

· 专题 ·

中华蟾蜍 DNA 条形码鉴定[△]赵群^{1,2}, 张恬¹, 高波³, 李灯林³, 杨艳³, 李军德^{1*}

(1. 中国中医科学院 中药资源中心, 道地药材国家重点实验室培育基地, 北京 100700;
2. 皖西学院, 安徽 六安 237012; 3. 安徽华润金蟾药业股份有限公司, 安徽 淮北 235000)

[摘要] 目的: 通过 DNA 条形码研究鉴别中药材中华蟾蜍 *Bufo gargarizans* Cantor 及其混伪品的可行性。方法: 从 GenBank 下载了 6 种蟾蜍属 *Bufo*、2 种林蛙属 *Rana*、1 种侧褶蛙属 *Pelophylax* 和 1 种小鲵属 *Hynobius* 的 COI 线粒体基因 DNA 序列。用 Clustal X 1.81 和 BioEdit 软件分别对序列进行比对和编辑。利用 MEGA 4.0 软件按照 Kimura 双参数法计算种内和种间的遗传距离。用贝叶斯法和简约法构建系统发育树对中华蟾蜍进行鉴定。结果: 构建的系统发育树表明, 中华蟾蜍的所有样本聚类为一个单系, 能很好地与其他混伪品区分。结论: COI 条形码 DNA 序列能够对中药中华蟾蜍进行准确鉴定。

[关键词] 中华蟾蜍; 细胞色素 C 氧化酶 I 亚基基因; 条形码; 鉴定

Identification of *Bufo gargarizans* and Its Adulterants by DNA Barcoding TechniqueZHAO Qun^{1,2}, ZHANG Tian¹, GAO Bo³, LI DengLin³, YANG Yan³, LI JunDe^{1*}

(1. National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, State Key Laboratory Breeding Base of Dao-di Herbs, Beijing, 100700, P. R. China;
2. West Anhui University, Lu'an 237012, P. R. China;
3. Anhui China Resources Jinchuan Pharmaceutical Co., Ltd., Huaibei 235000, P. R. China)

[Abstract] **Objective:** To study the feasibility of using DNA barcoding technique to identify *Bufo gargarizans* and its adulterants based on COI gene. **Methods:** Sequences of partial mitochondrial DNA from cytochrome oxidase subunit I (COI) gene of 6 species from *Bufo*, 2 species from *Rana*, 1 species from *Pelophylax*, and 1 species from *Hynobius* were downloaded from the GenBank data library. The COI sequences were aligned and edited using ClustalX 1.81 and BioEdit 7.0.9.0 software, respectively. The interspecific and intraspecific genetic distances of different sequences were calculated by Kimura double parameter method using software MEGA 4.0. Based on all the aligned and edited COI sequences, the phylogenetic analyses were conducted using Bayesian inference (BI) and maximum parsimony (MP) to identify *B. gargarizans* and adulterant. **Results:** COI sequence haplotypes of different samples of *B. gargarizans* were gathered together, formed its own monophyly, and distinguished from its adulterants by BI and MP trees. **Conclusion:** The COI sequence is ideal DNA barcode to identify *B. gargarizans* and its adulterants correctly.

[Keywords] *Bufo gargarizans*; COI; DNA barcode; identification

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.2017.1.002

中华蟾蜍 *Bufo gargarizans* Cantor 隶属于蟾蜍科 (Bufonidae)、蟾蜍属 *Bufo*, 由其获得的蟾皮和蟾酥是我国传统名贵中药材, 该种动物为上述中药材的重要基源动物^[1-3]。研究表明, 在中华蟾蜍的皮中含有的水溶性化学成分具有显著的抗肿瘤作用, 市场

上已出现由其有效成分生产的抗肿瘤药华蟾素注射液^[4-5]。目前, 入药的中华蟾蜍主要来源于野生, 但由于野生资源的逐年减少, 市场上出现了以其他动物代替中华蟾蜍的混伪品^[6]。由于混伪品中抗肿瘤活性成分低于中华蟾蜍^[5,7], 必须寻找鉴定中华蟾蜍

[△] [基金项目] 中央本级重大增减支项目(2060302); 蟾蜍规范化养殖技术研究(3-YFB2014005); 安徽省高校省级自然科学基金项目(KJ2016SD61)

* [通信作者] 李军德, 研究员, 研究方向: 药用动物资源与动物药材鉴定, E-mail: jundeli99@163.com

真伪的有效方法,才能保证该种中药的临床用药安全和市场的有效监管。

目前,关于脊椎动物类药材的鉴定主要依据外部形态、骨片横断面特征、薄层色谱法和紫外光谱吸收特征对药材进行鉴别^[2,8-9]。此外,核型和线粒体 12S rRNA 基因可用于中华蟾蜍与部分种类的鉴别^[10-11]。然而,这些有的分辨率不高,有的复杂费时不利于推广,有的则涉及鉴别种类较少,没有对鉴别的可靠性和实用性作进一步研究。线粒体细胞色素 C 氧化酶 I 亚基 cytochrome oxidase subunit I (COI) 基因为蛋白质编码基因,其密码子第三位碱基受自然选择的压力影响较小,具有较大的变异,同时其他部位又具有一定的保守性,可以较为容易地设计通用引物,在不同物种中扩增出来,便于不同物种之间进行比较分析,用于物种的鉴定^[12]。因此,COI 基因可以作为 DNA 条形码的分子标记。本研究以 COI 基因为分子标记,研究用其鉴别中药材

基源动物中华蟾蜍及其混伪品的可行性。

1 材料与方法

1.1 材料

用于构建中华蟾蜍及其混伪品系统发育树的内群和外群的 COI 基因序列均来自于美国国家生物技术信息中心(NCBI)的 GenBank。用于构建系统发育树内群的序列来自于 6 种蟾蜍属 *Bufo*、2 种林蛙属 *Rana* 和 1 种侧褶蛙属 *Pelophylax*, 详细信息见表 1。外群则包括来自于小鲵属 *Hynobius* 中国小鲵 *Hynobius chinensis* 的 3 条 COI 线粒体基因部分 DNA 序列(GenBank 登录号为 JN165870、JN165869 和 JN165868)。

用于待检真伪的蟾皮药材购于安徽亳州药材市场,从所购蟾皮药材中随机抽取 3 个样本进行真伪鉴定。3 个样本分别命名为 *Sample1*、*Sample2*、*Sample3*。

表 1 中华蟾蜍及其混伪品 COI 序列及 GenBank 登录号

属名	种名	数量	单倍型	GenBank 登录号
林蛙属 <i>Rana</i>	黑龙江林蛙 <i>Rana amurensis</i>	2	Hap1	KF020606; KF020603
	黑龙江林蛙 <i>Rana amurensis</i>	2	Hap2	KF020604; JF939079
	黑龙江林蛙 <i>Rana amurensis</i>	1	Hap3	KF020605
	中国林蛙 <i>Rana chensinensis</i>	1	Hap4	KF020612
	中国林蛙 <i>Rana chensinensis</i>	1	Hap5	JF939080
侧褶蛙属 <i>Pelophylax</i>	黑斑侧褶蛙 <i>Pelophylax nigromaculatus</i>	2	Hap6	JQ844522; JQ844521
	黑斑侧褶蛙 <i>Pelophylax nigromaculatus</i>	1	Hap7	JQ844520
蟾蜍属 <i>Bufo</i>	中华蟾蜍 <i>Bufo gargarizans</i>	1	Hap8	JN700878
	中华蟾蜍 <i>Bufo gargarizans</i>	1	Hap9	JN700879
	中华蟾蜍 <i>Bufo gargarizans</i>	1	Hap10	JN700880
	盘古蟾蜍 <i>Bufo bankorensis</i>	1	Hap11	HQ650558
	西藏蟾蜍 <i>Bufo tibetanus</i>	1	Hap12	HM582424
	史氏蟾蜍 <i>Bufo stejnegeri</i>	1	Hap13	JQ844504
	史氏蟾蜍 <i>Bufo stejnegeri</i>	1	Hap14	JQ844503
	黑眶蟾蜍 <i>Bufo melanostictus</i>	1	Hap15	JN700876
	花背蟾蜍 <i>Bufo raddei</i>	1	Hap16	JN700877

1.2 方法

1.2.1 序列分析 用软件 Clustal X 1.81 对从 GenBank 下载的中华蟾蜍、混伪品及外群的 COI 基因部分序列进行比对和排序,用软件 BioEdit

7.0.9.0^[13] 对对比后的序列进行编辑,用 MEGA 4.0 软件^[14] 统计所有序列的变异位点,利用 MEGA 4.0 软件按照 Kimura 双参数法计算种内和种间的遗传距离。

1.2.2 系统发育树的构建 基于比对和编辑过的所有 COI 基因部分序列, 分别用贝叶斯法 (Bayesian inference, BI) 和简约法 (maximum parsimony, MP) 对中华蟾蜍和其混伪品进行系统发育分析, 构建 BI 和 MP 两种系统发育树。其中 BI 树用 MrBayes 3.1.2^[15] 软件构建, MP 树用 PAUP* 4.0 beta 10 软件构建^[16]。构建 BI 树时, 由于 COI 基因 3 个密码子区域的分子进化模式不同, 因此根据 3 个密码子所在的位置把整个序列分为三个部分。用 MrModeltest 2.3 软件^[17] 根据 AIC (Akaike Information Criterion) 检验标准分别选择 3 个不同部分数据的最适进化模型。其中, 第一个密码子位点所在部分的最适模型为 (GTR + G), 第二个密码子位点所在部分的最适模型是 (HKY + I), 第三个密码子位点所在部分的最适模型是 (GTR + G)。马尔科夫链的蒙特卡洛方法 (Markov Chains Monte Carlo, MCMC) 设置为四条链并运行 2 000 000 代。为了确定其收敛情况, MCMC 分别运行两次。每 100 代抽取一个样本, 共形成 40 002 个样本。经过分析得知, 整个运行在 100 000 代后达到平稳, 这样, 总共剩余的样本数为 38 002, 用剩余样本重建系统树, 并估计其后验概率值。构建 MP 树时, 设置自举重复次数 bootstrap nreps 为 1000 次, 使用启发式搜索分析自举重复数据集, 启发式搜索设置由随机逐步添加法产生起始树, 重复 10 次, 采用 TBR 分支交换。

1.2.3 待检样本的真伪鉴别 基因组 DNA 的提取: 用标准苯酚-三氯甲烷抽提和乙醇沉淀方法提取待测样本的整个基因组 DNA。提取后的 DNA 置于 -80 °C 中保存备用。

PCR 扩增和 DNA 序列测定: 用引物对 Chmf4 和 Chmr4 对待检样本的 COI 基因序列进行 PCR 扩增。其中, 正向引物 Chmf4 的序列为 5'-TYTCWACWAAYCAYAAAGAYATCGG-3', 反向引物 Chmr4 的序列为 5'-ACYTCRGGRTGRCRAARAATCA-3'^[18]。PCR 反应总体系为 25 μ L, 包括 DNA 模板 0.5 μ L (5 ~ 50 ng)、上游引物和下游引物各 1 μ L (10 pmol)、10 \times PCR Buffer 2.5 μ L、MgCl₂ (25 mmol·L⁻¹) 1.5 μ L、dNTPs (10 mmol·L⁻¹) 0.5 μ L、Taq DNA polymerase (5 u· μ L⁻¹) 0.5 μ L、ddH₂O 17.5 μ L。PCR 反应程序为 95 °C 预变性 5 min; 接着进行 35 个循环, 每个循环包括 94 °C 变性 1 min, 46 °C 退火 1 min, 72 °C 复性 1 min; 最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物由生工生物工程上海

(股份)有限公司进行测序。测序引物分别为 COI-C01 和 COI-C03, 其中 COI-C01 的序列为 5'-TYTCWACWAAYCAYAAAGAYATTGG-3', COI-C03 的序列为 5'-ACYTCYGGRTGACCAARAAYCA-3'^[18]。

待检样本的真伪分析: 利用 Clustal X 1.81 和上述 1.2.1 序列分析步骤中的所有序列进行分析和比对。用 MEGA 4.0 软件按照 Kimura 双参数法计算每个待检样本与其他各个物种之间的遗传距离。按上述 1.2.2 方法, 将该步骤中所有物种的序列与待检样本的序列构建 BI 系统发育树和 MP 系统发育树。

通过以上方法, 如果待检样本与中华蟾蜍之间的遗传距离小于与其他各物种之间的遗传距离, 且待检样本与中华蟾蜍在系统发育树中聚类于同一分支上形成单系, 则该待检样本为正品中华蟾蜍的蟾皮, 反之则为伪品。

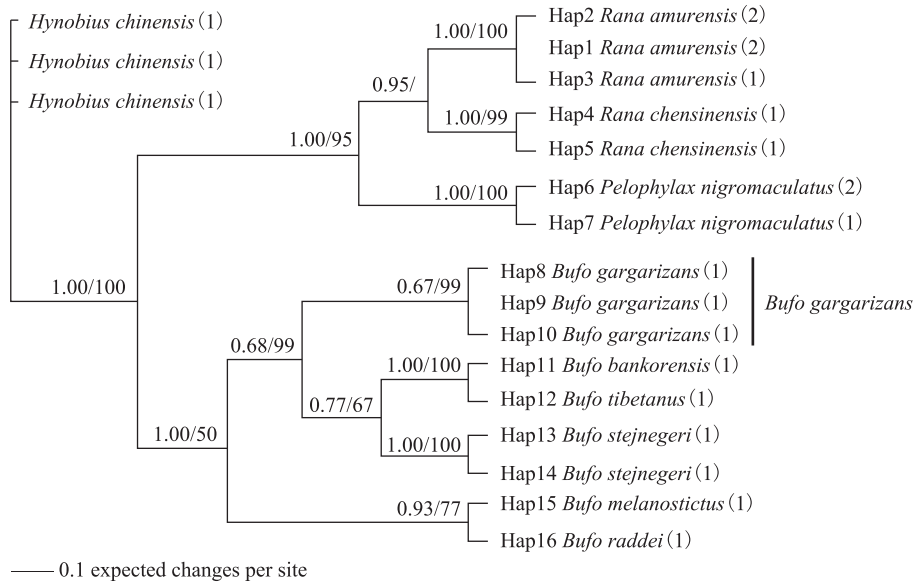
2 结果

2.1 序列分析

中华蟾蜍、相关混伪品和外群的 COI 基因部分同源片段序列经过比对和编辑后, 序列片断的长度为 556 bp, 有 223 个变异位点, 其中包含 217 个简约性信息位点 (parsimony-informative characters)。所有序列的平均 G + C 含量为 46.3%, 中华蟾蜍的平均 G + C 含量为 47.8%, 因此中华蟾蜍与所有序列的平均 G + C 含量差异不大。中华蟾蜍种内遗传距离的范围为 0.018 ~ 0.031, 与其他种类的种间遗传距离为 0.112 ~ 0.294。种内最大遗传距离为 0.031, 而种间最小遗传距离为 0.112。因此, 中华蟾蜍的种内遗传距离小于与其他混伪品之间的种间遗传距离。

2.2 中华蟾蜍及其混伪品的系统发育树

通过 BI 法和 MP 法构建的系统发育树表明, 2 种方法构建的系统发育树主干基本一致, 见图 1。图 1 中各谱系分支的节点处标有 BI 树的后验概率值 (posterior probability, PP) 和 MP 树的自举支持度 (Bootstrap, BS)。在 BI 和 MP 系统发育树中, 中华蟾蜍所有序列的单倍型均聚类为 1 个分支。尽管该分支在 BI 树中的支持度不高 (PP = 0.67), 但在 MP 树中, 中华蟾蜍的单倍型以极高的支持度形成 1 个单系 (BS = 99)。



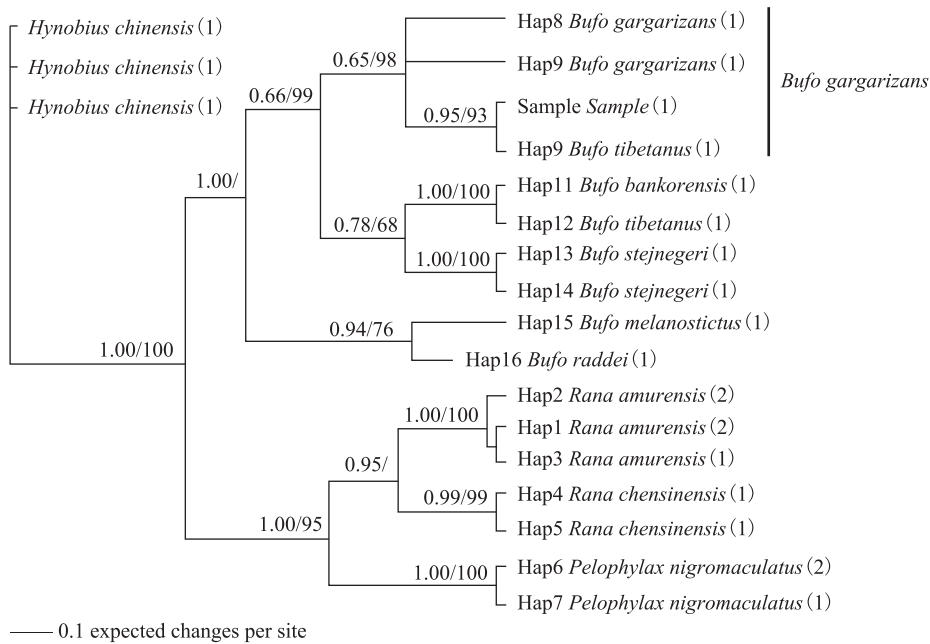
注：谱系分支节点上方为BI树的后验概率PP和MP树的自举支持度BS，其中，在斜线的左边为PP值，斜线的右边为BS值，斜线任何一边为空白，表明PP值小于0.5或BS值小于50。

图1 中华蟾蜍及混伪品的系统发育树

2.3 待检样本的真伪鉴别结果

通过比对和分析，3个待检样本形成1个单倍型，该单倍型用“Sample”表示。待检测样本与中华蟾蜍之间的遗传距离在0.002与0.033之间，小于与其他物种之间的遗传距离。同时，待检物种的

单倍型 Sample 与中华蟾蜍的单倍型聚为1个分支形成单系，见图2，尤其是与中华蟾蜍的其中1个单倍型 Hap9 以极高的支持度聚类在一起 (PP = 0.95; BS = 93)。



注：谱系分支节点上方为BI树的后验概率PP和MP树的自举支持度BS，其中，在斜线的左边为PP值，斜线的右边为BS值，斜线任何一边为空白，表明PP值小于0.5或BS值小于50。

图2 待检样本、中华蟾蜍和混伪品的系统发育树

3 讨论

3.1 COI 基因序列分析

中华蟾蜍及其混伪品 COI 基因序列分析表明,中华蟾蜍种内遗传距离最大为 0.031,而其与所有混伪品的种间遗传距离最小为 0.112。因此,中华蟾蜍种内遗传距离小于与其他混伪品之间的种间遗传距离,可以用 COI 基因序列为分子标记,用来鉴别中华蟾蜍及其混伪品。由于在 COI 序列中存在中华蟾蜍不同于其他混伪品的特异性碱基位点,所以可以通过特异性碱基位点设计中华蟾蜍的特异性鉴别引物,用于中华蟾蜍的快速鉴定。目前,已有很多中药材可以通过特异性 PCR 进行快速鉴定^[19-23]。

3.2 系统发育树分析

通过贝叶斯法和简约法构建中华蟾蜍及其混伪品的系统发育树可以看出,中华蟾蜍的单倍型在系统发育树中聚类为一个单系,因此,通过构建系统发育树,可以把中华蟾蜍与混伪品区分开,以达到鉴别中华蟾蜍正品的目的。

3.3 待检样本的真伪鉴别

由于 3 个待检样本的单倍型与中华蟾蜍之间的遗传距离最小,且与中华蟾蜍在系统发育树中聚类于同一分支上形成单系,因此 3 个待检样本为正品中华蟾蜍的蟾皮。

4 结论

本研究分析结果表明,线粒体 COI 基因序列能够通过比较待测样本、中华蟾蜍和其混伪品之间的遗传距离的远近,以及通过构建待测样本与这些物种之间的系统发育树来判断该样本是否为中华蟾蜍的蟾皮,从而达到对待测样本的真伪鉴定。因此,COI 基因序列是较为理想的鉴定中华蟾蜍及其混伪品的 DNA 条形码。

参考文献

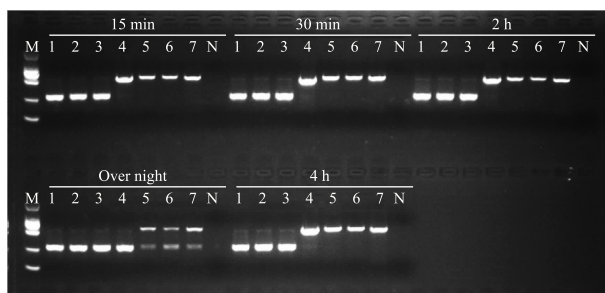
- [1] 费梁,胡淑琴,叶昌媛,等. 中国动物志:两栖纲(中卷),无尾目[M]. 北京:科学出版社,2009.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015.
- [3] 江苏新医学院. 中药大辞典:下册[M]. 上海:上海人民出版社,1977.
- [4] 曾洋,张爱军,文筱. 干蟾皮的研究进展[J]. 中国医药科

- 学,2011,1(15):29-31.
- [5] 王宏洁,杨立新,高波,等. 高效液相色谱法测定不同种蟾皮中蟾蜍毒素的含量[J]. 中国中医药信息杂志,2012,19(11):44-45.
- [6] 乔淑芬. 中华大蟾蜍生活习性及其人工养殖场地选择[J]. 通化师范学院学报,2008,29(4):39-41.
- [7] 张振海,王晋艳,陈彦,等. 不同品种及产地蟾皮中抗肿瘤活性成分含量比较[J]. 中华中医药杂志,2011,26(11):2698-2701.
- [8] 朱华,林冬杰,莫小玲,等. 广西蛤蚧、泰国蛤蚧及其混伪品海蛤蚧(红瘰疣螈)的生药鉴定[J]. 广西中医药,1997,20(6):34-37.
- [9] 王纯玉. 蛤蚧及其伪品的鉴别[J]. 传统医药,2003,12(11):64.
- [10] 袁毅君,杨金义,袁惠群,等. 甘肃中华蟾蜍和中国林蛙核型的初步研究[J]. 天水师范学院学报,2007,27(5):26-28.
- [11] 熊荣川,田应洲,李松,等. 威宁中华蟾蜍的分子鉴定[J]. 贵州农业,2014,42(12):32-36.
- [12] 王鑫,黄兵. DNA 条形码编码技术在动物分类中的研究进展[J]. 生物技术通报,2006,4:67-72.
- [13] Hall T A. BIOEDIT: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT[J]. Nucleic Acids Symposium Series,1999,41(41):95-98.
- [14] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0[J]. Molecular Biology and Evolution,2007,24(8):1596-1599.
- [15] Ronquist F, Huelsenbeck J P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models[J]. Bioinformatics,2003,19(12):1572-1574.
- [16] Swofford D L. PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony(* and Other Methods)[Z]. Sinauer Associates, Sunderland,MA,2002.
- [17] Nylander, JAA. PAUP*: MRMODELTEST version 2.1. Computer program distributed by the author[Z]. Uppsala University, Uppsala,2004.
- [18] Che J, Chen H M, Yang J X, et al. University CO I primers for DNA barcoding amphibians [J]. Molecular Ecology, 2012,12(2):247-258.
- [19] 唐双焱,傅文,陈永久,等. 中药材鹿鞭的分子鉴定研究[J]. 中国中药杂志,2002,27(8):573-575.
- [20] 冯成强,唐晓晶,黄璐琦,等. 金钱白花蛇及其混淆品高特异性 PCR 的鉴别[J]. 中国中药杂志,2006,31(13):1050-1053.

(下转第 20 页)

会影响判别结果,见图3。使用该方法对市售的73批虻虫进行鉴别均能获得正确的酶切鉴别结果。

本实验将 PCR-RFLP 方法引入虻虫的真伪鉴别中,表明该技术具有准确、简便、重复性好等特点,能有效鉴别虻虫及其伪品。同时该方法对样品要求低,对炮制、仓储样品均具有良好的鉴别效果,有望成为商品虻虫的特异性鉴别方法。



注: M. DL2000 Marker(条带大小自下而上依次为 100、250、500、300、400、500 bp); 1. 复带虻; 2. 广西虻; 3. 中华斑虻; 4. 中华蜜蜂; 5. 胡蜂; 6. 家蝇; 7. 麻蝇; N. 阴性对照(以 dd H₂O 为模板)。

图3 酶切时间对虻虫鉴别结果的影响

参考文献

- [1] 刘大有,徐莉,李莉,等. 虻虫的研究进展[J]. 中草药, 1997,28(7):440-441.
[2] 李军德,黄璐琦,冯学锋,等. 虻虫药材性状显微特征鉴

- 别研究[J]. 中国中药杂志,2010,35(16):2057-2060.
[3] 姜波,赵荣国,高士贤. 五种虻虫药材的性状鉴别[J]. 中药材,1992,15(3):21-24.
[4] 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.
[5] 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.
[6] 王川易,郭宝林,肖培根. 中药分子鉴定方法评述[J]. 中国中药杂志,2011,36(3):237-242.
[7] 张婷,徐璐珊,王峥涛,等. 药用植物束花石斛、流苏石斛及其形态相似种的 PCR-RFLP 鉴别研究[J]. 药学学报, 2005,40(8):728-733.
[8] 蒋超,黄璐琦,袁媛,等. 酶切-溶解曲线分析:一种新的 SNP 分型方法及其在中药材鉴定中的应用[J]. 药学学报,2014,49(4):558-565.
[9] 张学维,马长华,白根本. 塔里木马鹿特异性 PCR 及 PCR-RFLP 鉴定[J]. 中华中医药杂志,2011,26(3):570-573.
[10] Jiang C, Yuan Y, Chen M, et al. Molecular authentication of multi-species honeysuckle tablets [J]. Genetic Mol Res, 2013,12(4):4827-4835.
[11] 来复根. 中药虻虫的鉴别[J]. 浙江药学,1986,3(4):13-15.
[12] 李军德,黄璐琦,陈敏,等. 中药虻虫研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(8):228-230.

(收稿日期 2016-08-14)

(上接第15页)

- [21] Sun X Q, Wei Y L, Qin M J, et al. Authentication of an Endangered Herb *Changium smyrnioides* from Different Producing Areas Based on rDNA ITS Sequences and Allele-Specific PCR[J]. Archives of Pharmacal Research,2012,35(4):701-708.
[22] 陈康,蒋超,袁媛,等. 快速 PCR 方法在蛇类药材真伪鉴别中的应用[J]. 中国中药杂志,2014,39(19):3673-3677.
[23] Han B X, Yuan Y, Huang L Q, et al. Specific PCR identification between *Peucedanum praeruptorum* and *Angelica decursiva* and identification between them and adulterant using DNA barcode[J]. Pharmacognosy Magazine, in press.

(收稿日期 2016-09-02)