

鹿茸、鹿角的位点特异性 PCR 鉴别

钱润^{1,2}, 田娜¹, 张雪艳¹, 蒋超^{1*}, 袁媛^{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. 安徽中医药大学 药学院, 合肥 230012)

[摘要] **目的:** 建立一种快速、高效、简便的鹿茸、鹿角位点特异性聚合酶链式反应(PCR)鉴别方法。**方法:** 通过比较梅花鹿、马鹿及其混伪品的 COI, Cytb 基因序列差异, 根据 Cytb 片段上的 3 个 SNP (single nucleotide polymorphism) 变异位点设计出一对鹿茸的特异性鉴别引物 LR-238 上游和 LR-238 下游, 并对影响 PCR 结果的主要因素退火温度, PCR 循环次数, 模板 DNA 浓度, Taq 酶用量和及影响重复性的 Taq 酶种类和 PCR 仪型号等进行方法学考察和优化。**结果:** 进行方法学考察确定最优鉴别条件的基础上, 当 PCR 退火温度为 56 ℃, 循环次数为 35 次的条件下, 鹿茸、鹿角正品均能扩增出约 250 bp 片段, 其他 9 种混伪品麋鹿、白唇鹿、水鹿、坡鹿、黠鹿、骡鹿、驯鹿、驼鹿、狍及阴性对照无条带。不同来源的药用的马鹿亚种东北马鹿、塔河马鹿、天山马鹿、阿拉善马鹿、阿勒泰马鹿、新西兰马鹿, 梅花鹿亚种东北梅花鹿、华南梅花鹿样品使用建立的位点特异性 PCR 鉴别方法均产生约 250 bp 特异性鉴别条带。**结论:** 该文设计的鉴别引物具有高度的专属性, 所建立的位点特异性 PCR 鉴别方法可用于鹿茸、鹿角的准确鉴别。

[关键词] 鹿茸; 鹿角; 特异性聚合酶链式反应; 混伪品; 梅花鹿; 马鹿

[中图分类号] R284. 2; R285; R22; R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)17-0118-06

[doi] 10. 13422/j. cnki. syfjx. 20191712

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20190515.1736.011.html>

[网络出版时间] 2019-05-17 8:27

Identification of Cervi Cornu Pantotrichum and Cervi Cornu by Allele-specific PCR

QIAN Run^{1,2}, TIAN Na¹, ZHANG Xue-yan¹, JIANG Chao^{1*}, YUAN Yuan^{1*}

(1. State Key Laboratory Breeding Base of Dao-di Herbs, China Academy of
Chinese Medical Sciences, National Resource Center for Chinese Materia Medica, Beijing 100700, China;
2. College of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China)

[Abstract] **Objective:** To obtain a rapid, efficiency and convenient polymerase Chain reaction (PCR) identification method for medicinal Cervi Cornu Pantotrichum, Cervi Cornu and its common adulterates. **Method:** Based on three single nucleotide polymorphisms (SNP) of Cytb gene DNA sequences among *Cervus nippon*, *C. elaphus* and its adulterants, a pair of species-specific primers (LR-238. F and LR-238. R) was designed, the reaction conditions were optimized, and the PCR method for identification was explored and verified in terms of tolerance and feasibility. **Result:** Through the established allele-specific PCR method, under the annealing temperature of 56 ℃ and cycle number of 35, 250 bp of fragments were amplified from DNA templates of Cervi Cornu Pantotrichum, Cervi Cornu and its subspecies in origin animal samples as well as herbal medicines. All of the adulterants species of *Przewalskium albirostris*, *Cervus eldi*, *Odocoileus hemionus*, *Dama dama*, *Alces alces*, *Elaphurus davidianus*, *Capreolus pygargus*, *Rusa unicolor* and *Rangifer tarandus* were negative by the PCR assay.

[收稿日期] 20190104(011)

[基金项目] 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(ZZ10-008);中央本级重大增减支项目(2060302)

[第一作者] 钱润,在读硕士,从事中药分子鉴定研究,E-mail:312282720@qq.com

[通信作者] * 蒋超,助理研究员,从事中药分子鉴定研究,Tel:010-64087649,E-mail:jiangchao0411@163.com;
* 袁媛,研究员,从事中药鉴定与分子生物学研究,Tel:010-64087649,E-mail:y_yuan0732@163.com

Conclusion: The identification primer is highly specific, and the allele-specific PCR identification method established in this paper can accurately identify the medicinal Cervi Cornu Pantotrichum and Cervi Cornu.

[Key words] Cervi Cornu Pantotrichum; Cervi Cornu; allele-specific PCR; adulterants; *Cervus nippon*; *C. elaphus*

鹿类药材是我国传统名贵中药材,包括鹿茸、鹿角、鹿血、鹿胎、全鹿干等,其中鹿茸、鹿角是主要药用材料,来源于鹿科动物梅花鹿 *Cervus nippon* 或马鹿 *C. elaphus* 雄鹿的茸角^[1],其价格昂贵,商品来源复杂多样。此前调查研究表明,鹿茸和鹿角的伪品主要包括驯鹿 (*Rangifer tarandus*), 驼鹿 (*Alces alces*), 白唇鹿 (*Przewalskium albirostris*), 水鹿 (*Rusa unicolor*), 狍 (*Capreolus pygargus*), 海南坡鹿 (*Cervus eldi*), 麋鹿 (*Elaphurus davidianus*), 骡鹿 (*Odocoileus hemionus*) 等^[2-4]。鹿茸和鹿角原药材性状特征明显,易与其他混伪品区分,但切成饮片后,用于鉴定的分支形态、表面纹理特征基本全部消失,难以鉴别,急需建立简便、可靠的基原鉴别方法。

近年来,动物药材 DNA 分子鉴定技术快速发展^[5-9],《中国药典》已收载蕲蛇、乌梢蛇、金钱白花蛇等动物药材的聚合酶链式反应 (PCR) 鉴别方法。多种分子检测技术已用于鹿类药材的准确鉴定,张蓉等^[10]和崔丽娜等^[11]对鹿茸及其伪品的 COI 条形码序列进行研究,表明其可用于鉴定鹿茸真伪。JIANG 等^[3]建立了鹿茸及其混伪品的聚合酶链式反应-酶切长度多态性 (PCR-RFLP) 鉴别方法。陈康等^[12]发现鹿茸正品梅花鹿和马鹿与其混伪品驯鹿、白唇鹿 DNA 熔解曲线具有区别,使用高分辨率熔解曲线可以准确区分鹿茸正伪。

但梅花鹿、马鹿亚种众多,目前仍缺乏对其主要药用亚种进行全面采样进行分子鉴定研究的报道。本文针对梅花鹿、马鹿各亚种的 Cytb 序列进行比对分析,发现梅花鹿、马鹿与其他混伪品鹿种相区分的 3 个 SNP 位点,建立鹿茸、鹿角位点特异性 PCR 鉴别方法,并对影响 PCR 鉴别准确性的关键因素进行优化,形成简便、准确的鹿茸、鹿角的分子鉴别方法。

1 材料

1.1 药材 对照药材购自中国食品药品检定研究院[鹿茸(梅花鹿)批号 121031-201304;鹿茸(马鹿)批号 121570-201202,鹿角(马鹿)批号 121487-200501],药材样品购自安徽亳州、河北安国、四川荷花池、辽宁西丰等药材市场以及吉林长春、新疆乌鲁木齐、新疆昌吉、甘肃兰州、吉林通化、广东中山等地区。共收集样品 188 批,其中马鹿 75 批,梅花鹿

茸 29 批,混伪品 9 种共 84 批(表 1),经中国食品药品检定研究院张继研究员、北京市卫生学校马春副教授及本文作者蒋超博士鉴定,保存于中国中医科学院中药资源中心。

1.2 试剂 DNeasy Blood & Tissue Kit(上海凯杰企业管理有限公司,批号 69506);Ex Taq DNA 聚合酶(批号 RR001A),SpeedSTAR HS Taq DNA 聚合酶(批号 RR070A),rTaq DNA 聚合酶(批号 R001A),MightyAmp DNA 聚合酶 Ver. 2(批号 R071A)均购自宝日医生物技术(北京)有限公司;FasPfu Fly Taq DNA 聚合酶(北京全式金生物科技有限公司,批号 AP231-02);2 × T5 Super PCR Mix 预混液(北京擎科新业生物技术有限公司,批号 TSE005);2 000 bp DNA Marker(北京全式金生物技术有限公司,批号 BM101)。

1.3 仪器 Veriti™ 型 PCR 仪, GeneAmp 9700 型 PCR 仪(Applied Biosystem 公司);PTC-100 型 PCR 仪,SYNGENE 型凝胶成像系统(Gene 公司);TC-512 型 PCR 仪(上海 Techne 公司);Nanodrop 2000 型微量核酸定量分析仪(美国 Thermo Scientific 公司)。

2 方法

2.1 引物设计 通过测序及分析 NCBI 中马鹿、梅花鹿、麋鹿、白唇鹿、水鹿、坡鹿、黇鹿、骡鹿、驯鹿、驼鹿、狍的 COI 和 Cytb 基因序列,使用 Clustal W 程序进行序列比对,分析梅花鹿、马鹿及其混伪品的 COI 及 Cytb 基因序列差异。利用引物设计软件 Premier Primer 5.0 设计出能特异性鉴别马鹿和梅花鹿的鉴别引物对 LR-238 上游 5'-AGACGCAGACAAA ATCACC-3' 和 LR-238 下游 5'-TAAGACTCCTCC TAGTTTGTGG-3',由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

2.2 基因组 DNA 提取 样品使用 70% 乙醇擦拭表面,晾干。经 MM 400 DNA 球磨粉碎仪(德国莱驰公司)研磨至粉末,按照 DNeasy Blood & Tissue Kit 说明书提取总 DNA,采用 Nanodrop 2000 微量核酸定量分析仪测定其浓度和纯度,用于 PCR 反应或于 -20 ℃ 保存备用。

2.3 PCR 扩增条件的确定 特异性 PCR 反应初始体系:PCR 反应体系 25 μL,包含 10 × Ex buffer

表 1 鹿茸试验材料来源信息

Table 1 Information of experimental materials in this study

No.	材料名称	拉丁学名	数量/个	规格	采集地
1	鹿茸(马鹿)	<i>Cervus elaphus</i>	1	粉末	对照药材
2	鹿茸(梅花鹿)	<i>C. nippon</i>	1	粉末	对照药材
3	鹿角(马鹿)	<i>C. elaphus</i>	1	粉末	对照药材
4	东北马鹿	<i>C. elaphus xanthopygus</i>	4	鹿茸片	辽宁西丰
5	东北马鹿	<i>C. elaphus xanthopygus</i>	3	粉末	韩国
6	塔河马鹿	<i>C. elaphus yarkandensis</i>	2	整枝鹿茸	乌鲁木齐
7	塔河马鹿	<i>C. elaphus yarkandensis</i>	3	整枝鹿茸	新疆昌吉
8	塔河马鹿	<i>C. elaphus yarkandensis</i>	3	鹿角片	新疆昌吉
9	天山马鹿	<i>C. elaphus songaricus</i>	3	整枝鹿茸	新疆昌吉
10	天山马鹿	<i>C. elaphus songaricus</i>	6	鹿茸片	新疆昌吉
11	天山马鹿	<i>C. elaphus songaricus</i>	3	鹿角片	新疆昌吉
12	阿拉善马鹿	<i>C. elaphus alashanicus</i>	2	鹿茸片、鹿角片	韩国
13	阿勒泰马鹿	<i>C. elaphus alashanicus</i>	3	整枝鹿茸	新疆昌吉
14	阿勒泰马鹿	<i>C. elaphus alashanicus</i>	3	鹿茸片	新疆昌吉
15	阿勒泰马鹿	<i>C. elaphus sibiricus</i>	3	鹿茸片、鹿角片	韩国
16	阿勒泰马鹿	<i>C. elaphus sibiricus</i>	3	鹿角片	新疆昌吉
17	新西兰马鹿	<i>C. elaphus canadensis</i>	4	鹿茸片	辽宁西丰
18	新西兰马鹿	<i>C. elaphus canadensis</i>	7	鹿茸片	韩国
19	马鹿	<i>C. elaphus</i>	1	鹿茸片	甘肃兰州
20	马鹿	<i>C. elaphus</i>	10	鹿茸片	北京
21	马鹿	<i>C. elaphus</i>	5	鹿茸片、鹿角片	安徽亳州
22	马鹿	<i>C. elaphus</i>	1	整枝鹿茸	重庆
23	马鹿	<i>C. elaphus</i>	2	整枝鹿茸	安徽亳州
24	马鹿	<i>C. elaphus</i>	1	整枝鹿茸	乌鲁木齐
25	东北梅花鹿	<i>C. nippon hortulorum</i>	2	鹿茸片	辽宁西丰
26	东北梅花鹿	<i>C. nippon hortulorum</i>	5	鹿茸片、鹿角片	韩国
27	东北梅花鹿	<i>C. nippon hortulorum</i>	2	鹿血	江苏苏州
28	华南梅花鹿	<i>C. nippon kopschi</i>	1	鹿血	江苏苏州
29	梅花鹿	<i>C. nippon</i>	1	鹿茸片	四川成都
30	梅花鹿	<i>C. nippon</i>	3	鹿茸片	辽宁西丰
31	梅花鹿	<i>C. nippon</i>	3	鹿茸片	北京
32	梅花鹿	<i>C. nippon</i>	1	鹿角片	河北安国
33	梅花鹿	<i>C. nippon</i>	6	整枝鹿茸	安徽亳州
34	梅花鹿	<i>C. nippon</i>	1	整枝鹿茸	广西玉林
35	梅花鹿	<i>C. nippon</i>	1	整枝鹿茸	辽宁西丰
36	梅花鹿	<i>C. nippon</i>	2	整枝鹿茸	乌鲁木齐
37	白唇鹿	<i>Przewalskium albirostris</i>	1	鹿茸片	安徽亳州
38	白唇鹿	<i>P. albirostris</i>	1	鹿茸片	江苏苏州
39	白唇鹿	<i>P. albirostris</i>	1	鹿茸片	北京
40	白唇鹿	<i>P. albirostris</i>	1	鹿角片	广东广州
41	海南坡鹿	<i>Cervus eldi</i>	1	鹿皮	江苏苏州
42	海南坡鹿	<i>C. eldi</i>	1	鹿茸片	北京
43	骡鹿	<i>Odocoileus hemionus</i>	1	鹿角片	安徽亳州
44	黇鹿	<i>Dama dama</i>	1	鹿角片	河北安国

续表 1					
No.	材料名称	拉丁学名	数量/个	规格	采集地
45	驼鹿	<i>Alces alces</i>	1	鹿角片	北京
46	麋鹿	<i>Elaphurus davidianus</i>	1	鹿茸片	北京
47	狍	<i>Capreolus pygargus</i>	3	鹿角片	河北安国
48	狍	<i>C. pygargus</i>	8	整枝狍角	北京
49	水鹿	<i>Rusa unicolor</i>	1	鹿角片	河北安国
50	水鹿	<i>R. unicolor</i>	1	鹿茸片	安徽亳州
51	水鹿	<i>R. unicolor</i>	1	整枝鹿茸	新疆昌吉
52	驯鹿	<i>Rangifer tarandus</i>	17	鹿茸片、鹿角片	安徽亳州
53	驯鹿	<i>R. tarandus</i>	9	鹿茸片、鹿角片	安徽亳州
54	驯鹿	<i>R. tarandus</i>	1	鹿角片	广东广州
55	驯鹿	<i>R. tarandus</i>	1	鹿角片	广东揭阳
56	驯鹿	<i>R. tarandus</i>	1	鹿茸片	广东中山
57	驯鹿	<i>R. tarandus</i>	4	鹿茸片	广西玉林
58	驯鹿	<i>R. tarandus</i>	12	鹿茸片、鹿角片	河北安国
59	驯鹿	<i>R. tarandus</i>	1	鹿茸片	湖南长沙
60	驯鹿	<i>R. tarandus</i>	2	鹿茸片	吉林通化
61	驯鹿	<i>R. tarandus</i>	2	鹿茸片、鹿角片	吉林延边
62	驯鹿	<i>R. tarandus</i>	4	鹿茸片、鹿角片	吉林长春
63	驯鹿	<i>R. tarandus</i>	1	整枝鹿茸	辽宁西丰
64	驯鹿	<i>R. tarandus</i>	2	鹿茸片	四川成都
65	驯鹿	<i>R. tarandus</i>	2	鹿茸片	乌鲁木齐
66	驯鹿	<i>R. tarandus</i>	1	鹿茸片	云南昆明

2.5 μL,10 mmol·L⁻¹ dNTPs 1.5 μL,上游及下游引物 0.5 μL,Ex Taq DNA 聚合酶 0.4 μL,DNA 模板 1 μL,加灭菌蒸馏水补足至 25 μL,初始反应程序为 95 ℃ 预变性 5 min,(95 ℃ 变性 30 s,56 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 30 s)共 35 个循环,72 ℃ 终延伸 5 min。PCR 反应结束后,取反应产物,加入 6 × Loading buffer 5 μL(Takara 公司),混匀后于溴化乙锭(EB)染色的 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,SYNGENE 凝胶成像系统观察、成像。

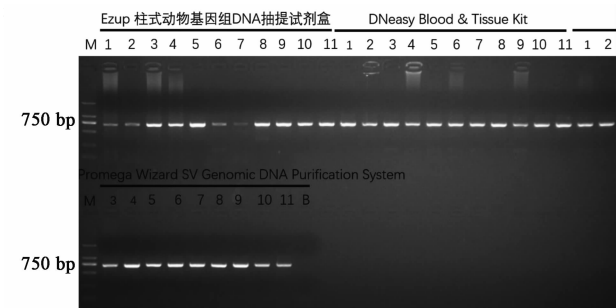
使用鹿茸鉴别引物对对鹿茸正品及其常见伪品 DNA 进行扩增,分别考察①退火温度 52,54,56,58 ℃;②PCR 循环次数 31,33,35,37;③模板 DNA 用量 90,30,10,3 ng;④Taq 酶种类 Ex Taq,rTaq,2 × T5 Super PCR Mix,SpeedSTAR HS Taq,MightyAmp,FasPfu Fly Taq;⑤不同型号 PCR 仪 Veriti™ 型,ABI 9700 型,PTC-100 型,TC-512 型对 PCR 反应稳定性的影响。

2.4 方法适用性考察 采用上述条件考察后所确定的最佳反应体系和反应参数,进行鹿茸特异性 PCR 鉴别的适用性实验考察,验证该体系是否能稳定准确地鉴别鹿茸。

3 结果与分析

3.1 DNA 提取 为选出适宜鹿茸 PCR 鉴定的 DNA 提取方法,分别使用 DNeasy Blood & Tissue Kit,Ezup 柱式动物基因组 DNA 抽提试剂盒(生工生物工程科技有限公司,批号 SK8252),Wizard SV Genomic DNA Purification System 试剂盒[普洛麦格(北京)生物技术有限公司,批号 0000303114]进行 DNA 提取,选择 COI 片段进行 PCR 扩增^[13],以检测 DNA 提取成功率。发现 3 种 DNA 提取试剂盒均具有良好提取效果,在测试的 11 批样品中均能提取出 DNA,使用 COI 扩增均能获得约 700 bp 大小条带,其中 DNeasy Blood & Tissue Kit,Promega Wizard SV Genomic DNA Purification System 试剂盒提取后扩增效果良好,能产生明亮条带(图 1)。

3.2 PCR 鉴别条件的确定 对影响 PCR 扩增的关键因素退火温度,循环数,DNA 模板浓度,Taq 酶用量等进行了系统考察,同时考察筛选的条件对不同 Taq DNA 聚合酶及不同 PCR 扩增仪的耐受性。结果表明,退火温度位于 52 ~ 58 ℃,循环数 30 ~ 40,DNA 模板质量浓度 3 ~ 90 mg·L⁻¹,Taq 酶用量在 1 ~ 2.5 U 时均可准确鉴别鹿茸、鹿角及其常见伪品(表 2)。Taq 酶种类对鉴别特异性有影响,使用 T5



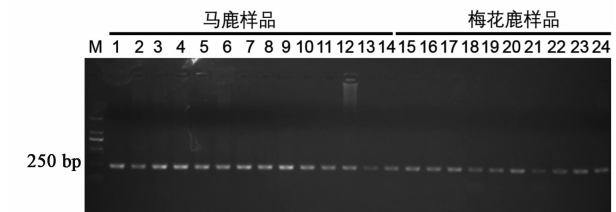
M. DL2000 Marker;1~3. 梅花鹿茸、马鹿茸、马鹿角对照药材;4. 梅花鹿腊片;5. 马鹿半腊片;6. 梅花鹿二杠;7. 马鹿黄粉片;8. 马鹿血片;9~10. 马鹿角片;11. 狗角;B. 空白对照(以 ddH₂O 为模板)

图 1 3 种不同 DNA 提取试剂盒提取鹿茸 DNA 效果
Fig.1 Extract result from different specifications of Cervi Cornu Pantotrichum by 3 kinds of DNA extraction kits

表 2 鹿茸、鹿角 PCR 鉴别条件考察

Table 2 Optimizing of PCR conditions for specific identification of Cervi Cornu Pantotrichum and Cervi Cornu

参数	参数值	适宜范围	最优条件
退火温度/℃	52,54,56,58	52~58	56
PCR 循环数	31,33,35,47	33~37	35
模板浓度/mg·L ⁻¹	3,10,30,90	3~90	30
Taq 酶用量/U	1,1.5,2,2.5	1~2.5	1.5
Taq 酶种类	T5,SpeedSTAR,Ex Taq,rTaq,MightyAmp,FasPfu Fly Taq	除 T5 和 MightyAmp 外均可使用	SpeedSTAR
PCR 仪	9700,Veriti,PTC-100,TC-512	均可使用	Veriti



1. 东北马鹿;2. 塔河马鹿;3. 天山马鹿;4. 阿拉善马鹿;5. 阿勒泰马鹿;6. 新西兰马鹿;7~10. 市售马鹿茸;11~14. 市售马鹿角;15. 东北梅花鹿;16. 华南梅花鹿;17~24. 市售梅花鹿茸

图 2 不同亚种和产地梅花鹿、马鹿位点特异性 PCR 鉴别
Fig. 2 Identification results of different subspecies and collect regions about specific PCR for Cervus nippon and C. elaphus

4 讨论

特异性 PCR 鉴别方法已成为中药 DNA 分子鉴定的主流方法,该方法多基于正伪品之间的差异 SNP 位点开发,对鉴别人员的技术和要求不高,实用性强,可达到快速鉴别的目的。已有文献报导采用位点特异性 PCR 鉴别鹿茸真伪,采用双重引物对鹿茸正伪品进行扩增鉴别,王学勇等^[14]采集了来自于东北、新疆、新西兰的鹿茸样品,基于 Cytb 序列上的 SNP 位点差异建立鹿茸药材的位点特异性 PCR 方法鉴别鹿茸正品梅花鹿、马鹿及 9 种近缘鹿科混伪

MightyAmp Taq 进行鉴别时水鹿样品出现约 250 bp 弱扩增条带而导致假阳性结果。不同型号 PCR 仪对结果影响较小,使用 4 种不同 PCR 仪均能准确鉴别鹿茸、鹿角正伪(表 2)。

3.3 方法的适用性考察 采用筛选出的最优体系和反应条件,对不同市场上的 75 批马鹿,29 批梅花鹿及 84 批麋鹿、白唇鹿、水鹿、坡鹿、黠鹿、骡鹿、驯鹿、驼鹿、狍混伪品进行扩增,产物经琼脂糖凝胶电泳检测,发现马鹿及梅花鹿各亚种及市售药材均产生约 250 bp 的明亮单一条带(图 2),混伪品和阴性对照无条带(图 3),不同市场来源的正品鹿茸均产生一致结果,表明该体系能稳定准确地鉴别鹿茸、鹿角基原。



1~3. 梅花鹿茸、马鹿茸、马鹿角对照药材;4~6. 梅花鹿角、马鹿角、马鹿茸市售药材;7. 白唇鹿;8. 海南坡鹿;9. 骡鹿;10. 黠鹿;11. 驼鹿;12. 麋鹿;13. 狍;14. 水鹿;15~23. 驯鹿;24. 空白对照(以 dd H₂O 为模板)

图 3 位点特异性 PCR 鉴别梅花鹿、马鹿及其混伪品
Fig. 3 Identification results of specific PCR for Cervus nippon, C. elaphus and its adulterants

品,白根本等^[15]利用 12S rRNA 基因片段鉴别马鹿和梅花鹿,这些研究为鹿类中药的特异性 PCR 鉴别提供了背景资料,本研究在此基础上对梅花鹿和马鹿各药用亚种进行了进一步采样,建立更为可靠的分子鉴别方法。由于梅花鹿和马鹿均包含多个亚种,尤其是东北马鹿和新疆马鹿亲缘关系、形态特征等均有显著的差异,分类学上常有争议^[16],“中国哺乳动物多样性(2 版)”一文^[17]则将马鹿分为马鹿 Cervus yarkandensis,东北马鹿 C. canadensis,西藏马鹿 C. wallichii,梅花鹿各亚种均合并为梅花鹿

Cervus hortulorum, 与 2015 年版《中国药典》有较大出入。且各亚种 DNA 序列常具有很大差异,难以找到各亚种一致而与混伪品鹿种相区分的单一 SNP 位点,无法根据单一 SNP 位点鉴别塔河马鹿、天山马鹿、东北马鹿、梅花鹿及其混伪品。为此,建立鹿茸、鹿角的 PCR 鉴别方法需对其主要来源地样品进行广泛采集,涵括所有药用亚种,筛选和验证可能的鉴别位点,建立基于多个位点联用的位点特异性鉴别方法。

本研究根据养殖及进口鹿茸调研结果,采集了实际供药用的马鹿亚种东北马鹿、塔河马鹿、天山马鹿、阿拉善马鹿、阿勒泰马鹿、新西兰马鹿、梅花鹿亚种东北梅花鹿、华南梅花鹿样本,并从 NCBI 上下载了所有鹿亚科和空齿鹿亚科物种的 1 146 条 Cytb 序列进行分析,发现 Cytb 序列上梅花鹿、马鹿存在 3 个特异性 SNP 位点,又根据位点特异性 PCR 鉴别引物的设计原则,将引物 3'末端设计位于 SNP 鉴别位点上,并人为引入错配增加鉴别效力,设计出一对梅花鹿、马鹿特异性的鉴别引物,并对影响鉴别准确性的关键因素进行考察,广泛采集不同规格的市售样本进行验证,最终建立简便、准确的鹿茸、鹿角的分子鉴别方法。

【致谢】北京中医药大学刘春生教授、韩国韩医药研究院文炳哲研究员及苏州红冠庄国药股份有限公司周辰杰研究员提供样品。

[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,2015:323-324.
[2] 何琴. 鹿茸及其伪品的性状鉴别[J]. 实用中医药杂志,2017,33(9):1102-1104.
[3] JIANG C, JIN Y, ZHAO X L, et al. Rapid and robust authentication of deer antler velvet product by fast PCR-RFLP analysis[J]. Mitochondrial DNA Part A,2018,29(2):266-272.
[4] 高晓晨,刘冬,崔丽娜,等. 市售鹿茸饮片及鹿茸粉的

DNA 条形码鉴定[J]. 吉林中医药,2016,36(7):706-708.
[5] 蒋超,金艳,袁媛,等. 羚羊角塞特异性 PCR 鉴别方法研究[J]. 世界中医药,2018,13(2):252-255.
[6] 刘富艳,金艳,袁媛,等. 多重位点特异性 PCR 鉴别海龙及其混伪品[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(15):57-64.
[7] 张鑫,王福,陈美君,等. 金钱白花蛇与三种常见混伪品多重 PCR 鉴别方法[J]. 时珍国医国药,2015,26(12):2927-2929.
[8] 蒋超,赵群,金艳,等. 快速 PCR 技术鉴别中药材蛤蚧的方法研究[J]. 中国现代中药,2017,19(1):21-25.
[9] 黄璐琦,袁媛,蒋超,等. 动物药材分子鉴别现状与策略[J]. 中国现代中药,2017,19(1):1-10.
[10] 张蓉,刘春生,黄璐琦,等. 鹿茸饮片的 DNA 条形码鉴别研究[J]. 中国药学杂志,2011,46(4):263-266.
[11] 崔丽娜,杜鹤,刘新成,等. 基于 COI 条形码序列的鹿茸及其混伪品的 DNA 分子鉴定[J]. 吉林中医药,2012,32(4):384-387.
[12] 陈康,蒋超,袁媛,等. 基于熔解曲线分析技术的鹿茸药材分子鉴别[J]. 中国中药杂志,2015,40(4):619-623.
[13] Hebert P D N, Ratnasingham S, de Waard J R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species[J]. Proc R Soc B,2003(270):S96-99.
[14] 王学勇,刘春生,张蓉,等. 位点特异性 PCR 方法的建立及对近源种鹿茸药材的鉴别研究[J]. 中国中药杂志,2009,34(23):3013-3016.
[15] 白根本,张林源,刘春生,等. 鹿源类中药材 DNA 序列分析及马鹿和梅花鹿的 PCR 鉴定[J]. 中草药,2006(10):1566-1569.
[16] Pitra C, Fickel J, Meijaard E, et al. Evolution and phylogeny of old world deer[J]. Mol Phylogenet Evol, 2004,33(3):880-895.
[17] 蒋志刚,刘少英,吴毅,等. 中国哺乳动物多样性[J]. 生物多样性,2017,25(8):886-895.

[责任编辑 顾雪竹]