	<i>C. atrata</i>	MG954467
32	JSPACM-66-70	江苏徐州沛县	抚育	<i>C. atrata</i>	MG954467
33	JSPACM-66-71	江苏徐州沛县	抚育	<i>C. atrata</i>	MG954467
34	JSPACM-66-72	江苏徐州沛县	抚育	<i>C. atrata</i>	MG954467
35	JSPACM-66-73	江苏徐州沛县	抚育	<i>C. atrata</i>	MG954467
36	JSPACM-66-61	河南驻马店上蔡县	野生	<i>C. atrata</i>	MG954467
37	JSPACM-66-56	河南新乡	野生	<i>C. atrata</i>	MG954467
38	JSPACM-66-74	河南南阳内乡县	野生	<i>C. atrata</i>	MG954467
39	JSPACM-66-75	河南南阳内乡县	野生	<i>C. atrata</i>	MG954467
40	JSPACM-66-62	山西晋中	野生	<i>C. atrata</i>	MG954467
41	JSPACM-66-44	河北邢台	野生	<i>C. atrata</i>	MG954467
42	JSPACM-66-55	安徽阜阳	野生	<i>C. atrata</i>	MG954467
43	JSPACM-66-76	江苏南京	野生	<i>C. atrata</i>	MG954467
44	JSPACM-66-77	山东枣庄滕州	抚育	<i>C. atrata</i>	MG954467
45	JSPACM-66-78	福建三明	野生	<i>C. atrata</i>	KR674174

表 3 GenBank 下载的 COI 基因序列信息
Table 3 Information of COI gene sequences downloaded from GenBank

物种	拉丁名	基因编号
黑蚱	<i>C. atrata</i>	MG954467
震旦大马蝉	<i>M. pieli</i>	MT639256
南蚱蝉	<i>C. holsti</i>	MZ914577
阳明山螳蝉	<i>T. sozanensis</i>	LC508874
带蚱蝉	<i>Cryptotympana facialis</i>	AB898935、AB900640、AB902563
松寒蝉	<i>Meimuna opalifera</i>	LC414804、LC414805、MT129427
螳蛄	<i>Platypleura kaempferi</i>	MT129339、MT129340、AB898071
中华螳蝉	<i>Auritibicen atrofasciatus</i>	KY782334、KY782339
蒙古寒蝉	<i>Meimuna mongolica</i>	MT639257、MN136277、MN136278、MN136279
绿草蝉	<i>Mogannia hebes</i>	GQ527095、LC508841、MN241556

2 方法

2.1 蝉蜕基因组 DNA 提取

取出蝉蜕样品，依次用水、70%乙醇洗去附着的泥沙等杂质，置于通风橱晾干后放入研钵，使用液氮快速进行研磨，使组织充分破碎呈粉末状，后续提取 DNA 步骤按照基因组 DNA 提取试剂盒提取各样品总 DNA，提取过程中蝉卵样品水浴 1 h，蝉蜕样品较难裂解，水浴时间适当延长至 3~4 h。

2.2 COI 基因的 PCR 扩增

依据《中药材 DNA 条形码分子鉴定指导原则》，采用 COI 通用引物（LCOI490: 5'-GGTCA-ACAAATCATAAAGATATTGG-3' 与 HCO2198: 5'-TAAACTTTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'）和 COI 序列药典扩增程序（94 ℃、1 min；94 ℃、1 min，45 ℃、5 min，72 ℃、1.5 min，5 个循环；94 ℃、1

min，52 ℃、1.5 min，72 ℃、1 min，35 个循环；72 ℃、5 min）进行 PCR 扩增。20 μL PCR 体系中包含 PCR Master Mix 10 μL，引物 LCOI490 与 HCO2198 各 0.8 μL（10 μmol/L），DNA 2 μL 以及无菌水 6.4 μL。

2.3 琼脂糖凝胶电泳及测序

用电子天平称取 0.5 g 琼脂糖粉，置于装有 50 mL 1×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 μL 染料，摇晃至充分混匀，倒入胶槽等待其完全冷却凝固。取 3 μL PCR 扩增产物和 DNA Marker 在 1% 的琼脂糖凝胶中电泳分离，电泳仪电压设置 160 V，时间 25 min。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，测序工作委托生工生物工程有限公司完成。本实验所得序列均已上传至 NCBI 数据库，登录号见表 4。

表 4 样品序列 NCBI 登录号
Table 4 NCBI accession numbers of experimental sample sequences

样品编号	NCBI 登录号	样品编号	NCBI 登录号	样品编号	NCBI 登录号
JSPACM-66-3	OR789789	JSPACM-66-39	OR836833	JSPACM-66-52	OR786817
JSPACM-66-4	OR786823	JSPACM-66-40	OR836834	JSPACM-66-70	OR789613
JSPACM-66-5-2	OR786824	JSPACM-66-45	OR789358	JSPACM-66-71	OR789614
JSPACM-66-6-1	OR786825	JSPACM-66-46	OR789359	JSPACM-66-72	OR789615
JSPACM-66-8	OR789602	JSPACM-66-47	OR789360	JSPACM-66-73	OR784417
JSPACM-66-10	OR786826	JSPACM-66-65	OR789361	JSPACM-66-61	OR789608
JSPACM-66-11	OR786827	JSPACM-66-66	OR789362	JSPACM-66-56	OR789609
JSPACM-66-12	OR786828	JSPACM-66-67	OR789488	JSPACM-66-74	OR786820
JSPACM-66-13	OR789603	JSPACM-66-48	OR789445	JSPACM-66-75	OR786821
JSPACM-66-16	OR786829	JSPACM-66-49	OR789446	JSPACM-66-62	OR789610
JSPACM-66-17	OR789604	JSPACM-66-63	OR789450	JSPACM-66-44	OR789611
JSPACM-66-18	OR786830	JSPACM-66-69	OR789451	JSPACM-66-55	OR789612
JSPACM-66-21	OR836831	JSPACM-66-79	OR789363	JSPACM-66-76	OR786818
JSPACM-66-22-2	OR836832	JSPACM-66-50	OR789607	JSPACM-66-77	OR786819
JSPACM-66-23	OR789605	JSPACM-66-51	OR786816	JSPACM-66-78	OR786822

2.4 序列数据的拼接及分析

利用 DNAMAN 和 SnapGene 软件对测序所得序列及测序峰图进行检查,校正及拼接,然后在 NCBI 中运用 Blast 程序进行相似性检索,以确定基因片段的准确性并进行物种鉴定,保留相同长度的同源序列用于后续遗传分析。利用 MEGA 11.0 和 DnaSP6 软件统计分析黑蚱种内变异位点、碱基组成情况及蝉蜕相对于混淆品的标志性位点。将确定的序列以及 GenBank 下载的 22 个蝉科 (Cicadidae) 物种的序列用 MEGA 11.0 软件基于 ClustalW 算法进行多序列比对,整理所得数据,分析序列类型,计算和分析种内和种间的 K2P 遗传距离。选择带柄角蝉 *Platycotis vittata* 作为发育树的外类群,利用邻接法 (neighbor-joining method, NJ),选择 K2P 遗传距离模型,同时采用 Bootstrap 重复抽样 1 000 次用以检验分子系统树各分支的置信度,对所有序列

构建系统发育树。

3 结果与分析

3.1 DNA 提取及 PCR 扩增

首先对从徐州黑蚱养殖基地不同树种上随机采集的 5 种蝉卵样品进行了 DNA 鉴定分析,蝉卵 DNA 提取质量浓度较高,可达 500~1 000 ng/μL,PCR 扩增均可成功扩增出目的条带,不同树种蝉卵均鉴定为黑蚱,确定了徐州养殖基地的蝉蜕原动物品种为药典规定基原品种黑蚱,见图 1。

后续使用蝉蜕样品进行实验,以蝉卵样品 L3 作为阳性对照。蝉蜕 DNA 提取结果显示 (图 2),提取的蝉蜕样品 DNA 质量浓度大多在 20~40 ng/μL,扩增后少部分样品出现扩增失败的现象,但总体上大多数样品可成功扩出目的条带,将扩增成功样品送至生工公司测序,本实验共获得蝉蜕样品 DNA 序列 45 条。

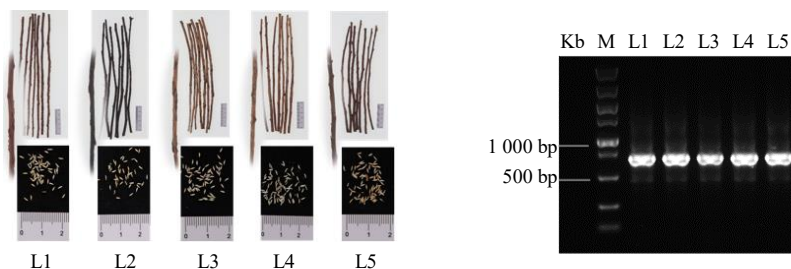


图 1 蝉卵样品形态及 PCR 扩增结果
Kb-阴性对照, M-Marker, L1-李树, L2-梨树, L3-杨树, L4-桃树, L5-苹果树。
Kb-negative control, M-Marker, L1-plum trees, L2-pear trees, L3-poplar trees, L4-peach trees, L5-apple trees.

图 1 蝉卵样品形态及 PCR 扩增结果
Fig. 1 Morphological diagram of cicada eggs and the results of PCR amplification

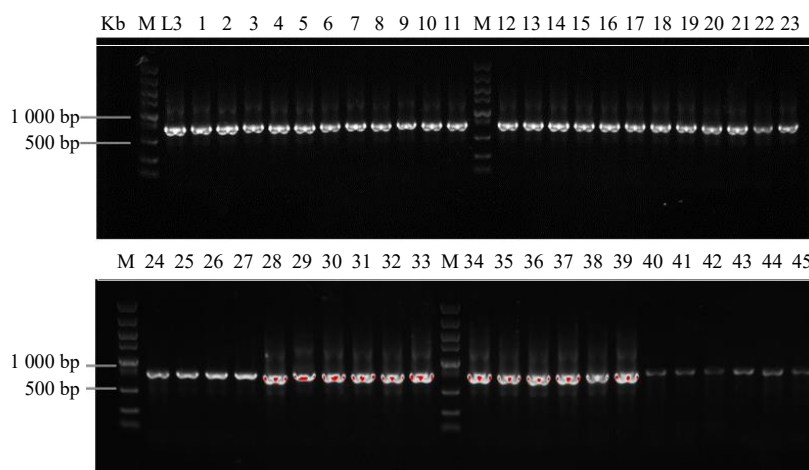


图 2 各样品 PCR 扩增结果
Kb-阴性对照, M-Marker, L3-阳性对照, 1~17-商品蝉蜕药材, 18~23、28-震旦大马蝉蜕, 24~25-南蚱蝉蜕, 26~27-阳明山蟬蟬蜕, 29~45-自采蝉蜕。
Kb-negative control, M-marker, L3-positive control, 1—17-commercial cicadae periostracum, 18—23, 28-*M. pili*, 24—25-*C. holsti*, 26—27-*T. sozanensis* 29—45-self-harvested *Cicadae Periostracum*.

图 2 各样品 PCR 扩增结果
Fig. 2 Results of PCR amplification of each sample

3.2 黑蚱单倍型分析及标志性位点分析

黑蚱的 34 条种内序列，其序列长度为 658 bp，所有位点中，A、G、C 和 T 碱基平均含量分别为 26%、16.7%、13.9% 和 43.4%，GC 含量为 30.1%~30.8%，平均 GC 含量为 30.6%，A+T 含量明显高于 G+C 含量，表现为明显的 A+T 碱基偏嗜，符合昆虫线粒体基因碱基组成的基本特征^[25]。序列分为 11 个单倍型（A1~A11），A3 为主要单倍型，有 16 个样品。序列共 638 个保守位点，20 个突变位点（15 个简约信息位点，5 个单突变位点），其转换/颠换值为 5.67，变异位点详细情况见表 4。黑蚱单倍型多样性（Hd）为 0.761 1，核苷酸多样性（Pi）为 0.008 51，意味着本实验黑蚱种群是由多个地方种群混合而成的大而稳定的群体（单倍型多样性以 0.5 为临界值，核苷酸多样性以 0.005 为临界值，二者的值越大，群体的多样性程度越高）^[20]。

对黑蚱的 11 个单倍型序列以及混淆品序列进

表 4 黑蚱种内变异位点情况

Table 4 Intraspecific mutation sites in <i>C. atrata</i>			
变异类型	变异位点/bp	总数	
颠换	C-G	524	3
	A-T	526	
	T-A	644	
转换	T-C	19、157、310、343、495、653	17
	A-G	67、190、217、223、361、433、482、514、541、550、580	

行比对分析并筛选黑蚱序列的标志性位点，统计出黑蚱的标志性位点共有 9 处，分别位于黑蚱序列的第 136、157、169、312、322、352、424、514、532 bp 处，其中，在 136 bp 与 157 bp 处，黑蚱所有序列的碱基均为 C，而混淆品序列的碱基均为 T；在 312 bp 处，黑蚱碱基为 A，而混淆品序列碱基均为 G。在这 9 处位点中，黑蚱的所有单倍型序列一致并与所有混淆品序列不同，可考虑作为黑蚱的标志性位点与其他混伪品区分，详细位点信息见表 5。

表 5 黑蚱标志性位点情况

Table 5 Iconic sites in *C. atrata*

品种	种类/位点								
	136	157	169	312	322	352	424	514	532
黑蚱	C	C	C	A	G	C	C	G	C
震旦大马蝉	T	T	A	G	A	A	A	T	T
南蚱蝉	T	T	T	G	A	A	T	T	T
阳明山蟬蟬	T	T	T	G	A	T	T	T	T
带蚱蝉	T	T	T	G	A	A	G	A	T
松寒蝉	T	T	A	G	A	T	A	T	T
蟋蟀	T	T	T	G	A	A	T	T	T
中华螻蛄	T	T	A	G	A	A	T	A	T
蒙古寒蝉	T	T	A	G	T	T	A	T	T
绿草蝉	T	T	A	G	T	T	A	A	G

3.3 K2P 遗传距离分析

基于 K2P 双参数模型的黑蚱种内种间遗传距离见表 6，对不同种类蝉蜕样本进行分析，显示种内遗传距离 0~0.018 4，平均 0.006 1，种间遗传距离 0.077 7~2 383，平均 0.190 5，种间平均遗传距离是种内的 31.18 倍，种内最大遗传距离远小于种间最小遗传距离，能形成一定的 DNA 条形码间隙。其中中华螻蛄和绿草蝉种间遗传距离最大，为 0.238 3，南蚱蝉和带蚱蝉种间遗传距离最小，为 0.077 7，均大于 Hebert 等^[26]所推荐的物种鉴定最小种间距离 0.020，显示各自在分子水平已达到种级水平的分化。

3.4 系统发育树的构建

利用 NJ 法构建的系统进化树如图 3，从 NJ 树

图可以看出，10 种蝉类主要形成 3 个类群，类群 I 包括黑蚱（GP-1）、南蚱蝉（GP-3）、带蚱蝉（GP-5）和中华螻蛄（GP-8），黑蚱与南蚱蝉和带蚱蝉亲缘关系较近，聚为一支，且进化地位较高，位于进化树上部，置信度为 99%，其中南蚱蝉和带蚱蝉以 78% 的置信度聚为一亚支。类群 II 包括蒙古寒蝉（GP-9）、松寒蝉（GP-6）、震旦大马蝉（GP-2）和阳明山蟬蟬（GP-4），其中蒙古寒蝉与松寒蝉以高支持率（93%）聚为姐妹分支，显示亲缘关系较近。类群 III 包括蟋蟀（GP-7）与绿草蝉（GP-10），其与黑蚱及其他几种蝉类亲缘关系较远。物种之间可明显分开，可以清晰地区分黑蚱及其混淆品和近缘种，说明该段序列能够作为黑蚱分子鉴定的依据。

表 6 黑蚱及其混淆品种群内 (对角线值) 及种群间遗传距离
Table 6 Genetic distance within (diagonal value) and among populations of *C. atrata* and its adulterants

居群	遗传距离									
	Gp-1	Gp-2	Gp-3	Gp-4	Gp-5	Gp-6	Gp-7	Gp-8	Gp-9	Gp-10
Gp-1	0.008 5									
Gp-2	0.206 9	0.003 6								
Gp-3	0.100 0	0.213 7	0.005 2							
Gp-4	0.182 1	0.152 7	0.186 7	0.008 1						
Gp-5	0.086 9	0.196 8	0.077 7	0.191 5	0					
Gp-6	0.181 6	0.153 0	0.195 4	0.176 7	0.185 3	0.012 4				
Gp-7	0.213 2	0.217 4	0.192 1	0.205 6	0.180 0	0.188 0	0			
Gp-8	0.195 7	0.212 9	0.198 4	0.210 3	0.184 5	0.228 9	0.206 4	0.018 4		
Gp-9	0.188 1	0.147 6	0.181 7	0.145 4	0.178 1	0.101 7	0.197 4	0.222 8	0.000 8	
Gp-10	0.219 0	0.227 9	0.206 1	0.207 3	0.203 0	0.223 2	0.176 3	0.238 3	0.187 5	0.004 2

Gp-1~Gp-10 依次为黑蚱、震旦大马蚱、南蚱、阳明山蚱、带蚱、松寒蚱、蟋蟀、中华螳螂、蒙古寒蚱、绿草蚱, 图 3 同。
Gp-1~Gp-10: *C. atrata*, *M. pili*, *C. holsti*, *T. sozanensis*, *C. facialis*, *M. opalifera*, *P. kaempferi*, *A. atrofasciatus*, *M. mongolica*, *M. hebes*, same as Fig. 3.

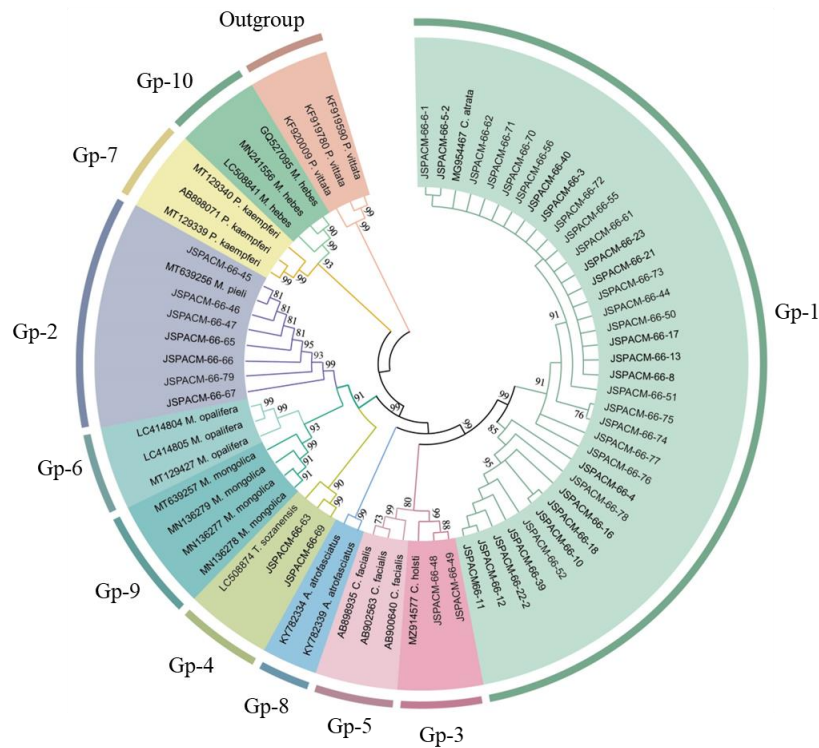


图 3 基于 COI 序列构建的蚱蜱及其混淆品的 NJ 树
Fig. 3 NJ tree of *C. atrata* and its adulterants based on COI gene sequence

4 讨论

近年来蚱蜱的临床应用范围日益扩大, 但当前蚱蜱品种混乱, 《中国药典》中仅有性状描述, 难以准确鉴定。现有蚱蜱的鉴定研究局限于性状、显微鉴定, 如牛跃华等^[27]对浙江产蚱蜱和三种近缘种

蚱蜱进行了性状比较研究, 并系统地总结了性状特征。苑冬敏等^[28]以动物药残留毛的显微特征, 如刚毛的直径、长度、毛窝直径等参数为依据, 对中药蚱蜱及其易混淆品进行了鉴别。郭利霄等^[29]运用 3D 景深合成技术, 从蚱蜱样品喙的长短, 上、下唇突

出的程度及其上横沟的颜色、足部主刺和侧刺的数量等方面对 50 批蝉蜕及其混淆品样品进行鉴别。传统性状鉴定方法依赖主观经验,对鉴定人的专业素质要求较高,且培养周期长;显微鉴定在近缘种动物药材鉴定上存在一定局限性。因此,基于 COI 条形码的 DNA 分子鉴定技术以其准确、快速鉴定物种的特点,在众多动物类药材与其混伪品的鉴别研究中,如蛇蜕、梅花鹿皮、穿山甲、龟甲,展现出了优良的鉴定能力。但国内尚未有运用 COI 序列鉴定蝉蜕与其混淆品的相关报道。

蝉蜕采收后需干燥保存,且药材多附着泥沙等杂质,存储过程中表面易发生虫蛀或霉变,导致提取的 DNA 浓度较低,提取困难。获取高质量 DNA 是 DNA 分子鉴定的基础^[30]。刘旭朝等^[31]通过对动物药材 DNA 提取方法进行优化,使用优化的裂解液配方,实现了对蝉蜕等提取困难样本 DNA 的提取。但本研究发现,使用 SDS 法自配试剂提取 DNA 有一定的局限性,比如在用乙醇洗涤 DNA 沉淀时,由于蝉蜕 DNA 含量较低,常常看不到沉淀产生或者沉淀较少,在吸去液体时容易造成 DNA 损耗,使得提取 DNA 效率很低。为得到优良的 DNA 模板,本研究反复实验及优化调整,发现提取 DNA 时应选择无虫蛀、无霉变的药材;并对蝉蜕进行样品前处理,依次用水、75%的乙醇清洗表面,尽量去除泥沙等杂质;研磨应迅速、充分,研磨的越细越有利于消化;取样量适当(20~30 mg,不宜过多或过少);水浴时间延长至 3 h 及以上,使细胞充分裂解释放 DNA;将原有试剂盒中洗涤的操作重复 1 次,可更好去除蛋白质。

本研究运用 COI 通用引物,优化 DNA 提取过程,成功扩增出 45 批蝉蜕正品及混淆品 COI 条形码序列。K2P 遗传距离分析表明黑蚱种间平均遗传距离是种内的 31.18 倍,种内最大遗传距离远小于种间最小遗传距离,能形成一定的 DNA 条形码间隙。NJ 树结果表明黑蚱及其他几种蝉类亲缘关系较远,物种之间可明显分开,表明 COI 序列针对黑蚱和混淆品的区分有效。由此可见,基于 COI 序列的 DNA 条形码技术能高效、准确地鉴别中药材蝉蜕及其混淆品,可有效保障蝉蜕药材质量及其临床有效性。在 NJ 树结果分析中还发现,黑蚱聚为一类,其中大部分江苏产地的黑蚱样品序列在同一亚支,河南、山东等产地的黑蚱样品序列分别聚在另一亚支,呈现了依产地聚类的趋势,表明黑蚱的不同地理种

群可能存在差异性。后续将继续收集各产地的样本,进一步对黑蚱的遗传多样性进行分析研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 36.
- [2] 周尧. 中国蝉科志(同翅目:蝉总科) [M]. 香港: 香港天则出版社, 1997.
- [3] 李军德, 黄璐琦, 曲晓波. 中国药用动物志 [M]. 第 2 版. 福州: 福建科学技术出版社, 2013: 46.
- [4] 徐鹏翔. 王书臣教授治疗慢性咳嗽病经验总结及诊治特发性肺纤维化经验的数据挖掘 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2017.
- [5] 郭敏. 蝉蜕在肺系疾病中的临床运用 [J]. 中医研究, 2013, 26(1): 44-45.
- [6] 文丹丹, 王敏. 蝉蜕及其配伍治疗哮喘的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(3): 242-245.
- [7] 曹馨慈. 蝉蜕商品调查与质量评价研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2020.
- [8] Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L, *et al.* Biological identifications through DNA barcodes [J]. *Proc R Soc Lond B*, 2003, 270(1512): 313-321.
- [9] 陈士林, 姚辉, 宋经元, 等. 基于 DNA barcoding (条形码) 技术的中药材鉴定 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2007, 9(3): 7-12.
- [10] 王馨, 尹光耀, 张志飞, 等. 北柴胡特异 DNA 条形码筛选及种质资源鉴定 [J]. 中草药, 2023, 54(17): 5703-5715.
- [11] 高必兴, 齐景梁, 钟红, 等. 藏药兔耳草常用基原的 ITS2 序列鉴定研究 [J]. 中草药, 2022, 53(21): 6857-6864.
- [12] 常晶茹, 姚萱航, 张雪薇, 等. 黄芪属植物 DNA 条形码与聚类分析的研究 [J]. 中草药, 2022, 53(22): 7201-7206.
- [13] 陈士林, 姚辉, 韩建萍, 等. 中药材 DNA 条形码分子鉴定指导原则 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(2): 141-148.
- [14] 中国药典 [S]. 四部. 2020: 26.
- [15] 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.
- [16] 常虹, 郝德君, 肖荣堂, 等. 基于线粒体 COI 基因的齿小蠹属昆虫 DNA 条形码研究 [J]. 昆虫学报, 2012, 55(9): 1075-1081.
- [17] 高晓悦, 赵邕, 郭颖, 等. 地龙及其混淆品原动物的形态及 DNA 双重条形码鉴定 [J]. 中草药, 2020, 51(9): 2530-2537.
- [18] 于文波, 王庆, 魏南, 等. 基于 DNA 条形码技术的浮

- 游动物休眠卵种类鉴定: 以洞庭湖流域常德柳叶湖为例 [J]. 湖泊科学, 2020, 32(1): 154-163.
- [19] 张海燕, 陈光辉, 古丽扎尔·阿不都克力木, 等. 基于 mtDNA COI 基因的新疆部分地区叶蝉的分子鉴定 [J]. 中国农学通报, 2021, 37(36): 119-129.
- [20] 庞中化, 王志刚, 成小兰, 等. 全蝎 DNA 条形码分子鉴定研究 [J]. 中国现代中药, 2019, 21(9): 1192-1196.
- [21] 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]. 药学报, 2016, 51(11): 1784-1790.
- [22] 樊佳佳, 宋明, 宋驰, 等. 中药材蟾皮及其混伪品的 DNA 条形码鉴定研究 [J]. 中国药学杂志, 2015, 50(15): 1292-1296.
- [23] 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.
- [24] 孙永岭, 孙颖慧, 赵宇, 等. 基于微型 DNA 条形码的黄粉蝶亚科的物种鉴定 [J]. 山东林业科技, 2021, 51(5): 1-6.
- [25] 何孟兰, 蔡银枫, 吴道慧, 等. 基于线粒体 COI 基因及形态特征的喜树丛枝植原体主要媒介昆虫种类鉴定 [J]. 植物保护, 2023, 49(1): 262-270.
- [26] Hebert P D N, Ratnasingham S, de Waard J R. Barcoding animal life: Cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species [J]. *Proc R Soc Lond B*, 2003, 270(suppl_1): 6-12.
- [27] 牛跃华, 陈锡林. 浙江中药蝉蜕及其近缘种比较鉴别研究 [J]. 浙江中医学院学报, 2000, 24(2): 68-69.
- [28] 苑冬敏, 康廷国. 动物药残留毛的显微鉴定研究: 蝉蜕及其混淆品的鉴别 [J]. 中国现代应用药学, 2008, 25(1): 31-34.
- [29] 郭利霄, 薛紫鲸, 侯芳洁, 等. 基于 3D 景深合成技术的蝉蜕药材鉴别研究 [J]. 中国药房, 2020, 31(4): 447-451.
- [30] 赵日杂, 张英秀, 王君军, 等. 基于 DNA 条形码鉴别缘毛紫菀及狭苞紫菀 [J]. 中草药, 2022, 53(19): 6167-6173.
- [31] 刘旭朝, 刘金欣, 孙伟, 等. 动物药材 DNA 提取方法优化和市售药材 DNA 条形码鉴定研究 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2017, 19(4): 602-609.

[责任编辑 时圣明]