

·质量分析研究·

基于 COI 和 16SrRNA 基因的地龙药材及其混淆品的 DNA 条形码鉴定

马 梅, 李 薇, 龚 玲, 卢瑞珊(广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006)

摘要: **目的** 利用线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 1(COI)和 16S 核糖体 RNA(16SrRNA)对地龙药材及常见混伪品进行分子鉴定, 探讨快速、准确鉴定地龙药材及其混伪品基原物种的方法。**方法** 收集地龙药材的药典收载品种及其易混品种 10 种, 提取 DNA, 得到其 COI 和 16SrRNA 序列。所得序列经 DNASTar 校正后, 用 MEGA6.0 自带的 Clustal W 多重比对, 除去冗余位点, 比对结果经 MEGA6.0 分析, 构建地龙药材及其混淆品的邻接(N-J)树。**结果** 地龙药材的正品来源参环毛蚓(*Pheretima aspergillum*)、通俗环毛蚓(*P. vulgaris*)、威廉环毛蚓(*P. guillelmi*)及栉盲环毛蚓(*P. pectinifera*)与其混淆品种间 COI 和 16SrRNA 基因序列均存在较多变异位点。由所构建的 N-J 系统聚类树图显示所测物种的单系性, 即 16SrRNA、COI 可以很好的将地龙药材区别于其他混伪品。**结论** 所获得的 COI 和 16SrRNA 序列可作为不同状态的地龙类药材物种鉴定的分子依据, 并为进一步建立地龙等动物类中药物种真实性鉴定体系奠定了重要的实验基础。

关键词: 地龙; 线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 1; 16S 核糖体 RNA; DNA 条形码

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2014)05-0595-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.05.018

DNA Barcode Identification of Pheretima Medicinal Material and Its Adulterants Based on COI and 16SrRNA Gene Sequence

MA Mei, LI Wei, GONG Ling, LU Ruishan(School of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006 Guangdong, China)

Abstract: **Objective** COI and 16SrRNA genes were used for the molecular identification of Pheretima medicinal material and its commonly-seen adulterants, thus to build a rapid, accurate method for the identification of their species. **Methods** We collected 10 authentic and adulterant species of Pheretima medicinal material from the producing region, and then we extracted DNA and obtained the COI and 16SrRNA sequences. DNASTar and MEGA6.0 were applied to analyze the variable sites and construct their N-J tree. **Results** Authentic Pheretima medicinal material came from the species of *Pheretima aspergillum*, *P. vulgaris*, *P. guillelmi*, and *P. pectinifera*. Compared with the authentic Pheretima medicinal material, the adulterant had lots of variable sites. Authentic Pheretima medicinal material and its adulterants can be identified by COI and 16SrRNA genes. **Conclusion** The obtained COI and 16SrRNA genes can provide reference for the identification of Pheretima medicinal material at the molecular level, and lay the important experimental basis for further establishment of authenticity identification of Pheretima as well as other animal medicines.

Keywords: Pheretima; COI; 16SrRNA; DNA barcode

地龙为常见动物类中药材,《中华人民共和国药典》2010 年版规定其为巨蚓科动物参环毛蚓 *Pheretima*

aspergillum (E. Perrier)、通俗环毛蚓 *Pheretima vulgaris* Chen、威廉环毛蚓 *Pheretima guillelmi*

收稿日期: 2014-06-20

作者简介: 马梅, 硕士研究生, 研究方向: 新技术在中药品质研究中的应用。Email: mamei0910@163.com。通讯作者: 李薇, 博士生导师, 研究方向: 中药品种鉴定及品质评价。Email: liwei-li@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金项目(81374035)。

(Michaelsen) 或栉盲环毛蚓 *Pheretima pectinifera* Michaelsen 的干燥体^[1], 具有多种药理活性, 是一种有良好开发利用前景的、有特色的动物类中药。DNA 条形码技术是近年来发展起来的物种鉴定新方法。通过对基因组中一段公认的、相对较短的 DNA 片段进行序列分析, 可以有效弥补传统物种鉴定方法的不足, 因而成为生物分类和鉴定的研究热点和方向^[2-4]。本项目组曾对 5 个不同居群广地龙线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 1(COI)和 16S 核糖体 RNA (16SrRNA)序列进行过初步研究^[5], 提示广地龙 COI 和 16SrRNA 序列与其他已知地龙或蚯蚓的基因片段存在显著的序列差异。本文参考《中药材 DNA 条形码分子鉴定指导原则》^[6], 以地龙主要产区分布的代表群体为研究对象, 通过测定 COI 和 16SrRNA 序列和比较其序列特征, 旨在考察利用 COI 和 16SrRNA 序列鉴别地龙类药材及其混淆品的可行性, 为进一步建立不受样本状态影响的地龙基原物种的鉴定体系提供必要的实验依据。

表 1 实验样品来源

Table 1 The source list of experimental sample

科名	品种	代码	采集地	备注
正蚓科	正蚓属一种 <i>Lumbricus L.sp</i>	Seq1	广东韶关	
巨蚓科	加州腔蚓(白颈腔蚓) <i>Metaphire californica</i> (Kinberg, 1867)	Seq2	广东阳江、韶关	
巨蚓科	壮伟远盲蚓 <i>Amyntas robustus</i> (Perrier, 1872)	Seq3	广州番禺	
链胃蚓科	日本杜拉蚓 <i>Dravida japonica japonica</i> (Michaelsen, 1892)	Seq4	上海闵行区	
巨蚓科	秉氏远盲蚓 <i>Amyntas carnosus carnosus</i> (Stephenson, 1925)	Seq5	上海闵行区	
巨蚓科	威廉腔蚓(威廉环毛蚓) <i>Metaphire guillelmi</i> (Michaelsen, 1895)	Seq6	上海闵行区	药典收载品种
巨蚓科	通俗腔蚓(通俗环毛蚓) <i>Metaphire vulgaris</i> (Chen, 1930)	Seq7	上海闵行区	药典收载品种
巨蚓科	栉盲远盲蚓(栉盲环毛蚓) <i>Amyntas pectieniferus</i> (Michaelsen, 1931)	Seq8	上海闵行区	药典收载品种
巨蚓科	简洁远盲蚓(夏威夷盲蚓) <i>Amyntas gracilis</i> (Kinberg, 1867)	Seq9	广东阳江、茂名	
巨蚓科	参状远盲蚓(参环毛蚓) <i>Amyntas aspergillum</i> (Perrier, 1872)	Seq10	广州番禺	药典收载品种

2 方法与结果

2.1 模板 DNA 的提取 用动物组织 DNA 提取试剂盒(OMEGA)提取地龙标本各样品 DNA, 并通过 1 %琼脂糖凝胶电泳及核酸蛋白检测仪检查 DNA 的质量。

2.2 PCR 扩增与测序 通过优化 PCR 反应的退火温度、模板浓度以及引物浓度, 将提取的样品 DNA 在最优条件下进行 PCR 扩增, 利用表 2 中的引物扩增 COI 及 16SrRNA 基因片段, 扩增产物进行测序。PCR 反应体系(25 μL): 引物(2 μmol·L⁻¹)各 1 μL, DNA 模板 1 μL, PrimeSTARTMHS(Premix)(2 ×)12.5 μL, ddH₂O 补至 25 μL; COI 基因片段扩增程序: ①95 °C 预变性 5 min, ②95 °C 变性 45 s, ③47 °C 退火 45 s,

1 仪器与试药

1.1 仪器 自动凝胶成像仪, PCR 仪(BIORAD EN034722), 核酸蛋白检测仪(Smart Spectm Plus Spectrophotometer), 美国伯乐公司; 微量高速离心机(TG16-W), 微量移液器, 德国艾本德公司; 分析天平(AUY120), 日本岛津公司; JY-C 电泳仪(JUNYI, JY1000), 北京君意东方电泳设备有限公司。

1.2 试剂 DL2000 DNA Marker, 货号: D501A, 宝生物工程(大连)有限公司; 琼脂糖, DNA 提取试剂盒(OMEGA)、DNA 纯化试剂盒, 百泰克生物技术有限公司; GoldView 染料, 华齐盛生物科技有限公司; TE 缓冲液, 北京普博欣公司; PrimeSTAR™ HS (Premix)(Takara)、蛋白酶 K, 美国 Merk 公司; 灭菌 ddH₂O, 自制。

1.3 样品 收集地龙药材及其易混品种 10 种, 实验用样本经上海交通大学邱江平研究员鉴定, 其中 4 份为《中华人民共和国药典》(2010 版)收载的地龙药材, 见表 1。

④72 °C 延伸 45 s, ⑤重复步骤②~④45 次, ⑥最后 72 °C 延伸 10 min; 16SrRNA 基因片段扩增程序: ①95 °C 预变性 5 min, ②95 °C 变性 45 s, ③58 °C 退火 45 s, ④72 °C 延伸 45 s, ⑤重复步骤②~④45 次, ⑥最后 72 °C 延伸 10 min。扩增产物均经 1 %琼脂糖凝胶电泳检测。

其中 PCR 扩增时所用 Prime STARTMHS(Premix), 其所含聚合酶使用了日本 Takara 公司独自开发的兼具高保真性和高扩增效率的 Prime STAR™ HS DNA 聚合酶, 该酶有超群的校正功能及极高的扩增效率, 使 PCR 反应的测序结果更加精确。

产物经纯化试剂盒纯化后送华大基因科技股份有

表 2 PCR 扩增 COI、16SrRNA 基因片段所用引物

Table 2 The primers used in PCR of COI, 16SrRNA gene fragment

基因片段	引物名称	序列	方向
COI	LCO1490	GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G	正向
	HCO2198	TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA	反向
16SrRNA	16Sr	GGT ATC CTA ACC GTG CAA AGG	正向
	16Sf	CAA CCC CCA CTA TTG ATA AGG ACT	反向

限公司测序，采用 PCR 反应的引物浓度为 10 μmol·L⁻¹，双向测序。测序结果应用相关软件进行数据分析。

2.3 数据处理 收集到的样品经过测序，峰图利用 DNASTar 等软件拼接辅以手工校正，去除引物区，然后在 NCBI 中用 BLAST(Basic Local Alignment Search)相似性搜索，确保得到的 COI 序列和 16SrRNA 序列是本研究的目的序列。最后将所有序列用软件 MEGA6.0 比对并进行特异位点、种间变异等分析，并构建邻接(N-J)系统聚类树，同时利用 Bootstrap(1000 次重复)检验各分支的支持率。

2.4 结果

2.4.1 COI 及 16SrRNA 基因片段的多重序列比对 对地龙样品进行 PCR 扩增，均获得质量较好的 PCR 产物。各样品的双向测序峰图利用 DNASTar 校对准确后分别得到 700 bp 左右的 COI 基因序列和 350 bp 左右的 16SrRNA 基因序列，将测序结果进行 BLAST 相似性搜索，寻找匹配的序列，结果显示本实验经 PCR 扩增所得 COI 及 16SrRNA 基因序列均与其他蚯蚓物种同源，且匹配度较高，表明 COI 及 16SrRNA 基因片段的扩增和测序结果是非常准确和可靠的。

2.4.2 地龙样品的 COI 及 16SrRNA 基因序列分析 见表 3。所得序列经 MEGA6.0 自带的 Clustal W 多重比对后，除去冗余位点，最终得到约 600 个位点的 COI 数据组及约 300 个位点的 16SrRNA 数据组。比对结果采用 MEGA6.0 软件进行分析，计算各地龙的种间差异、保守位点(Conserved sites)、变异位点(Variable sites)、自裔位点(Singleton sites)、简约信息点(Parsimony information sites)、G+C 含量和 A+T 含量^[7]等。

表 3 的数据显示，COI 与 16SrRNA 基因的 A+T 含量均明显高于 G+C 的含量，而这一模式与 Heathoff 等^[8]发现 A+T 的组成在蚯蚓这一物种中具有偏好的结论相一致，并且与其他无脊椎动物的线粒体基因特点组成相似^[9]。

2.4.3 基于 COI、16SrRNA 基因序列的 NJ 树 见图 1

表 3 不同数据集序列分析结果

Table 3 Sequence analysis of different data sets

位点	基因片段	
	COI	16SrRNA
C	374(61.51 %)	267(83.17 %)
V	234(38.49 %)	55(16.83 %)
S	67(11.02 %)	76(23.68 %)
Pi	162(26.64 %)	191(59.50 %)
G+C	40.14 %	35.68 %
A+T	59.86 %	64.32 %

注：C.保守位点(Conserved sites)；V.变异位点(Variable sites)；S.自裔位点(Singleton sites)；Pi，简约信息点(Parsimony information sites)。括号中的百分数为占总位点的百分含量。

及图 2。基于 COI 和 16SrRNA 基因序列，采用邻接法(N-J)构建系统进化树，各分支支持率基本在 50 以上，说明地龙药材正品来源与混伪品能够明显区分开。因此，COI 序列和 16SrRNA 序列均可作为条形码适用于药材地龙与其混伪品的鉴定。其中基于 16SrRNA 基因序列构建的 N-J 树中，来自于正蚓科正蚓属一种的地龙与链胃蚓科杜拉蚓属的日本杜拉蚓一支，支持率为 100，该结果可能为该引物扩增产物过短、携带信息较少所致。

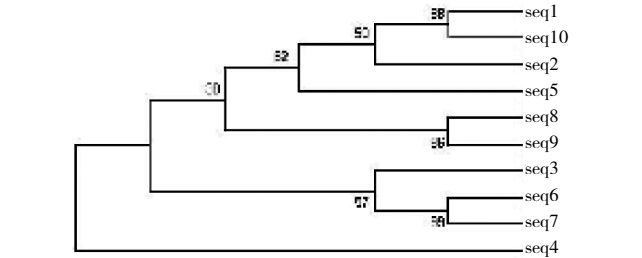


图 1 基于 COI 基因的 N-J 系统进化树
Figure 1 N-J phylogenetic tree based on COI mtDNA

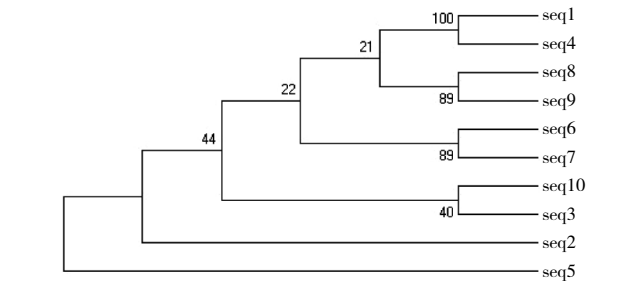


图 2 基于 16SrRNA 基因的 N-J 系统进化树
Figure 2 N-J phylogenetic tree based on 16SrRNA

3 讨论

本研究通过优化扩增 COI 和 16SrRNA 基因片段的 PCR 条件，对包括《中国药典》规定 4 个品种在内

的地龙以及其他易混地龙品种的 COI 和 16SrRNA 基因序列进行了 PCR 扩增, 扩增产物经双向测序并利用相关软件校对、去除引物区后, 对结果进行 BLAST 相似性搜索, 结果表明所得基因片段的测序结果准确可靠。将所得序列进行分析并构建系统发育树, 由此可清晰地了解市场流通的地龙商品基原动物之间的亲缘关系, 为地龙正品药材及其他混淆品的物种鉴定提供有价值的实验参考依据, 为最终建立不受环境因素的影响以及样品状态和材料部位的限制的地龙药材 DNA 条形码鉴定方法奠定了重要基础。

研究发现, 无论是正品地龙药材还是其混淆品均有较多的变异位点, 从基于 COI 及 16SrRNA 序列构建的 N-J 树可以看出, COI 和 16SrRNA 片段能够将各地龙物种明显区分, 该结果与传统的形态学分类结果基本一致。值得提及的是, 在基于 16SrRNA 基因序列所构建的 N-J 树中, 来自于正蚓科正蚓属一种的地龙与链胃蚓科杜拉蚓属的日本杜拉蚓聚为一支, 支持率高达 100, 由此表明, 相对于 16SrRNA 序列, 基于 COI 基因序列的 DNA 条形码技术可以更好地鉴定地龙药材及其混伪品。这一结论正好与陈士林等^[6,10-15]研究者所建议的将 COI 序列作为动物物种鉴定的通用条形码相符。

由于环节动物中环毛蚓属的动物种类繁多, 仅记载的就有 9 科 28 属 306 种, 且分类方法不一, 迄今为止尚没有一份较完整的相关名录及分类学形态特征手册^[16], 导致国内外学者对蚯蚓的命名较为混乱, 出现了多种同物异名的现象, 如新版《中国药典》收录的参环毛蚓、栉盲环毛蚓与巨蚓科 Megascolecidae、远盲蚓属 *Amynthas* 的参状远盲蚓 *Amynthas aspergillum*、栉盲远盲蚓 *Amynthas pectieniferus* 为同一物种; 通俗环毛蚓、威廉环毛蚓则与巨蚓科腔蚓属 *Metaphire* 的通俗腔蚓 *Metaphire vulgaris*、威廉腔蚓 *Metaphire guillelmi* 为同一物种。这些现象恰好进一步证明了动物药材基原物种的分类及鉴定方法亟待改善的必要性和迫切性, 而 DNA 条形码技术的优势正好能利用遗传物质的特性来完成和实现物种真实性的鉴定。有理由相信, 随着研究的不断深入, DNA 条形码技术一定会与传统鉴定方法相互弥补, 共同在质量控制标准化方面取得更大进展, 也将会在保证临床用药安全方面发挥更为重要的作用。

参考文献:

- [1] 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, 2010: 113.
- [2] Gere J, Yessoufou K, Daru BH, et al. Incorporating trnH-psbA to the core DNA barcodes improves significantly species discrimination within southern African Combretaceae[J]. Zookeys, 2013, 30(365): 129-147.
- [3] Weitschek E, Fison G, Felici G. Supervised DNA Barcodes species classification: analysis, comparisons and results[J]. Bio Data Min, 2014, 7(1): 4.
- [4] Khedkar GD, Jamdade R, Naik S, et al. DNA Barcodes for the Fishes of the Narmada, One of India's Longest Rivers[J]. PLoS One, 2014, 9(7): e101460.
- [5] 韦键红, 李薇, 吴文如, 等. 基于 COI 与 16SrRNA 基因对广地龙的 DNA 分子鉴定研究[J]. 中国药房, 2012, 23(35): 3274-3278.
- [6] 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.
- [7] 韦键红. 地龙类药材 DNA 条形码分子鉴定的研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2012: 13-21.
- [8] Heethoff M, Etzold K, Scheu S. Mitochondrial COII sequences indicate that the parthenogenetic earthworm *Octolasion tyrtaeum* (Savigny 1826) constitutes of two lineages differing in body size and geotype[J]. Pedobiologia, 2004, 48: 9-13.
- [9] Harrison JS. Evolution, biogeography and the utility of mitochondrial 16S and COI genes in phylogenetic analysis of the crab genus[J]. Mol Phylogenet Evol, 2004, 30: 743-754.
- [10] Hebert PDN, Stoeckle M, Zemlak T, et al. Identification of birds through DNA Barcodes[J]. PLoS Biol, 2004, 2(10): 1657.
- [11] Hebert PDN, Penton EH, Burns JM, et al. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101: 14812.
- [12] Hajibabaei M, Janzen DH, Burns JM, et al. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103: 968.
- [13] Yoo HS, Eah JY, Kim JS, et al. DNA barcoding Korean birds[J]. Mol Cell, 2006, 22: 323.
- [14] Savolainen V, Cowan RS, Vogler AP, et al. Towards writing the encyclopedia of life: an introduction to DNA barcoding [J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2005, 360(1462): 1805.
- [15] Garipey TD, Lindsay R, Ogden N, et al. Identifying the last supper: utility of the DNA barcode library for bloodmeal identification in ticks[J]. Mol Ecol Resour, 2012, 12(4): 646-652.
- [16] 黄健, 徐芹, 孙振钧, 等. 中国蚯蚓资源研究 I: 名录及分布[J]. 中国农业大学学报, 2006, 11(3): 9.

(编辑: 邓响潮)