

基于 COI 基因对犀角工艺品真伪的鉴别

赵竹 宋云 许瑾 何增磊 李明福*

(中国检验检疫科学研究院 北京 100121)

Applying COI gene for the authentication of the rhinoceros horn and its products. Zhao Zhu ,Song Yun ,Xu Jin ,He Zenglei ,Li Mingfu* (Chinese Academy of Inspection and Quarantine ,Beijing 100121 ,China)

Abstract The cost of the rhinoceros horn and its products is very expensive in the market. It's very clear that the authenticity testing of the rhinoceros horn and its products will help to keep the market order , combat smuggling and protect the rare and endangered wild animals. The magnetic bead method was used to extract the total DNA from the potential artificial of rhinoceros horn and the artificial products in the market ,the COI gene was selected to be amplified and sequenced. its sequences were Blasted in GenBank ,and then the phylogenetic tree was built. The results showed that the homology of the sequence of COI gene between the potential artificial of rhinoceros horn and *Diceros bicornis* is 99% ,and the homology of the sequence of COI gene between the ox horn and the artificial products in the market is 100% . It suggested the potential artificial of rhinoceros horn should be from *Diceros bicornis* ,and the artificial products in the market should be from *Bos taurus*. This research established a new molecular biology method which was accurately reliable and utility with the COI gene to identification the rhinoceros horn and its products firstly. It can be used for the authenticity testing of rhinoceros horn to prevent poaching or smuggling the rhinoceros horn and its products.

Key words rhinoceros horn; COI Gene; identification

摘要 犀角及其制品在市场上价格昂贵 ,准确鉴定其真伪对于维护市场秩序 ,打击走私 ,保护珍稀濒危野生动物具有重要意义。采用磁珠法提取疑似犀角工艺品 A 和市售仿伪工艺品 B 的总 DNA ,并选用 COI 基因 ,进行扩增、测序 ,在 NCBI 中 BLAST 比对 ,并构建系统进化树 ,结果表明被检测的疑似犀角工艺品 A 的 COI 基因序列与非洲黑犀的同源性高达 99% ,聚为一类 ,而市售仿伪工艺品 B 与家牛同源性高达 100% ,因此该疑似犀角工艺品 A 应属于非洲黑犀 ,市售仿伪工艺品 B 属于家牛。本研究首次建立了应用 COI 基因鉴定犀角及其制品的分子生物学方法 ,有利于鉴别犀角及犀角制品的真伪。

关键词 犀角; COI 基因; 鉴定

中图分类号 S41

世界上的犀牛主要包括 5 个物种 ,即非洲的黑犀(*Diceros bicornis*)和白犀(*Ceratotherium simum*) ,亚洲的印度犀(*Rhinoceros unicornis*)、爪哇犀(*Rhinoceros sondaicus*)和苏门达腊犀(*Dicerorhinus sumatrensis*)^[1] ,分属于犀科(Rhinocerotidae) ,有 4 属 5 种 ,分布于亚洲南部、东南亚和非洲撒哈拉以南地区。犀牛角是贵重的中成药原料及配料 ,犀角工艺品也存在巨大的收藏价值 ,犀牛成为近现代偷猎的对象 ,加之环境等因素 ,导致犀牛数量急剧减少 ,这 5 种犀牛为濒危或极危物种。1993 年 5 月 29 日中国国务院发出了《关于禁止犀牛角和虎骨

贸易的通知》 ,并停止生产含犀牛角的中成药 ,但有关犀角的非法贸易、偷运或走私的现象仍然存在。市售仿伪品主要有牛角、羊角或羊蹄等 ,而传统的犀牛角鉴定方法 ,主要是形态学和组织学鉴定 ,这些方法可以快速鉴定形态完整的犀牛角及防伪品 ,但靠经验和眼力判断 ,容易出现偏差。市场上的犀角制品多为半成品、粉末状或经加工工艺处理 ,使其结构都有不同程度的损伤 ,结构特征不明显 ,难于分辨 ,且形态学观察未必能准确判定犀角制品的真伪及种类。DNA 条形码(DNA barcoding)是一种新兴的生物分类学技术 ,由于其强大的物种鉴定与

* 通讯作者: E-mail: limf9@sina.com

收稿日期: 2012-10-16 2012-11-19 修回

发现新种的能力而被广泛应用,该技术简便高效,不受样品的形态性状等因素限制,是目前常用的物种鉴定技术手段^[2-4]。2003年,Hebert等提出用线粒体COI基因作为条形码基因鉴定大多数动物,此后关于COI基因的报道相继而出^[5-9]。目前国内尚未见有应用COI基因鉴定犀角的相关文献报道。

本实验提取疑似犀角工艺品和仿伪牛角工艺品的DNA,通过对COI基因的扩增、克隆、测序和分类学比较,完成了对疑似样品的物种鉴定,并为今后相关鉴定工作提供准确可靠的分子生物学技术方法,也为口岸生物资源查验及物种管制,禁止非法交易及执法提供科学有效的鉴定依据。

1 材料和方法

1.1 材料和设备

本实验材料来源于疑似犀角杯工艺品和仿伪牛角工艺品,用电钻钻取疑似犀角杯工艺品A和市售仿伪工艺品B微量粉末,非破坏性取样,用于DNA提取。实验中主要用到的仪器设备有Eppendorf冷冻离心机(Centrifuge 5417R),美国ABI的PCR仪(Veriti™ 96-Well Thermal Cycler),Promega的磁力架(Poly Attract System 1000)。

1.2 DNA提取

采用磁珠法(DNA Purification System for food,美国Promega公司试剂盒)提取疑似犀角杯工艺品A和市售仿伪工艺品B的总DNA。

1.3 PCR扩增

COI基因扩增的通用引物及序列:正向引物LCO1490:5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3',反向引物HCO2198:5'-TAAACTTCAGGTTGACCAAAAATCA-3'^[9]。PCR反应体积为25μL,体系内含2.5μL 10×Qiagen PCR缓冲液(包含15mmol/L MgCl₂),0.5μL MgCl₂(25mmol/L),0.25μL dNTP Mix(10mmol/L),0.5μL LCO1490(10mol/L),0.5μL HCO2198(10mol/L),0.5μL Taq DNA酶(Qiagen,5U/L),2.0μL DNA提取液,加ddH₂O至25μL。PCR程序94℃ 3 min 94℃ 30 s,45℃ 30 s,72℃ 1 min 5个循环;94℃ 30 s,51℃ 1 min,72℃ 1 min 35个循环;72℃ 10 min。

1.4 PCR扩增及克隆

PCR产物琼脂糖凝胶电泳后,切胶,回收(美国Promega胶回收试剂盒),连接(Takara公司试剂盒)并转化后,进行蓝白斑筛选,挑单克隆,送菌液到北京三博远志公司测序。

1.5 序列分析和分类学比较

样品正反测序,用DNAStar将正反向序列进行校对、拼接后,去除引物,得到准确的基因序列,长度均为658bp。将获得的已知样本序列用DNAStar中的MegAlign程序进行相似性分析,并将序列在NCBI数据库内进行Blast比对。在GenBank中搜索并下载非洲黑犀、非洲白犀、印度犀、爪哇犀和苏门达腊犀的基因序列及市面上常用的犀角仿伪品驴(*Equus caballus*, JN398377.2)和家牛(*Bos taurus*, JN817351.1)的COI基因,应用MEGA软件构建系统进化树。

2 结果

2.1 PCR结果及疑似犀角工艺品和市售仿伪工艺品序列分析

扩增后2个样品均得到了浓度较好的目的条带(如图1)将拼接的基因序列分别在NCBI中进行相似性搜索(见表1),发现与疑似犀角工艺品A同源性最高的是非洲黑犀,高达99%,其次为非洲白犀,同源性为93%,与印度犀、披毛犀和爪哇犀的同源性分别为87%、87%和86%,而与市售仿伪工艺品B的同源性并不高,用DNAMAN软件比较其同源性为74.57%,说明该疑似犀角工艺品A所用材料确为犀牛角,且属于非洲黑犀。市售仿伪工艺品B检索后发现,与其具有高同源性的基因均为家牛(*Bos taurus*, 序列号JN817351.1)线粒体基因组,且都为100%。

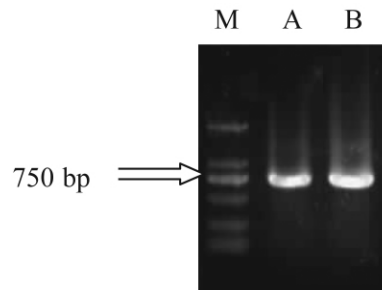


图1 COI基因扩增结果

M. Marker; A. 疑似犀牛角工艺品; B. 常用市售仿伪品材料

表1 疑似样品中COI基因的序列比对(Blast)

相似序列	物种	基因序列号	E值	最大一致率
1	非洲黑犀(<i>Diceros bicornis</i>)	FJ905814.1	0	99%
2	非洲白犀(<i>Ceratotherium simum</i>)	Y07726.1	0	93%
3	印度犀(<i>Rhinoceros unicornis</i>)	X97336.1	0	87%

(续表 1)

相似序列	物种	基因序列号	E 值	最大一致率
4	披毛犀(<i>Coelodonta antiquitatis</i>)	FJ905813.1	0	87%
5	爪哇犀(<i>Rhinoceros sondaicus</i>)	FJ905815.1	0	86%
6	驴(<i>Equus caballus</i>)	JN398377.2	0	85%
7	蓝麝羚(<i>Cephalophus monticola</i>)	GQ144525.1	1e-167	84%
8	藏羚羊(<i>Pantholops hodgsonii</i>)	DQ191826.1	1e-177	83%

2.2 同源性分析

系统发育树(图 2)显示,疑似犀角杯工艺品 A 与非洲黑犀聚为一类,节点支持率为 100%,与非洲白犀同源关系较近,节点支持率为 99%,而市售仿伪工艺品 B 与家牛聚为一类,节点支持率为

100%。根据进化树的原理,节点支持率大于 90% 的聚类结果较为准确,进一步证明疑似犀角杯工艺品 A 属于非洲黑犀,市售仿伪工艺品 B 属于家牛,此结果与 Blast 一致。向 NCBI 条码基因库提交非洲黑犀的序列,其登陆号为 JX998188。

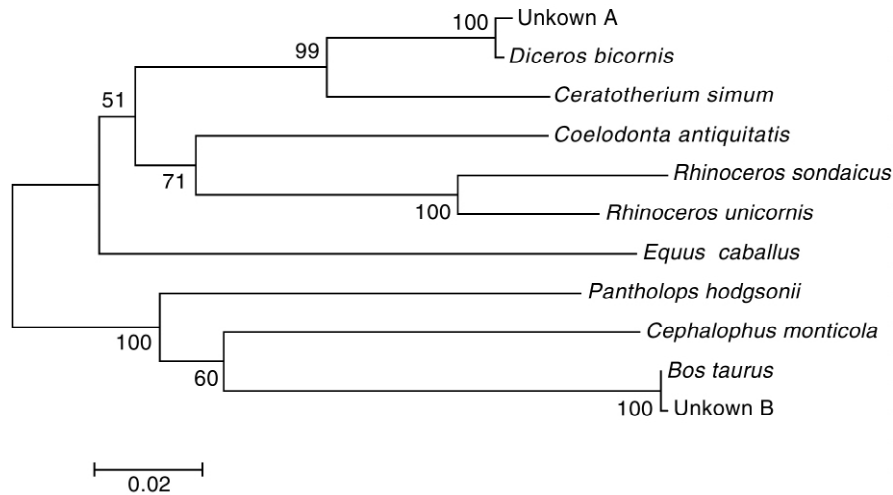


图 2 被检测样品 A 和 B 的系统发育树

3 讨论

3.1 提取方法

疑似犀角工艺品经 PCR 后均得到了目的片段,且浓度很高,说明采用磁珠法提取到了高质量的 DNA。从犀角中提取总 DNA 存在一定难度,首先犀角中角蛋白含量很高,且高度角质化,很难融解,不利于 DNA 的释放;其次,犀角工艺品的打磨工艺、染色等都可能严重的破坏基因组 DNA;且真正的犀角工艺品年代久远,部分 DNA 会有降解,也增加了提取难度;再次,由于取材时不能破坏工艺品的表面,因此只能得到极微量的碎屑,非破坏性取样增加了样品制备的难度。本研究克服了上述困难,特别是借助磁珠法试剂盒,该方法采用先进的分离、纯化技术,有效分离并得到了高浓度的 DNA,特别适用于低拷贝、微量样本的提取,达到了预期的目标。

3.2 濒危物种重要条码基因的补充和完善

本研究向 GenBank 数据库提交了非洲黑犀的

COI 序列,补充了现有数据库中珍稀物种非洲黑犀的重要条码基因的遗传信息。核酸提取所选用的材料来源可靠,得到的结果具有一定代表性,可作为今后犀科鉴定的标准参比序列,为濒危物种的保护和监管提供可信赖的鉴别信息。

3.3 为口岸生物资源查验提供依据

由于犀角被夸大的近乎神奇的药用价值及其工艺品巨大的收藏价值,且不同种类的犀角药用价值及收藏价值差异相当大,因此区分和鉴别犀角工艺品或药物中是否为犀角或含有犀角成分及其所属类别,在实际应用中极为重要。在巨额利益的诱使下,走私、偷猎犀牛的行为从未停止过,本实验建立的分子生物学鉴定方法准确、可靠,为相关部门查验和执法提供有力的鉴定方法。

本研究表明利用 COI 基因可以准确的辨别犀角及其仿伪品的真假。线粒体 COI 基因非常保守,在物种内不同个体之间差异不大,但近缘种间的差异略大,非常适合作为条码基因,尤其是动物,该方

法在其他珍稀濒危动物物种的鉴定中也具有很大的应用价值^[10,11]。相关部门也应采取积极有效的措施,加大对管制物种的监管,并加强对违法行为的打击力度,保护珍稀濒危野生动物犀牛。

参考文献

- [1] 杜艳艳,贾谦. 关于犀牛保护及犀角持续利用的建议. 资源开发与市场, 2008, 24(9): 825-826.
- [2] Paul D N, Hebert A, Cywinska S L B. Biological identifications through DNA barcodes. The Royal Society, 2003, 8(1): 313-320.
- [3] Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 2003, 270: 313-321.
- [4] 陈士林, 姚辉, 宋珍元, 等. 基于 DNA Barcoding(条形码)技术的中药材鉴定. 世界科学技术-中医药现代化, 2007, 9(3): 7-12.
- [5] Hebert P D N, Ratnasingham S, deWaard J R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. Proc Biol Sci, 2003, 270: 96-99.
- [6] Vences M, Thomas M, Bonett R M, et al. Deciphering amphibian diversity through DNA barcoding: chances and challenges. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2005, 360: 1859-1868.
- [7] Janzen D H, Hajibabaei M, Burns J M, et al. Wedding biodiversity inventory of a large and complex Lepidoptera fauna with DNA barcoding. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2005, 360: 1835-1845.
- [8] Ward R D, Zemlak T S, Innes B H, et al. DNA barcoding Australia's fish species. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2005, 360: 1847-1857.
- [9] Folmer, Black M, Hoec W, et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Molecular Marine Biology and Biotechnology, 1994, 3(5): 294-299.
- [10] 崔丽娜, 杜娟, 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. 世界科学技术-中医药现代化, 2011, 13(2): 424-428.
- [11] 岳巧云, 邱德义, 黄艺文, 等. DNA 条形码技术在未知昆虫幼虫种类鉴定中的应用. 中国卫生检验杂志, 2011, 32(3): 615-617.

陕西省安康地区稻水象甲发生危害规律研究

王显安¹ 田仕荷² 王春卷¹ 陈杰³

(1. 安康市植保植检站 陕西安康 725000; 2. 宁陕县农业技术推广中心; 3. 石泉县农业技术推广中心)

摘要 通过开展稻水象甲疫情分布、发生危害程度、疫情传入途径等系统调查, 试验研究了稻水象甲的发生危害规律, 摸清了安康地区稻水象甲危害特点、年生活史和生活习性, 为提升稻水象甲的监测预警和防控水平提供理论依据和技术支撑。

关键词 稻水象甲; 发生规律; 生活习性; 危害特点; 年生活史

中图分类号 S433

稻水象甲(*Lissorhoptrus oryzophilus*) 为我国农业检疫性有害生物。2007 年 6 月在陕西省安康市宁陕、石泉两县首次发现, 目前, 该虫仍在宁陕、石泉两县部分区域发生, 发生面积 802hm², 占全市水稻总面积的 2.4%。几年来, 我们本着实际、实用、实效地原则, 以应用技术研究为主, 试验研究与调查研究相结合, 通过定点调查、全面普查、系统观测、试验研究等技术环节, 掌握了稻水象甲危害特点、年生活史、生活习性、发生规律等, 为科学指导综合防控提供技术支撑。

1 疫情传入途径调查

通过深入细致的调查研究, 并与当地干部群众

进行座谈了解、走访调查和现场勘察, 结合初发现区域稻水象甲的发生特点综合分析, 表明: 传入安康市的初侵染虫源来自当地公路绿化临时堆放行道树苗的稻草包装材料, 这些绿化树苗和稻草包装物以及树根携带土壤多数来自于毗邻的汉中市。而初发生区稻田也都在公路沿线, 并集中危害。传入安康市后近距离扩散蔓延则是随暴雨、水流、迁飞为主, 稻草运输、秧苗串换和趋光扩散为辅。

2 危害情况调查

2.1 疫情分布调查

系统调查和全面普查结果表明, 稻水象甲在宁陕、石泉 2 县 9 个乡镇 76 个村 331 个组发生, 2007