

基于 DNA 条形码技术对朝鲜牛黄安宫丸中犀牛角成分鉴别的研究

王殿夫¹, 齐欣², 李长征³, 刘洪伟⁴, 麻丽丹^{4*}, 杨希国⁵

(1. 辽东学院 辽宁 丹东 118000; 2. 大连海关技术中心 辽宁 大连 116000; 3. 大东港海关 辽宁 东港 118300;
4. 丹东海关 辽宁 丹东 118000; 5. 辽宁通正检测有限公司 辽宁 沈阳 110026)

摘要: 目的 建立 DNA 条形码技术对朝鲜牛黄安宫丸中犀牛角成分的真伪鉴别方法, 对打击非法贸易及保护珍稀濒危野生动物具有重大意义. 方法 以涉案朝鲜牛黄安宫丸为材料, 根据材料自身的特点对其进行消化处理后采用市售动物基因组核酸提取试剂盒方法提取核酸, 并采用 DNA 条形码片段 12S rRNA 通用引物对提取的基因组 DNA 进行 PCR 扩增反应和测序. 结果 对测序结果使用 NCBI 中 Blast 进行序列相似性分析比对, 结果表明 5 份涉案朝鲜牛黄安宫丸的扩增产物序列与非洲水牛的线粒体 DNA 的 12S rRNA 基因序列的部分片段的一致性达 98.84%, 因此为水牛角成分并非使用濒危物种犀牛角. 结论 依靠分子生物学中 DNA 条形码技术对疑似犀牛角药材进行准确的物种鉴定, 可用于鉴别犀牛角药材的真伪, 为各执法部门提供可靠的技术支持, 规范国内和口岸犀牛角制品市场.

关键词: 犀牛角; 物种鉴别; DNA 条形码技术; 牛黄安宫丸

中图分类号: R 927; S 863; Q 7 文献标志码: A 文章编号: 1000-5846(2021)01-0046-07
DOI:10.16197/j.cnki.lnurse.2021.01.006

Research on the Species Identification of Rhinoceros Horn in Bezoar Angong pill of Korea based on DNA Bar-coding Technique

WANG Dian-fu¹, QI Xin², LI Chang-zheng³, LIU Hong-wei⁴, MA Li-dan^{4*}, YANG Xi-guo⁵

(1. Eastern Liaoning University, Dandong 118000, China; 2. Technical Center of Dalian Customs, Dalian 116000, China; 3. Dadonggang Customs, Donggang 118300, China; 4. Dandong Customs, Dandong 118000, China; 5. Liaoning Tongzheng Testing Co., Ltd, Shenyang 110026, China)

Abstract: Objective To establish the rhinoceros horn in Bezoar Angong pill of Korea authenticity methods based on DNA bar-coding technique, it will help to combat illegal trade and protect rare and endangered wild animals. Methods Use the case involved Bezoar Angong pill of Korea as materials, according to the characteristics of material used for the digestion treatment, the kit for extraction of nucleic acid from animal genome in market was used to extract the total DNA, then the Genomic DNA was amplified and sequenced by using 12S rRNA universal primers of

收稿日期: 2020-11-18

基金项目: 海关总署科研项目(2019HK040)

作者简介: 王殿夫(1973-), 男, 辽宁丹东人, 硕士, 副教授, 研究方向: 食品安全.

* 通讯作者: 麻丽丹, E-mail: 110697186@qq.com.

DNA bar-code fragment. Results The similarity alignment and analysis of sequences with NCBI in Blast and then the phylogenetic tree was built. The results show that the obtained sequences from Bezoar Angong pill of Korea show 98.84% consistent with partial mitochondrial DNA 12S rRNA gene of *Synceruscaffer*. So it is made from Buffalo Horn instead of the endangered species Rhino Horn. Conclusion The species of rhinoceros horn medicinal materials could be accurate determined by using DNA bar-coding technique of molecular biology. It can be used to identify the authenticity of rhinoceros horn medicinal materials ,offer reliable technical support for law enforcement agencies and regulate the domestic and port rhinoceros Horn products market.

Key words: rhinoceros horn; species identification; DNA bar-coding technique; Bezoar Angong pill

0 引言

犀牛曾遍布地球,但由于偷猎及栖息地被破坏的原因,从 70 年代至今世界上的犀牛种群至少下降了 85%^[1]. 目前世界上仅存的犀牛共包含 5 个物种,即苏门达腊犀(*Dicerorhinus sumatrensis*)、非洲的白犀(*Ceratotherium simum*)和黑犀(*Diceros bicornis*),以及亚洲的印度犀(*Rhinoceros unicornis*)、爪哇犀(*Rhinoceros sondaicus*)^[2]. 犀牛角早在《本草纲目》、《神农本草经》和《药性本草》等药典中有过明确的记载,作为一种珍贵稀有的药材,具有泻火解毒、凉血止血、清心安神及治疗癌症的功效^[3-7]. 而造成物种极度濒危状态的根源是犀牛角的珍贵^[8]. 1977 年起《濒危野生动植物种国际贸易公约》(CITES)将所有现存犀牛物种列入其附录 I 的监管范围^[9-10]. 1993 年 5 月,我国国务院发布的《关于禁止犀牛角和虎骨贸易的通知》(国发[1993]39 号)中严令禁止犀牛角的进出口及用其制药^[11]. 近年来,由于犀牛角的稀少和珍贵使其价格飙升,犀牛的盗猎、非法贸易和走私等现象仍然有发生,更有一些不法分子为了牟取巨额利润用家畜角制品来仿制加工,以冒充真正的犀牛角^[12]. 现市场上涉及的角骨类入药药材,由于其难以提取,造成了其鉴定工作的困难,无法配合质检、海关及公安部门的仲裁工作. 因此,急需建立犀牛角制品准确、快速的鉴定方法,为各执法部门提供技术支持^[13]. 随着分子生物学的发展,DNA 条形码(DNA Bar-coding)技术已成为一种新兴的生物分类学方法,具有广泛的应用前景,不仅不受样本形状、形态等条件限制,也逐渐被应用于珍贵药材成分的鉴定中,以建立高效的物种鉴别技术方法^[14-19]. 同时动物角骨类药材的条形码多来自线粒体基因 DNA 和核基因. 线粒体 DNA 不仅结构简单、进化速度快,还严格按照母系遗传,其控制区具有种群和个体的特异性,现已被国际上广泛地应用于物种鉴定及系统进化等领域,也是药物分子鉴定中 DNA 条形码的重要来源^[20]. 其中线粒体基因组中的 12S rRNA 基因就被主要应用在物种鉴定中^[21]. 目前尚未见采用 12S rRNA 基因鉴定角类药材的相关报道.

朝鲜牛黄安宫丸是安宫牛黄丸的成品制剂. 本研究以涉案的朝鲜牛黄安宫丸为材料,对其消化

处理后提取 DNA, 采用 12S rRNA 作为 DNA 条形码基因片段, 通过 PCR 扩增、测序和比对分析, 用于安宫牛黄丸中犀牛角成分的真伪鉴别方法, 确定了安宫牛黄丸制品准确及便捷的核酸提取和物种鉴别方法, 为规范国内和口岸安宫牛黄丸制品市场的监管, 打击非法贸易提供有效的技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究材料来自于涉案的朝鲜牛黄安宫丸, 产品共计 13 份。同时采用犀牛角和山羊角分别作为试验阳性和阴性对照样本。

1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取

考虑角制品结构坚硬造成细胞膜不容易破碎, 同时朝鲜牛黄安宫丸属于深加工药材, 由于经过加工处理造成 DNA 降解和提取工作的困难, 综合以上原因需对材料进行前期消化处理。处理方法为: 取检材 500 mg 于 50 mL 离心管中, 加入 5 mL 细胞裂解液(2% CTAB、100 mmol/L Tris、1.4 mol/L NaCl、20 mmol/L EDTA、pH8.0) 摇匀, 充分混匀后 55 ℃ 水浴中温和震荡消化过夜, 置于 65 ℃ 恒温箱中温育 2 h。然后采用 Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit 试剂盒提取动物组织基因组 DNA。

1.2.2 PCR 引物

采用合成 12S rRNA 基因序列的通用引物对 L1091 / H1478^[22] 对各检材进行 PCR 扩增反应, 通用引物序列如表 1 所示。

表 1 PCR 反应引物序列

引物名称	引物碱基序列(5'-3')
L1091	AAAAAGCTTCAAACTGGGATTAGATACCCCACTAT
H1478	TGACTGCAGAGGGTGACGGCGCGGTGTGT

1.2.3 PCR 扩增反应体系及条件

每 50 μL PCR 反应体系: 5 μL 10 × Ex Taq buffer(Mg²⁺ plus) 4 μL dNTP Mixture(2.5 mmol/L) 0.25 μL TaKaRa Ex Taq(5 U/μL) 1 μL L1091(10 mol/L) 1 μL H1478(10 mol/L) 2 μL 模板 DNA 加 ddH₂O 至 50 μL。

PCR 反应参数: 98 ℃ 变性 10 s, 55 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 60 s, 40 个循环; 72 ℃ 延伸 10 min。

1.2.4 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳检测

PCR 扩增反应结束后, 将各 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 以 DL2000 maker 作为参照, 在凝胶成像系统下观察电泳情况。

1.2.5 PCR 产物测序

使用 ABI 3500 基因分析仪进行测序分析。每份检材的 PCR 产物均进行双向测序, 以保证所测序列的准确性。

1.2.6 序列分析

检材经测序后获得正反两条序列,采用 DNA Star 软件(DNA Star ,Inc) 中的 Seq Man 程序对双向测序结果进行拼接处理^[23]. 序列使用美国国家生物技术信息中心(National Center of Biotechnology Information ,NCBI) ^[24] 中的 Blast 程序进行相似性分析比对,分别确定检材的基因序列号后以鉴别其物种种类.

2 结果与讨论

2.1 PCR 产物电泳结果

采用 12S rRNA 基因序列合成的通用引物对犀牛角、山羊角和朝鲜牛黄安宫丸扩增产物分别进行电泳后,扩增片段如图 1 至图 3 所示. 从图 1-3 可知,犀牛角、山羊角及朝鲜牛黄安宫丸扩增产物分别得到约 500 bp、450 bp 和 500 bp 条带清晰的扩增片段. 由于朝鲜牛黄安宫丸本身制品为深加工产品,再加上其成分的复杂,13 份涉案的朝鲜牛黄安宫丸中只有 5 份检材(C-3 ~ C-7) 得到了目的性扩增片段. 该通用引物 L1091/ H1478 对角制品类可以得到稳定、亮度高的目的片段,能满足 DNA 条形码技术在物种鉴定检测上的基本试验要求.

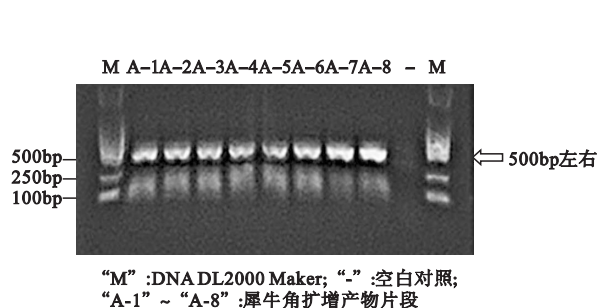


图1 犀牛角 PCR 扩增电泳图

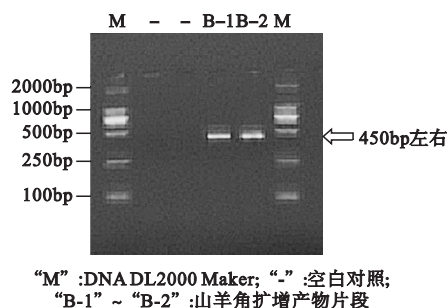


图2 山羊角 PCR 扩增电泳图

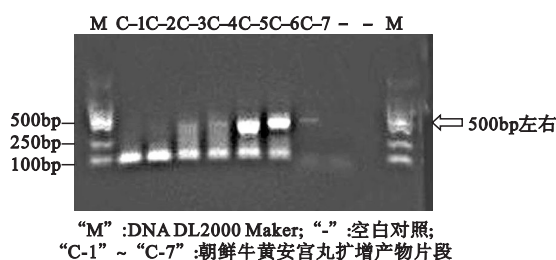


图3 朝鲜牛黄安宫丸 PCR 扩增电泳图

2.2 测序结果及分析

将各检材的目的片段测序后,使用 NCBI 的 Blast 程序分别对其进行相似性的检索及比对,只选取了各检材相似序列的 5 个比对结果进行了列举,结果见表 2. 其中犀牛角检材(A1 ~ A8) 扩增产物序列与白犀(*Ceratotherium simum*) 线粒体 DNA 的 12S rRNA 基因序列部分片段的一致性可高达 100.00%, 同时在比对结果中也发现犀牛角检测扩增产物序列与黑犀(*Diceros bicornis*) 线粒体 DNA 的 12S rRNA 基因序列部分片段的一致性达 96.25%, 因此,自 NCBI 下载白犀和黑犀物种线粒体 12S rRNA 全序列同犀牛角检材扩增产物序列进行比对,结果见图 4, 由图可以看出犀牛角检材扩增

产物序列和白犀(基因序列号: Y07726. 1) 12S rRNA 基因部分序列比对结果完全一致 ,而和黑犀(基因序列号: FJ608807. 1) 12S rRNA 基因部分序列比对结果存在 16 个碱基的差异 ,说明在犀牛物种中白犀和黑犀亲缘关系很近 ,两者特征序列相差不大 ,才造成犀牛角检材扩增产物序列和黑犀 12S rRNA 基因序列的部分片段一致性达 96. 25% ,犀牛角检材应为犀牛物种中的白犀; 山羊角检材(B-1、B-2) 扩增产物序列与山羊(*Capra hircus*) 线粒体 DNA 的 12S rRNA 基因序列部分片段的一致性可高达 99. 51%; 朝鲜牛黄安宫丸(C-3 ~ C-7) 扩增产物序列与非洲水牛(*Syncerus caffer*) 线粒体 DNA 的 12S rRNA 基因序列部分片段的一致性可达 98. 84% . 使用相似性检索及比对后 结果显示本研究收集的对照样本犀牛角和山羊角均具有较好的序列匹配度 ,采用 12s rRNA 基因所鉴定的物种与实际收集检材一致 ,从而验证角制品采用 12S rRNA 作为 DNA 条形码基因片段进行物种鉴定结果的准确、可靠. 在对照样本正常的情况下 5 份涉案的朝鲜牛黄安宫丸与非洲水牛线粒体 DNA 的 12S rRNA 基因序列部分片段一致性大于 98% 可信度的一般要求 ,因此物种鉴定的结果为含有的是非洲水牛成分.

表 2 检材中 12S rRNA 基因的序列相似性比对

检材	E 值	序列匹配度	基因序列号	鉴定物种
犀牛角	0.0	100.00%	FJ608805.1	白犀(<i>Ceratotherium simum</i>)
	0.0	100.00%	Y07726.1	白犀(<i>Ceratotherium simum</i>)
	0.0	99.50%	FJ608806.1	白犀(<i>Ceratotherium simum</i>)
	0.0	99.50%	X86942.1	白犀(<i>Ceratotherium simum</i>)
	0.0	96.25%	FJ608807.1	黑犀(<i>Diceros bicornis</i>)
山羊角	0.0	99.51%	MK234706.1	山羊(<i>Capra hircus</i>)
	0.0	99.51%	MH229952.1	山羊(<i>Capra hircus</i>)
	0.0	99.51%	LR025741.1	山羊(<i>Capra hircus</i>)
	0.0	99.51%	LS992662.1	山羊(<i>Capra hircus</i>)
	0.0	99.51%	LS992661.1	山羊(<i>Capra hircus</i>)
朝鲜牛黄安宫丸	5e-125	98.84%	JQ235547.1	非洲水牛(<i>Syncerus caffer</i>)
	5e-125	98.84%	JQ235546.1	非洲水牛(<i>Syncerus caffer</i>)
	5e-125	98.84%	JQ235545.1	非洲水牛(<i>Syncerus caffer</i>)
	5e-125	98.84%	JQ235544.1	非洲水牛(<i>Syncerus caffer</i>)
	5e-125	98.84%	JQ235543.1	非洲水牛(<i>Syncerus caffer</i>)

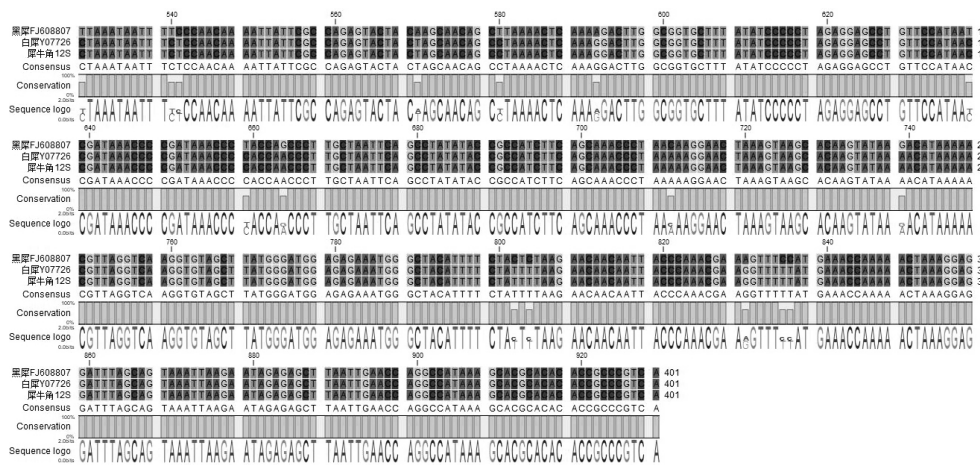


图 4 犀牛角检材与白犀、黑犀的线粒体基因组中 12S rRNA 基因部分序列比对图

3 结论

由于犀牛角珍贵稀有、神奇的药效和巨大的经济价值,使犀牛物种濒临灭绝. 在全球范围内珍稀濒危物种非法贸易被公认为是谋取超高额利润的违法活动之一^[25]. 中国始终支持禁止任何犀牛制品交易的禁令. 因此,采用分子生物学方法精准鉴定药材中是否含有犀牛角成分,在打击非法贸易和确定物种来源的案件中具有及其重要的意义.

由于角制品本身高度角质化的特点就会增加试验提取的难度,再将其加工后微量入药,与其他中药基原成分进行混合则更会造成基因组 DNA 含量的减少. 本研究针对上述原因对检材进行有针对性的消化处理后,采用试剂盒提取基因组 DNA,已从 13 份涉案的朝鲜牛黄安宫丸中鉴定出 5 份检材是否含有犀牛角成分. 说明通过对检材进行前期的消化处理过程可得到较好质量的 DNA 模板,提高针对角类药材物种鉴别方法的灵敏度,而针对没有得到目的扩增片段的涉案检材,如何从其复杂繁多的成分中更有效地提取 DNA 将作为下一步研究工作的重点. 通过测序、相似性检索比对,表明采用位于线粒体上的 12S rRNA 基因序列的通用引物对 L1091 / H1478 可以准确地辨别出犀牛角制品的真伪. 本研究中涉案的朝鲜牛黄安宫丸经 DNA 条形码技术鉴定结果为非洲水牛 (*Syncerus caffer*),并非使用我国限制入药的犀牛角. 有研究表明水牛角和犀牛角均含有较多的 Zn 元素,为其可替代犀牛角提供了一定依据^[26]. 针对角类制品及其药材制品的物种鉴别,该方法的建立可以为各执法部门相关案件的物种鉴定和量刑提供准确可靠的依据,为珍稀濒危物种的监管和打击非法贸易提供技术支持,从而更好地保护珍稀濒危动物犀牛,规范国内和口岸犀牛角制品及其药材制品的市场.

参 考 文 献:

- [1] 刘元. 地球上的犀牛[J]. 野生动物, 1997(1): 3-5.
- [2] 杜艳艳,贾谦. 关于犀牛保护及犀角持续利用的建议[J]. 资源开发与市场, 2008, 24(9): 825-826.
- [3] 王斐,段金廛,钱大玮,等. 犀角及羚羊角替代资源的寻找与评价研究(II)[J]. 南京中医药大学学报, 2007, 23(1): 36-39.
- [4] 胡春萍,蒋加进,石磊,等. 牦牛角等 6 种角类药超细粉对发热家兔的影响[J]. 医学动物防制, 2006, 22(4): 235-238.
- [5] But Paul PH, Yan-Kit T, Lai-Ching L. Ethnopharmacology of *Rhinoceros* horn. II: Antipyretic effects of prescriptions containing *Rhinoceros* horn or water buffalo horn[J]. Journal of Ethnopharmacology, 1991, 33(1/2): 45-50.
- [6] But Paul PH, Lai-Ching L, Yan-Kit T. Ethnopharmacology of *Rhinoceros* horn. I: Antipyretic effects of *Rhinoceros* horn and other animal horns[J]. Journal of Ethnopharmacology, 1990, 30(2): 157-168.
- [7] 张壹萱,涂飞云,韩卫杰,等. 基于线粒体基因对穿山甲鳞片和犀牛角物种鉴定[J]. 南方林业科学, 2020, 48

- (4): 75–78.
- [8] 周晶梅. 犀牛角及其制品鉴定识别方法的研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2010.
- [9] 李圣清, 祖恩东, 孙一丹, 等. 犀牛角及其替代品的红外光谱分析[J]. 光谱实验室, 2011, 28(6): 3186–3189.
- [10] 周晶梅, 金煜, 胡红. 犀牛角及其制品的快速鉴定方法[J]. 东北林业大学学报, 2010, 38(5): 140–141.
- [11] 尹峰, 梦梦, 徐玲, 等. 濒危野生动植物药材非法贸易调查[J]. 林业资源管理, 2015(2): 24–30.
- [12] 陈云霞, 郭海涛. 基于 12s rRNA 的犀牛角制品 DNA 条形码鉴定分析[J]. 中国法医学杂志, 2016, 31(5): 473–475.
- [13] Edwards H G M, Hunt D E, Sibley M G. FT-Raman spectroscopic study of keratotic materials: Horn, hoof and tortoiseshell[J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 1998, 54(5): 745–757.
- [14] 赵竹, 宋云, 许瑾, 等. 基于 COI 基因对犀角工艺品真伪的鉴别[J]. 植物检疫, 2013, 27(2): 68–71.
- [15] 蔡延森, 张修月, 岳碧松, 等. 我国 8 种猛禽的 DNA 条形码技术研究[J]. 四川动物, 2009, 28(3): 334–340.
- [16] Barrett R D H, Hebert P D N. Identifying spiders through DNA barcodes[J]. Canadian Journal of Zoology, 2005, 83(3): 481–491.
- [17] Prakash S, Patole M S, Ghumatkar S V, et al. Mitochondrial 12S rRNA sequence analysis in wildlife forensics[J]. Current Science, 2000, 78(10): 1239–1241.
- [18] 刘君, 李琪, 孔令锋, 等. 基于线粒体 CO I 的 DNA 条形码技术在贻贝科种类鉴定中的应用[J]. 水生生物学报, 2011, 35(5): 874–881.
- [19] 姚琳, 江艳华, 李青娇, 等. 基于 DNA 检测技术鉴定水产加工品原料的研究进展[J]. 中国渔业质量与标准, 2013, 3(1): 33–39.
- [20] 陈梦, 方昀, 程汝滨, 等. 线粒体 DNA 标记在动物类药材分子鉴定中的应用进展[J]. 中草药, 2018, 49(13): 3134–3142.
- [21] 罗志萍, 肖武汉, 黄迎波, 等. 线粒体 DNA 分子技术在斑点叉尾鲷物种鉴定中的应用[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(11): 20–23.
- [22] Folmer O, Black M, Hoeh W, et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates[J]. Molecular Marine Biology and Biotechnology, 1994, 3(5): 294–299.
- [23] 刘萍, 段亚飞, 毛智超, 等. 中华虎头蟹线粒体 16S rRNA 和 CO I 基因的序列比较及其系统进化分析[J]. 水产学报, 2013, 37(10): 1441–1451.
- [24] 梁日深, 陈铭, 廖国威, 等. 基于 16S rRNA 与 COI 基因 40 种石斑鱼亚科鱼类分子系统进化关系[J]. 海洋学报, 2020, 42(6): 9–19.
- [25] 周世良, 徐超, 董文攀, 等. DNA 条形码技术在珍稀濒危物种保护中的应用[J]. 生物多样性, 2015, 23(3): 288–290.
- [26] 敖艳霖. 犀牛角及其制品鉴定方法标准化的研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2018: 1–59.

(责任编辑 李超)