

# 基于CO I基因的羚羊角及其混伪品的DNA条形码鉴定方法的研究

王桂梅\*,王世伟,席啸虎,张小慧\*(山西省中医院药剂科,太原 030012)

中图分类号 R282.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)01-0077-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.01.20

**摘要** 目的:考察利用细胞色素C氧化酶亚基I(CO I)基因对羚羊角及其混伪品进行分子鉴定的可行性。方法:收集4个地区的羊角类整角、不完整角样品,共7个。比较样品骨塞部位和角质层部位DNA的提取效果,采用聚合酶链式反应(PCR)技术,以通用引物LCO I 490、HCO2198扩增样品的CO I基因,通过凝胶电泳、纯化(取750 bp条带)、测序后,以CO I基因作为条形码比序列,采用NCBI数据库中的Blast软件在线比对,确定收集样品的具体物种。结果:样品以角质层部位进行DNA提取的效果较好(DNA浓度为15.7~22.6 ng/ $\mu$ L,260 nm/280 nm吸光度值为1.73~4.72);在线比对结果显示,所有样品CO I基因的相似性均达到99%,其主要来源于赛加羚羊、藏羚羊、普氏原羚、山羊、绵羊等羊类的角。结论:基于CO I基因的DNA条形码技术可用于羚羊角及其混伪品的鉴定,该技术为羊角类药材的鉴定提供了一种准确、客观的方法。

**关键词** 细胞色素C氧化酶亚基I基因;羚羊角;混伪品;序列比对;鉴定

## Study on DNA Barcode Identification Method of *Saiga tatarica* and Its Adulterants Based on CO I Gene

WANG Guimei, WANG Shiwei, XI Xiaohu, ZHANG Xiaohui (Dept. of Pharmacy, Shanxi Province Hospital of TCM, Taiyuan 030012, China)

则。有效成分含量与产量高峰不一致时,应以有效成分总量率为指标确定,总量率最大值时即为适宜采收期。从金钗石斛生物学特性来看,一年生石斛茎于3月左右开始进行新芽萌发及新芽的养分供给,每年生长1~3个新芽,且一年生茎越健壮,养分含量越多,新芽长势越好<sup>[16]</sup>。若将一年生石斛茎采收,便不会萌发新芽,不利于可持续采收。一年生石斛茎有效成分总量率低于二年生,同时折干率相对于二、三年生也较低,不利于常温下长时间储存运输。大量已有研究<sup>[7,9]</sup>认为因一年生石斛碱含量高而将其确定为最适采收年限是不合理的。本研究综合折干率、多糖含量、总生物碱含量与石斛碱含量,并考虑到植物的开花特性,得出合江金钗石斛二年生12月和1月(第三年开花前)为最适采收期。

### 参考文献

- [1] 张晓敏,孙志蓉,陈龙,等.金钗石斛的化学成分和药理作用研究进展[J].中国现代应用药学,2014,31(7):895-899.
- [2] 胡加玺.合江金钗石斛[J].食品安全导刊,2015,52(23):80-81.
- [3] 徐良.中药栽培实验技术与方法学[M].北京:人民军医出版社,2009:118-119.
- [4] 罗傲雪,范益军,罗傲霜,等.不同提取方法对石斛多糖含量测定的影响[J].中国药房,2010,21(7):601-602.
- [5] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:92-93,283.

\* 主管药师。研究方向:中药鉴定。电话:0351-4174328。E-mail:1053807560@qq.com

# 通信作者:主管药师,硕士。研究方向:中药材质量研究。电话:0351-4174328。E-mail:562390325@qq.com

- [6] 黄明进,罗春丽,赵致,等.贵州兴义四种石斛的多糖和总生物碱含量分析[J].时珍国医国药,2014,25(6):1359-1361.
- [7] 蔡伟,林宏英,张宏桂,等.气相色谱法测定不同采收月份和年限金钗石斛中石斛碱[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(11):62-64.
- [8] 梁欢,胡志刚,卢金清,等.不同生长年限和不同部位金钗石斛中石斛碱含量比较与分析[J].世界科学技术:中医药现代化,2014,16(2):335-338.
- [9] 徐云燕,王令仪,黄彬,等.不同生长期金钗石斛和铁皮石斛中总生物碱及多糖的比较[J].华西药学杂志,2014,29(3):288-291.
- [10] 刘宁.金钗石斛质量控制方法研究[D].北京:北京中医药大学,2009.
- [11] 包英华.铁皮石斛种质资源的鉴定与评价研究[D].广州:广州中医药大学,2014.
- [12] 诸燕,斯金平,郭宝林,等.人工栽培铁皮石斛多糖含量变异规律[J].中国中药杂志,2010,35(4):427-430.
- [13] 俞巧仙,郭英英,斯金平,等.铁皮石斛多糖和醇溶性浸出物动态累积规律研究[J].中国中药杂志,2014,39(24):4769-4772.
- [14] 武孔媛,王文全,金家兴,等.产地和采收时间对美花石斛药材中多糖的影响[J].中草药,2008,39(11):1732-1735.
- [15] 张善宝,周可军,张震,等.云南栽培铁皮石斛适宜采收期研究[J].中国中药杂志,2015,40(18):3549-3552.
- [16] 唐德英,杨春勇,段立胜,等.金钗石斛生物学特性研究[J].时珍国医国药,2007,18(10):2586-2587.

(收稿日期:2017-05-23 修回日期:2017-06-28)

(编辑:刘萍)

**ABSTRACT OBJECTIVE:** To investigate the feasibility of molecule identification of *Saiga tatarica* and its adulterants by using cytochrome C oxidase subunit I (*CO I*) gene. **METHODS:** A total of 7 horns and incomplete horns were collected from 4 areas. The extraction effect of DNA from bone plug and stratum corneum were investigated; PCR technology was used to amplify *CO I* gene of samples using universal primer LCO I 490, HCO2198; after gel electrophoresis, purification (750 bp strip) and sequencing, using *CO I* gene as barcode alignment sequence, online comparison was conducted by using Blast software of NCBI database to determine specific species. **RESULTS:** The extraction of DNA from stratum corneum was better (DNA concentration was 15.7-22.6 ng/ $\mu$ L, the absorbance of 260 nm/280 nm was 1.73-4.72). Online comparison showed that the similarity of *CO I* gene in all samples reached 99%, mainly from the horns of saiga antelope, Tibetan antelope, gazelle, sheep and goats. **CONCLUSIONS:** DNA barcode technology based on *CO I* gene can be used for the identification of *S. tatarica* and its adulterants. The technology can provide an accurate and objective method for the identification of horn medicinal materials.

**KEYWORDS** Cytochrome C oxidase subunit I; *Saiga tatarica*; Adulterants; Sequence alignment; Identification

牛科动物赛加羚羊的角是羚羊角药材的法定来源,但是市场上存在多种羊角类混伪品,如山羊角、绵羊角、黄羊角等。传统鉴定主要依赖样品的完整性及经验丰富的鉴定专家,一般药材验收人员难以鉴定。现代分子生物学技术可通过分析样品的遗传物质,从而实现物种的鉴定,不受样品存在状态的影响。动物线粒体中的细胞色素C氧化酶亚基I(*CO I*)基因被认为是全球动物物种鉴定的通用条形码<sup>[1]</sup>,其片段序列可作为一种新的物种身份识别系统,常采用聚合酶链反应技术(PCR)获得*CO I*基因序列,然后通过DNA提取、扩增、测序、比对等步骤来分析正品及其混伪品。该技术已被证实可用于多种动物药材的不同组织样品的鉴定<sup>[2-5]</sup>,并取得了较好的研究结果。然而,该技术对坚硬样品(如羚羊角)鉴定的可行性尚缺乏深入研究。鉴于此,笔者收集了多种羊角类不同存在状态(整角、丝、不完整角)的样品,以*CO I*基因为目的基因,通过比较对骨塞部位与角质层部位DNA的提取效果后,采用PCR技术,以通用引物LCO I 490、HCO2198扩增样品的*CO I*基因,通过测序序列比对确定收集样品的具体物种来源,从而为羊角类药材的鉴定提供一种准确、客观的方法。

## 1 材料

### 1.1 仪器

BSA124S型电子天平(上海赛多利斯贸易有限公司);LX-200型迷你离心机(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);T960型PCR热循环仪(杭州晶格科学仪器有限公司);DYY-6B型稳压稳流电泳仪(北京市六一仪器厂);ZF-258型全自动凝胶成像仪(上海嘉鹏科技有限公司);Nano Drop 2000型DNA浓度测试仪(美国赛默飞世尔科技公司)。

### 1.2 药材与试剂

共收集4个不同地区的羊角类整角、不完整角样品7个;离心柱型血液/细胞/组织基因组DNA提取试剂盒(批号:Q5330)、普通DNA产物纯化试剂盒(批号:DP204)均购自天根生化科技有限公司;DL 2000 DNA Marker(100~2 000 bp)(大连宝生物工程有限公司,批号:A1801A);6倍浓度的核酸样品用上样缓冲液[大连宝生物工程(大连)有限公司,批号:A301A];2×Easy Taq SuperMix PCR反应预混液(北京全式金生物技术有限公

司,批号:J11122);Gold View I型核酸染色剂、二硫苏糖醇(DTT)、葡聚糖凝胶、三羟甲基氨基甲烷(TRIS)、二水合乙二胺四乙酸二钠(EDTA- $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )等均购自北京索来宝生物科技有限公司(批号分别为20160217、20160603、20150902、121750709、308D061)。样品信息详见表1,实物图详见图1。

表1 样品信息

Tab 1 Sample information

样品种类	编号	样品名称(性状)	样品存放时间	收集地点
羊角类	1	羚羊角(整角)	15年	安徽亳州
	2	未知角(丝)	5年	安徽亳州
	3	未知角(块)	13年	安徽亳州
	4	藏羚羊角(整角)	12年	西藏那曲
	5	黄羊角(整角)	3年	新疆库车
	6	山羊角(整角)	2年	河北安国
	7	绵羊角(整角)	3年	河北安国

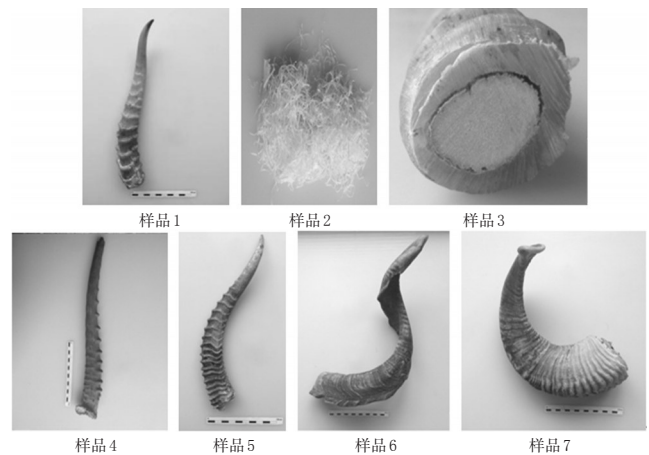


图1 7种样品实物图

Fig 1 Material object pictures of 7 kinds of samples

## 2 方法与结果

### 2.1 骨塞部位DNA的提取

**2.1.1 脱钙液的制备** 称取186.1 g的EDTA- $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,加入800 mL蒸馏水中,磁力搅拌器搅拌,滴管滴加NaOH溶液(1mol/L),用pH计调节pH至8.0,然后用蒸馏水定容至1 L,配成0.5 mol/L的EDTA(pH 8.0)脱钙液,高压灭菌后备用<sup>[6]</sup>。

**2.1.2 脱钙时间及脱钙次数的考察** 取样品3,用电锯切割横截面,将骨塞部位取出,用干净刀片削取骨塞成

粉末。然后称取样品粉末5份(编号1~5),每份25 mg,加入5倍取样量的EDTA(pH 8.0)脱钙液,分别在4℃下脱钙12、24、48、72、84 h(每24 h更换1次脱钙液),5 000×g离心3 min,弃脱钙液,其余按试剂盒提取步骤提取样品总DNA,并测定DNA的浓度及纯度,以260 nm/280 nm波长样品吸光度(A)的比值( $A_{260}/A_{280}$ )考察提取DNA的质量,纯DNA的 $A_{260}/A_{280} \approx 1.8$ 。 $A_{260}/A_{280} < 1.8$ ,提示有蛋白质或苯酚污染; $A_{260}/A_{280} > 1.8$ ,说明样品中含有RNA<sup>[7]</sup>。样品3骨塞部位不同脱钙时间的DNA提取效果见表2。

表2 样品3骨塞部位不同脱钙时间的DNA提取效果  
Tab 2 DNA extraction effects of bone plug in sample 3 at different decalcification time

取样编号	脱钙时间,h	DNA浓度,ng/ $\mu$ L	$A_{260}/A_{280}$
1	12	5.0	2.43
2	24	7.5	4.45
3	48	9.7	2.38
4	72	4.2	2.28
5	84	2.1	2.83

结果,脱钙12~48 h,样品未完全裂解,但随着脱钙时间延长,DNA浓度升高;脱钙48~84 h,样品裂解透彻,但提取的DNA浓度降低。提示选择骨塞部位提取DNA,易受提取时间和提取次数的影响,提取时间过短,样品裂解不完全;提取时间过长和提取次数过多,DNA被破坏,提取的DNA浓度低,无法进行下一步的PCR操作。所以,角类药材的DNA提取研究,应避免取骨塞部位。为有效提取角类药材的DNA,笔者取角质层部位,进一步研究其DNA的提取方法。

## 2.2 角质层部位DNA的提取方法研究

2.2.1 取样 整角样品用电锯切割横截面成片状,取片状横截面,用小刀刮去外层污染后,削成细薄片,备用;丝状样品用75%乙醇清洗3次,双蒸水冲洗至无醇味,紫外光下照射,晾干,消毒剪成碎片,备用。

2.2.2 DTT对角质层部位DNA提取效果的影响 称取羚羊角细薄片(样品3)30 mg,加入蛋白酶K 20  $\mu$ L及裂解缓冲液200  $\mu$ L后,56℃金属浴过夜裂解,此时样品几无变化。称取羚羊角细薄片(样品3)30 mg,加入DTT 100  $\mu$ L、蛋白酶K 20  $\mu$ L及裂解缓冲液200  $\mu$ L,56℃金属浴裂解30 min后,样品裂解明显。可见,加入DTT可促进样品裂解。

2.2.3 样品3角质层部位DNA提取效果 在预试基础上,称取羚羊角细薄片(样品3)25 mg,加入DTT 20  $\mu$ L、蛋白酶K 20  $\mu$ L及裂解缓冲液200  $\mu$ L,56℃金属浴裂解3 h,裂解透彻后,按试剂盒提取步骤提取角质层样品总DNA。结果,DNA浓度为16.2 ng/ $\mu$ L,远高于骨塞部位的DNA浓度,且提取时间短,故后文选取骨质层部位进行DNA提取。

2.2.4 所有样品角质层部位DNA提取效果 分别取7种样品各25 mg,按“2.2.3”项下方法进行DNA提取。结果,所有样品DNA浓度均高于15.0 ng/ $\mu$ L,样品1和样品5的 $A_{260}/A_{280}$ 接近1.8,证明蛋白质去除干净,其余样品的 $A_{260}/A_{280} > 1.8$ ,说明样品中可能含有降解的RNA,所有样

品的提取结果见表3。

表3 所有样品的DNA提取效果

Tab 3 DNA extraction effects of all samples

样品编号	样品名称(性状)	DNA浓度,ng/ $\mu$ L	$A_{260}/A_{280}$
1	羚羊角(整角)	17.6	1.73
2	未知角(丝)	22.6	3.48
3	未知角(块)	16.2	4.72
4	藏羚羊角(整角)	15.8	4.38
5	黄羊角(整角)	19.8	1.79
6	山羊角(整角)	21.2	2.36
7	绵羊角(整角)	15.7	2.13

## 2.3 PCR扩增、纯化和测序

PCR扩增程序参考文献[8]。反应体系总体积为25  $\mu$ L,包括DNA模板10  $\mu$ L,正、反向引物各1  $\mu$ L(浓度均为10 mmol/L),2×Easy Taq SuperMix预混液12.5  $\mu$ L,最后用双蒸水补足体系体积至25  $\mu$ L。用含有Gold View I型核酸染色剂的1.5%琼脂糖凝胶点样,在TBE缓冲液(由TRIS、硼酸、EDTA混合配制而成)中电泳;凝胶成像仪成像,割取750 bp的条带,按纯化试剂盒说明书操作纯化后送上海桑尼公司测序。7种样品PCR扩增的电泳图见图2。

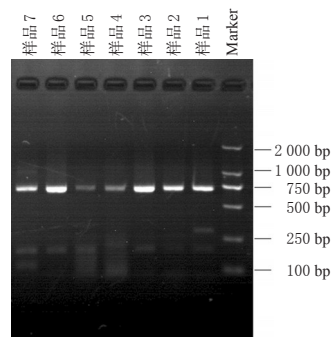


图2 7种样品PCR扩增的电泳图

Fig 2 Electropherogram of PCR amplification in 7 samples

## 2.4 序列比对与鉴定

所有样品均成功测序后,采用DNASTar软件中的MegAlign进行多序列比对,分析所收集的7个样品的CO I基因序列的相似与差异。其中,羚羊角、未知角丝、未知角块的序列相同,并与其余角类序列有差异。进一步用NCBI数据库中的Blast软件在线比对各序列在数据库所对应的物种来源。结果,各样品序列与数据库中的序列相似性均达到99%,确定了未知不完整样品的具体物种,鉴定了黄羊角的原动物为普氏原羚角,同时证明收集的其余样品的物种名称均是正确的。7种样品多序列比对结果见图3,鉴定结果见表4。

## 3 讨论

线粒体基因中的细胞色素氧化酶基因有3个亚基:CO I、CO II、CO III基因,其中CO I基因相对保守,其序列能够区分物种差异,已用在鱼类、鸟类、两栖类等物种的鉴定与识别上,是动物物种鉴定的通用条形码。近年用CO I基因鉴定的动物药材品种有广地龙<sup>[3]</sup>、蛤蚧<sup>[9]</sup>、药用软体动物<sup>[10]</sup>、金钱白花蛇<sup>[4]</sup>等,并取得较好的鉴定结

Majority	羚羊角 SEQ	未知角 SEQ	未知角 SEQ	未知角 SEQ	未知角 SEQ	未知角 SEQ	未知角 SEQ	未知角 SEQ	未知角 SEQ
..... TGGTCAAC - AAATCATAA - AGATATTGGCACTCTGTA --- CCTCCTATTT	..... TATAA - AGATATTGGCACTCTGTA --- CCTCCTATTT	..... TGGTCAACAAATCATAA - AGATATTGGCACTCTGTA --- CCTCCTATTT	..... TGGTCAACAAATCATAA - AGATATTGGCACTCTGTA --- CCTCCTATTT	..... TGGTCAAC - AAATCATAA - AGATATTGGCACTCTGTA --- CCTCCTATTT	..... CGTTGGTCAACAAATCATAA - AGATATTGGCACTCTGTA --- TCTCCTATTT	TTTAATAAGATAGCAACAA - CGCTCAAGGATGGTGTGATAGTCTCCTCTTT	..... TTGGTCAAC - AAATCATAA - AGATATTGGCACTCTGTA --- CCTCCTATTT	..... TTGGTCAAC - AAATCATAA - AGATATTGGCACTCTGTA --- CCTCCTATTT	..... TTGGTCAAC - AAATCATAA - AGATATTGGCACTCTGTA --- CCTCCTATTT
GGTGCCCTGAGCTGGTATAGTAGGAAC - GCCTAAGCCCTACTAA - --- TCGTGGCGAAATAGGC	GCTGCTCGAAGCCGATAGTAGGAAC - GCCTAAGCCCTACTAA - --- TCGTGGCGAAATAGGC	GGTGCCCTGAGCTGGTATAGTAGGAAC - GCCTAAGCCCTACTAA - --- TCGTGGCGAAATAGGC	GGTGCCCTGAGCTGGTATAGTAGGAAC - GCCTAAGCCCTACTAA - --- TCGTGGCGAAATAGGC	GGTGCCCTGAGCTGGTATAGTAGGAAC - GCCTAAGCCCTACTAA - --- TCGTGGCGAAATAGGC	GGTGCCCTGAGCTGGTATAGTAGGAAC - GCCTAAGCCCTACTAA - --- TCGTGGCGAAATAGGC	GGTGCCCTGAGCTGGTATAGTAGGAAC - GCCTAAGCCCTACTAA - --- TCGTGGCGAAATAGGC	GGTGCCCTGAGCTGGTATAGTAGGAAC - GCCTAAGCCCTACTAA - --- TCGTGGCGAAATAGGC	GGTGCCCTGAGCTGGTATAGTAGGAAC - GCCTAAGCCCTACTAA - --- TCGTGGCGAAATAGGC	GGTGCCCTGAGCTGGTATAGTAGGAAC - GCCTAAGCCCTACTAA - --- TCGTGGCGAAATAGGC
CAACCCGGAACTCCTCGGATGACCAAGTCTATAAAGTGAAGTCTAAAC - --- CGCATGCGCTT	CAACCCGGAACTCCTCGGATGACCAAGTCTATAAAGTGAAGTCTAAAC - --- CGCATGCGCTT	CAACCCGGAACTCCTCGGATGACCAAGTCTATAAAGTGAAGTCTAAAC - --- CGCATGCGCTT	CAACCCGGAACTCCTCGGATGACCAAGTCTATAAAGTGAAGTCTAAAC - --- CGCATGCGCTT	CAACCCGGAACTCCTCGGATGACCAAGTCTATAAAGTGAAGTCTAAAC - --- CGCATGCGCTT	CAACCCGGAACTCCTCGGATGACCAAGTCTATAAAGTGAAGTCTAAAC - --- CGCATGCGCTT	CAACCCGGAACTCCTCGGATGACCAAGTCTATAAAGTGAAGTCTAAAC - --- CGCATGCGCTT	CAACCCGGAACTCCTCGGATGACCAAGTCTATAAAGTGAAGTCTAAAC - --- CGCATGCGCTT	CAACCCGGAACTCCTCGGATGACCAAGTCTATAAAGTGAAGTCTAAAC - --- CGCATGCGCTT	CAACCCGGAACTCCTCGGATGACCAAGTCTATAAAGTGAAGTCTAAAC - --- CGCATGCGCTT
TGTAAATAATTTCTTTTAGTAAGTGCCTATTATAAATGGGGATTGGCACTGACTAGTCCCTC	TGTAAATAATTTCTTTTAGTAAGTGCCTATTATAAATGGGGATTGGCACTGACTAGTCCCTC	TGTAAATAATTTCTTTTAGTAAGTGCCTATTATAAATGGGGATTGGCACTGACTAGTCCCTC	TGTAAATAATTTCTTTTAGTAAGTGCCTATTATAAATGGGGATTGGCACTGACTAGTCCCTC	TGTAAATAATTTCTTTTAGTAAGTGCCTATTATAAATGGGGATTGGCACTGACTAGTCCCTC	TGTAAATAATTTCTTTTAGTAAGTGCCTATTATAAATGGGGATTGGCACTGACTAGTCCCTC	TGTAAATAATTTCTTTTAGTAAGTGCCTATTATAAATGGGGATTGGCACTGACTAGTCCCTC	TGTAAATAATTTCTTTTAGTAAGTGCCTATTATAAATGGGGATTGGCACTGACTAGTCCCTC	TGTAAATAATTTCTTTTAGTAAGTGCCTATTATAAATGGGGATTGGCACTGACTAGTCCCTC	TGTAAATAATTTCTTTTAGTAAGTGCCTATTATAAATGGGGATTGGCACTGACTAGTCCCTC
TAATAATTGGCGCCCTGACATAGCAATTCCCGGAATAAATAAGCTTCTGAC - TTCTTCC	TAATAATTGGCGCCCTGACATAGCAATTCCCGGAATAAATAAGCTTCTGAC - TTCTTCC	TAATAATTGGCGCCCTGACATAGCAATTCCCGGAATAAATAAGCTTCTGAC - TTCTTCC	TAATAATTGGCGCCCTGACATAGCAATTCCCGGAATAAATAAGCTTCTGAC - TTCTTCC	TAATAATTGGCGCCCTGACATAGCAATTCCCGGAATAAATAAGCTTCTGAC - TTCTTCC	TAATAATTGGCGCCCTGACATAGCAATTCCCGGAATAAATAAGCTTCTGAC - TTCTTCC	TAATAATTGGCGCCCTGACATAGCAATTCCCGGAATAAATAAGCTTCTGAC - TTCTTCC	TAATAATTGGCGCCCTGACATAGCAATTCCCGGAATAAATAAGCTTCTGAC - TTCTTCC	TAATAATTGGCGCCCTGACATAGCAATTCCCGGAATAAATAAGCTTCTGAC - TTCTTCC	TAATAATTGGCGCCCTGACATAGCAATTCCCGGAATAAATAAGCTTCTGAC - TTCTTCC
CCCTTCTTCTGCTACTCTGACATCTCTAATAGTGGGAGGAGCAAGGAAAGCTGAACTG	CCCTTCTTCTGCTACTCTGACATCTCTAATAGTGGGAGGAGCAAGGAAAGCTGAACTG	CCCTTCTTCTGCTACTCTGACATCTCTAATAGTGGGAGGAGCAAGGAAAGCTGAACTG	CCCTTCTTCTGCTACTCTGACATCTCTAATAGTGGGAGGAGCAAGGAAAGCTGAACTG	CCCTTCTTCTGCTACTCTGACATCTCTAATAGTGGGAGGAGCAAGGAAAGCTGAACTG	CCCTTCTTCTGCTACTCTGACATCTCTAATAGTGGGAGGAGCAAGGAAAGCTGAACTG	CCCTTCTTCTGCTACTCTGACATCTCTAATAGTGGGAGGAGCAAGGAAAGCTGAACTG	CCCTTCTTCTGCTACTCTGACATCTCTAATAGTGGGAGGAGCAAGGAAAGCTGAACTG	CCCTTCTTCTGCTACTCTGACATCTCTAATAGTGGGAGGAGCAAGGAAAGCTGAACTG	CCCTTCTTCTGCTACTCTGACATCTCTAATAGTGGGAGGAGCAAGGAAAGCTGAACTG
TATATCCTCCTAGCAAGGTAATTTAGCCCAACGAGGCCCTCAAGTAGCACTTAACTATT - TCTC	TATATCCTCCTAGCAAGGTAATTTAGCCCAACGAGGCCCTCAAGTAGCACTTAACTATT - TCTC	TATATCCTCCTAGCAAGGTAATTTAGCCCAACGAGGCCCTCAAGTAGCACTTAACTATT - TCTC	TATATCCTCCTAGCAAGGTAATTTAGCCCAACGAGGCCCTCAAGTAGCACTTAACTATT - TCTC	TATATCCTCCTAGCAAGGTAATTTAGCCCAACGAGGCCCTCAAGTAGCACTTAACTATT - TCTC	TATATCCTCCTAGCAAGGTAATTTAGCCCAACGAGGCCCTCAAGTAGCACTTAACTATT - TCTC	TATATCCTCCTAGCAAGGTAATTTAGCCCAACGAGGCCCTCAAGTAGCACTTAACTATT - TCTC	TATATCCTCCTAGCAAGGTAATTTAGCCCAACGAGGCCCTCAAGTAGCACTTAACTATT - TCTC	TATATCCTCCTAGCAAGGTAATTTAGCCCAACGAGGCCCTCAAGTAGCACTTAACTATT - TCTC	TATATCCTCCTAGCAAGGTAATTTAGCCCAACGAGGCCCTCAAGTAGCACTTAACTATT - TCTC
CCCTCACCTAGCAGGTTGTTTCATCAATTTAGGAGCTATTAATTTTACCAACAATTAATAA	CCCTCACCTAGCAGGTTGTTTCATCAATTTAGGAGCTATTAATTTTACCAACAATTAATAA	CCCTCACCTAGCAGGTTGTTTCATCAATTTAGGAGCTATTAATTTTACCAACAATTAATAA	CCCTCACCTAGCAGGTTGTTTCATCAATTTAGGAGCTATTAATTTTACCAACAATTAATAA	CCCTCACCTAGCAGGTTGTTTCATCAATTTAGGAGCTATTAATTTTACCAACAATTAATAA	CCCTCACCTAGCAGGTTGTTTCATCAATTTAGGAGCTATTAATTTTACCAACAATTAATAA	CCCTCACCTAGCAGGTTGTTTCATCAATTTAGGAGCTATTAATTTTACCAACAATTAATAA	CCCTCACCTAGCAGGTTGTTTCATCAATTTAGGAGCTATTAATTTTACCAACAATTAATAA	CCCTCACCTAGCAGGTTGTTTCATCAATTTAGGAGCTATTAATTTTACCAACAATTAATAA	CCCTCACCTAGCAGGTTGTTTCATCAATTTAGGAGCTATTAATTTTACCAACAATTAATAA
TAAAAACCCCAGCAATATCAACAATTAACAACGCTCTATTGTATGATCTGCTTAACTATTG	TAAAAACCCCAGCAATATCAACAATTAACAACGCTCTATTGTATGATCTGCTTAACTATTG	TAAAAACCCCAGCAATATCAACAATTAACAACGCTCTATTGTATGATCTGCTTAACTATTG	TAAAAACCCCAGCAATATCAACAATTAACAACGCTCTATTGTATGATCTGCTTAACTATTG	TAAAAACCCCAGCAATATCAACAATTAACAACGCTCTATTGTATGATCTGCTTAACTATTG	TAAAAACCCCAGCAATATCAACAATTAACAACGCTCTATTGTATGATCTGCTTAACTATTG	TAAAAACCCCAGCAATATCAACAATTAACAACGCTCTATTGTATGATCTGCTTAACTATTG	TAAAAACCCCAGCAATATCAACAATTAACAACGCTCTATTGTATGATCTGCTTAACTATTG	TAAAAACCCCAGCAATATCAACAATTAACAACGCTCTATTGTATGATCTGCTTAACTATTG	TAAAAACCCCAGCAATATCAACAATTAACAACGCTCTATTGTATGATCTGCTTAACTATTG
GTCCTCCTACTCCTTTTC - ACTTCCGGTACTGCTCCGGCATCAACAATGCTTCTACACAGCCGAA	GTCCTCCTACTCCTTTTC - ACTTCCGGTACTGCTCCGGCATCAACAATGCTTCTACACAGCCGAA	GTCCTCCTACTCCTTTTC - ACTTCCGGTACTGCTCCGGCATCAACAATGCTTCTACACAGCCGAA	GTCCTCCTACTCCTTTTC - ACTTCCGGTACTGCTCCGGCATCAACAATGCTTCTACACAGCCGAA	GTCCTCCTACTCCTTTTC - ACTTCCGGTACTGCTCCGGCATCAACAATGCTTCTACACAGCCGAA	GTCCTCCTACTCCTTTTC - ACTTCCGGTACTGCTCCGGCATCAACAATGCTTCTACACAGCCGAA	GTCCTCCTACTCCTTTTC - ACTTCCGGTACTGCTCCGGCATCAACAATGCTTCTACACAGCCGAA	GTCCTCCTACTCCTTTTC - ACTTCCGGTACTGCTCCGGCATCAACAATGCTTCTACACAGCCGAA	GTCCTCCTACTCCTTTTC - ACTTCCGGTACTGCTCCGGCATCAACAATGCTTCTACACAGCCGAA	GTCCTCCTACTCCTTTTC - ACTTCCGGTACTGCTCCGGCATCAACAATGCTTCTACACAGCCGAA
ATCTAAACCAAACTTTCTTTGACCCAGCAAGGAGGAGGAGCCCTATCTATATCAACACCTATT	ATCTAAACCAAACTTTCTTTGACCCAGCAAGGAGGAGGAGGAGCCCTATCTATATCAACACCTATT	ATCTAAACCAAACTTTCTTTGACCCAGCAAGGAGGAGGAGGAGGAGCCCTATCTATATCAACACCTATT	ATCTAAACCAAACTTTCTTTGACCCAGCAAGGAGGAGGAGGAGGAGCCCTATCTATATCAACACCTATT	ATCTAAACCAAACTTTCTTTGACCCAGCAAGGAGGAGGAGGAGGAGCCCTATCTATATCAACACCTATT	ATCTAAACCAAACTTTCTTTGACCCAGCAAGGAGGAGGAGGAGGAGCCCTATCTATATCAACACCTATT	ATCTAAACCAAACTTTCTTTGACCCAGCAAGGAGGAGGAGGAGGAGCCCTATCTATATCAACACCTATT	ATCTAAACCAAACTTTCTTTGACCCAGCAAGGAGGAGGAGGAGGAGCCCTATCTATATCAACACCTATT	ATCTAAACCAAACTTTCTTTGACCCAGCAAGGAGGAGGAGGAGGAGCCCTATCTATATCAACACCTATT	ATCTAAACCAAACTTTCTTTGACCCAGCAAGGAGGAGGAGGAGGAGCCCTATCTATATCAACACCTATT
TGATTTTTGGTCAACCTGGAAATTTAAAX	TGATTTTTGGTCAACCTGGAAATTTAAAX	TGATTTTTGGTCAACCTGGAAATTTAAAX	TGATTTTTGGTCAACCTGGAAATTTAAAX	TGATTTTTGGTCAACCTGGAAATTTAAAX	TGATTTTTGGTCAACCTGGAAATTTAAAX	TGATTTTTGGTCAACCTGGAAATTTAAAX	TGATTTTTGGTCAACCTGGAAATTTAAAX	TGATTTTTGGTCAACCTGGAAATTTAAAX	TGATTTTTGGTCAACCTGGAAATTTAAAX

图3 7种样品的多序列比对结果

Fig 3 Results of multiple sequence alignment of 7 samples

表4 7种样品的鉴定结果

Tab 4 Identification results of 7 samples

样品编号	样品名称(性状)	鉴定结果	物种拉丁学名
1	羚羊角(整角)	赛加羚羊角	<i>Saiga tatarica</i>
2	未知角(丝)	赛加羚羊角丝	<i>Saiga tatarica</i>
3	未知角(块)	赛加羚羊角片	<i>Saiga tatarica</i>
4	藏羚羊角(整角)	藏羚羊角	<i>Pantholops hodgsonii</i>
5	黄羊角(整角)	普氏原羚角	<i>Procapra gutturosa</i>
6	山羊角(整角)	山羊角	<i>Capra hircus</i>
7	绵羊角(整角)	绵羊角	<i>Ovis aries</i>

果。本文分析用该基因鉴别羊角类药材的可行性,首先分别对骨塞部位和角质部位研究其DNA提取效果,因骨塞部位的DNA提取受脱钙次数和脱钙时间影响,耗时长,且所得DNA浓度较低,因此,角类药材的DNA提

取应避免取骨塞部位。当选择采用角质层部位提取DNA时,在提取时间段内,可获得更高的DNA浓度,虽然羚羊角整角和黄羊角整角的  $A_{260}/A_{280}$  值分别为 1.73 和 1.79,但是接近 1.80,即使有少量蛋白质或苯酚污染对常规 PCR 测定也影响不大。虽然纯的DNA样品要求  $A_{260}/A_{280} \approx 1.8$ ,但在本研究实例中比值大于1.8的DNA提取样品PCR均能成功扩增,且不影响测序。本研究在通过PCR扩增,凝胶电泳、纯化,测序,得出样品的CO I基因序列,通过序列比对,发现各样品序列与数据库中序列的相似性达到99%。根据文献[11-12]对11门13320个物种的CO I基因序列进行比较分析,表明所研究物种的种间平均遗传距离为11.3%,其中79%的物种间遗传距离均大于8%。本研究在线比对结果相似性为99%,差异性小于1%,可确定与数据库中为同一物种。本研究鉴定了羊角类完整样品与不完整样品的物种来源。可见,基于CO I基因的DNA条形码技术可用于羚羊角及其混伪品的鉴定,该技术为羊角类药材的鉴定提供了一种准确、客观的方法。

参考文献

- [1] RAMADAN HAI, BAESHEN N. Biological identifications through DNA barcodes[J]. *Proc Biol Sci*, 2003, 270(1512):313-321.
- [2] 胡嵘,杜鹤,崔丽娜,等.海马、海龙属于CO I条形码的DNA分子鉴定[J]. 吉林中医药, 2012, 32(3):272-276.
- [3] 韦健红,李薇,吴文如,等.基于CO I与16S rRNA基因对广地龙的DNA分子鉴定研究[J]. 中国药房, 2012, 23(35):3274-3278.
- [4] 崔丽娜,杜鹤,张辉,等.基于CO I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):424-427.
- [5] 杜鹤,孙佳明,崔丽娜,等.基于CO I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.
- [6] 李花,涂政,石屹,等.骨骼脱钙后DNA含量损失问题初探[J]. 中国法医学杂志, 2014, 29(2):141-144.
- [7] 陈士林. 中药DNA条形码分子鉴定[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012:13.
- [8] FOLMER O, BLACK M, HOEC W, et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates[J]. *Mol Mar Biol Biotechnoly*, 1994, 3(5):294-299.
- [9] 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.
- [10] 高晓晨,孙佳明,杜鹤,等.中国药用软体动物养殖与DNA条码鉴定[J]. 吉林中医药, 2012, 32(8):820-823.
- [11] HEBER PDN, CYWINSKA A, BALL L, et al. Biological identifications through DNA barcodes[J]. *Proc R Soc Lond B*, 2003.DOI: 10.1098/rspb.2002.2218.
- [12] HEBER PDN, RATNASINGHAM S, DEWAARD JR. Barcoding animal life: cytochrome oxidase subunit I divergences among closely related species[J]. *Proc Biol Sci*, 2003.DOI: 10.1098/rsbl.2003.0025.

(收稿日期:2017-05-19 修回日期:2017-10-13)  
(编辑:林 静)