

# 林蛙油的DNA提取及鉴定方法

聂丹丹<sup>1</sup>, 王春雨<sup>2</sup>, 毕程程<sup>3</sup>, 胡婷婷<sup>1\*</sup>, 付海滨<sup>4</sup>, 李玲<sup>1</sup>

(1. 长春海关技术中心, 长春 130062; 2. 长春海关, 长春 130033;  
3. 延吉海关技术中心, 延吉 133001; 4. 沈阳海关技术中心, 沈阳 110000)

**摘要: 目的** 建立基于分子生物学鉴定林蛙油真伪的检测方法。**方法** 采集成年雌蛙卵巢组织, 经风干制成林蛙油, 通过改良方法提取总DNA, 以已报道的东北林蛙、黑龙江林蛙、黑斑侧褶蛙、牛蛙和中华蟾蜍的COI及cytB基因为模板, 设计引物探针。**结果** PCR扩增产物测序结果中仅东北林蛙获得230 bp左右产物, 且序列比对与东北林蛙COI序列一致性为99%左右, 说明实验对象林蛙为东北林蛙。**结论** 利用线粒体基因独特的优势, 应用PCR扩增东北林蛙COI基因, 通过测序确定东北林蛙亚种, 建立了东北林蛙亚种及其产品的鉴别方法。

**关键词:** 东北林蛙; 林蛙油; 线粒体COI基因; DNA测序; 真伪鉴别

## DNA extraction and identification of the oviductus ranae

NIE Dan-Dan<sup>1</sup>, WANG Chun-Yu<sup>2</sup>, BI Cheng-Cheng<sup>3</sup>, HU Ting-Ting<sup>1\*</sup>, FU Hai-Bin<sup>4</sup>, LI Ling<sup>1</sup>

(1. Changchun Customs Technical Center, Changchun 130062, China; 2. Changchun Customs District People's Republic of China, Changchun 130033, China; 3. Yanji customs comprehensive technical services, Yanji 133001, China; 4. Shenyang Customs Technical Center, Shenyang 110000, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish a detection method based on molecular biology to identify the authenticity of oviductus ranae. **Methods** The ovary tissues of adult female frogs were collected and dried to make frog oil. The total DNA was extracted by the improved method. Primer probes were designed using the reported COI and cytB genes of *Rana dybowskii*, *Rana amurensis*, *Pelophylax nigromaculatus*, *Rana (Lithobates) catesbeianus* and *Bufo raddei* as templates. **Results** Sequencing results of PCR amplification products showed that only *Rana dybowskii* obtained about 230 bp of products, and the sequence alignment was about 99% consistent with the COI sequence of *Rana dybowskii*, indicating that the experimental object was *Rana dybowskii*. **Conclusion** Based on the unique advantages of mitochondrial gene, the COI gene of *Rana dybowskii* is amplified by PCR, and the subspecies of *Rana dybowskii* is identified by sequencing. The identification method of *Rana dybowskii* and its products is established.

**KEY WORDS:** *Rana dybowskii*; oviductus ranae; Mitochondrial COI gene; DNA sequencing; authenticity identification

基金项目: 原国家质检总局项目(2017IK208)

Fund: Supported by the Former General Administration of Quality Supervision (2017IK208)

\*通信作者: 胡婷婷, 高级工程师, 主要研究方向为食品检验。E-mail: 178068609@qq.com

\*Corresponding author: HU Ting-Ting, Senior Engineer, Changchun Customs Technical Center, Changchun 130062, China. E-mail: 178068609@qq.com

## 0 引言

东北林蛙主要产区在吉林省的通化、白山、桦甸等县市,是所有林蛙种类中营养价值最丰富的。林蛙油即雌性林蛙输卵管的干制品,具有珍贵的医疗保健价值,是名贵的中药材。由于地域条件差异,各地林蛙的生态差异较大,各地林蛙油的品质不同。利用形态数据对我国林蛙进行居群对比,研究结果表明我国东北地区的中国林蛙居群为东北林蛙(*Rana dybowskii*)<sup>[1-2]</sup>。但目前这种观点仍存在很大争议,东北林蛙系统分类地位位于中国林蛙种组<sup>[3-4]</sup>。

林蛙油作为中药材,现有的鉴定依据还停留在性状、显微和理化性质等,在实践中很难鉴别。日本学者早在 20 世纪末对本国和邻国林蛙的线粒体基因组做了亲缘关系的研究<sup>[5-8]</sup>。董瑶等<sup>[9]</sup>利用线粒体 DNA 上的 *cytB* 鉴定林蛙及林蛙油,发现同样条件下,新鲜组织提取总 DNA 较容易,而干林蛙油的总 DNA 提取困难;王孟虎等<sup>[10-11]</sup>利用活体林蛙作为蛤蟆油基原动物进行分子实验,但由于成品油遇水体积增大百倍并粘稠无法提取其 DNA 进行分子生物学鉴定。杨学干等<sup>[12]</sup>对不同蛙类进行鉴定,未能得到区分东北林蛙和黑龙江林蛙的 PCR 方法。综上所述,现有的文献报道均不能有效鉴别东北林蛙和黑龙江林蛙。本研究利用突变率高的线粒体基因组,即母系遗传“分子钟”<sup>[13]</sup>,通过线粒体研究可以了解中国分布林蛙物种的系统发生关系、演化历史、及其近缘物种的组成,而其中的特异基因 *COI* 为研究对象进行研究。本研究通过改良方法提取晾干林蛙油总 DNA,针对东北林蛙的特异位点设计特异引物及探针,鉴定纯正林蛙油产品,以期为我国东北地区林蛙的良种选育及其产品的深加工提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

本研究形态学鉴定依据《中国动物志 两栖纲(下卷)无尾目 蛙科》<sup>[3]</sup>、《吉林省野生动物图鉴(两栖类 爬行类 哺乳类)》<sup>[14]</sup>、GB/T 25884—2010《蛙类形态性状测定》<sup>[15]</sup>。经专家鉴定本依据所得动物样品为:中华蟾蜍(*Bufo gargarizans*)(5 只)、黑斑侧褶蛙(*Pelophylax nigromaculatus*)(5 只)、牛蛙[*Rana (Lithobates) catesbeianus*](2 只)、黑龙江林蛙(*Rana amurensis*)(3 只)、东北林蛙(*Rana dybowskii*)(32 只)。其中 16 个地域东北林蛙购自黑龙江省伊春,辽宁省恒仁和丹东,吉林省集安、安图、珲春、白山、图们、汪清、吉林、桦甸、抚松、蛟河、靖宇、临江、通化,均未产性成熟个体。

### 1.2 仪器与试剂

Basic 型电泳仪(美国伯乐 BIO-RAD 公司); EP 型多功

能凝胶检测分析系统(美国 ALPHA 公司); 7A0-0052 型核酸蛋白检测仪(日本日立公司); Mastercycler nexus GSX1 型梯度 PCR 仪(德国 Eppendorf 公司); QuantStudio7 荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司); MM400 组织研磨仪(德国莱驰公司); Sunrise 酶标仪(瑞士 TECAN 公司)。

2×Taq PCR 预混液(批号: N20630)[宝生物工程(大连)有限公司]; 2% CTAB(批号: HC28172940)(华诚生物)、蛋白酶 K(批号: No.160020444)(德国 QIAGEN 公司)、TIANamp Genomic DNA Kit 血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒(批号: #S7628)[天根生化科技(北京)有限公司]; 实时荧光 PCR 2 倍预混液(批号: 00699230)(美国 ABI 公司)。

### 1.3 样品处理

将干燥卵巢组织样品至组织研磨仪充分研磨,分别取不同重量的粉末状样品(设 3 次重复),装入 1.5 mL 离心管,加入不同体积的蛋白酶 K; 取 5 种蛙类各 20 mg 样品分别加入 1.0 mL 和 0.5 mL CTAB 裂解液,同时在每个样品中加入 20 μL 蛋白酶 K; 各取东北林蛙和牛蛙干燥卵巢组织 0.5 g, 24 h 充分吸涨泡发后各取 0.5 g 样品加入不同体积裂解液, 20 μL 蛋白酶 K。

### 1.4 DNA 提取

利用溴化十六烷基三甲铵(cetyltrimethylammonium bromide, CTAB)法提取样品 DNA; 估测 DNA 质量鉴定和 DNA 浓度,用酶标仪检测 DNA 质量和估测浓度。也可使用 DNA 提取试剂盒并按其说明提取制备模板 DNA。

### 1.5 目的基因片段 PCR 扩增

从 GenBank 分别下载东北林蛙、黑龙江林蛙、黑斑侧褶蛙、牛蛙和中华蟾蜍的线粒体 *COI* 基因序列和细胞色素 *CYTb* 基因序列进行比对,利用 Primer 3 设计 5 对特异性引物探针。其中 *COI* 3-F: 5'-ccccttagctggcaactca-3', *COI* 3-R: 5'-gtgctggtagagaactgggt-3', *COI* 3-P: 5'-atcaatcctggggcaatca-3'(由上海生工生物工程有限公司合成)。各对引物目的片段分别为: 185、488、193、306、311 bp。

PCR 反应体系: 2 倍预混液 10.0 μL, 上下游引物各加 1.0 μL, DNA 模板加 2.0 μL, 补足灭菌 ddH<sub>2</sub>O 至 20.0 μL, 阴性对照为灭菌 ddH<sub>2</sub>O。PCR 循环参数: 94 °C 5 min, 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s, 循环 35 次, 72 °C 5 min。取 5 μL PCR 产物, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 在 EP 型多功能凝胶检测分析系统下观察并拍照。

实时荧光 PCR 反应体系: 2×PCR Mix 10.0 μL, 上下游引物及探针各加 1.0 μL, DNA 模板加 5.0 μL, 补足灭菌 ddH<sub>2</sub>O 至 20.0 μL, 阴性对照为灭菌 ddH<sub>2</sub>O。循环参数: 50 °C 2 min, 94 °C 10 min; 95 °C 15 s, 60 °C 60 s, 循环 40 次。

将 PCR 产物送至上海生工生物工程有限公司进行双

向测序,由 EditSeq 软件编辑整理,在 GenBank 上进行 Blast 比对验证物种。

## 2 结果与分析

### 2.1 比较 DNA 提取效果

将干燥后充分研磨的样品卵巢组织取 20 mg 分别加入 1.0 mL 和 0.5 mL 裂解液,同时加入等量的 20  $\mu$ L 蛋白酶 K,结果证明加入 0.5 mL 裂解液的样品提取效果显著高于 1.0 mL 裂解液(见表 1)。

取不同重量粉末状样品(设 3 次重复)装入 1.5 mL 离心管,加入 1 mL 裂解液,同时分别加入不同体积蛋白酶 K,进行对比实验。结果表明,在取样量为 100 mg 时样品不能全部溶解于 1 mL 裂解液中,产生结块;而样品取样量为 50 mg、50  $\mu$ L 蛋白酶 K 的情况下提取效果最佳(见表 2)。

### 2.2 目的基因片段 PCR 扩增结果

将 16 个地域东北林蛙油样品及其他蛙类油样品进行引物 *COI* 3 的 PCR 扩增和实时荧光 PCR 扩增,PCR 反应产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,在 311 bp 处均出现清晰

单一的目的基因片段条带,其他蛙类样品未出现对应条带(见图 1)。

表 1 不同裂解液量对提取效果的影响

Table 1 Effects of different volumes of lysis buffer on extraction

物种名称	浓度/(ng/ $\mu$ L)		$OD_{260/280}$	
	1.0 mL 裂解液	0.5 mL 裂解液	1.0 mL 裂解液	0.5 mL 裂解液
黑斑侧褶蛙	15.8 $\pm$ 0.8**	43.95 $\pm$ 3.5	1.805 $\pm$ 0.025	1.815 $\pm$ 0.005
黑龙江林蛙	6.25 $\pm$ 1.2**	25.05 $\pm$ 4.5	1.56 $\pm$ 0.08	1.53 $\pm$ 0.02
中华蟾蜍	26.2 $\pm$ 1.1*	36.05 $\pm$ 1.85	1.73 $\pm$ 0.03	1.65 $\pm$ 0.02
东北林蛙	6.7 $\pm$ 0.8*	9.85 $\pm$ 1.65	1.54 $\pm$ 0.09	1.65 $\pm$ 0.1
牛蛙	11.25 $\pm$ 1.25**	30.05 $\pm$ 4.3	1.81 $\pm$ 0.02	1.91 $\pm$ 0.12

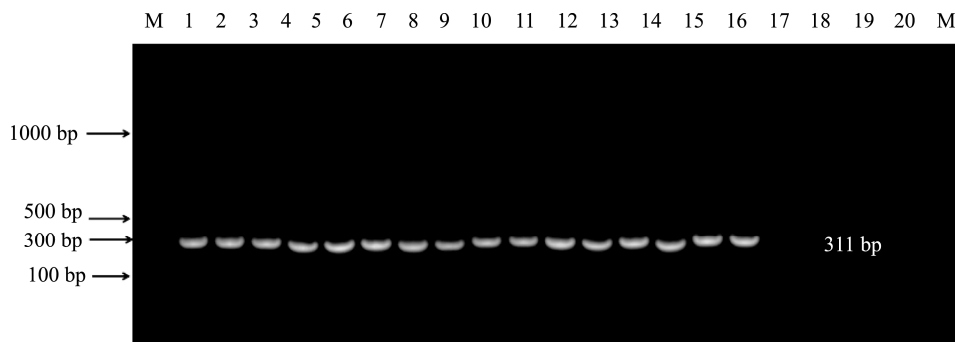
注:  $P < 0.05$ , 用\*表示;  $P < 0.01$ , 用\*\*表示。

将 16 个地域东北林蛙油样品及其他蛙类油样品 DNA 进行引物 *COI* 3 的实时荧光 PCR 扩增,结果仅 16 个地域的东北林蛙油样品出现明显扩增条带,而其他蛙类油样品无扩增条带(见图 2)。

表 2 样本量及蛋白酶 K 对提取效果的影响

Table 2 Effects of protease K and sample weight on extraction

加样量/mg	蛋白酶 K/ $\mu$ L					
	20		50		100	
	浓度/(ng/ $\mu$ L)	$OD_{260/280}$	浓度/(ng/ $\mu$ L)	$OD_{260/280}$	浓度/(ng/ $\mu$ L)	$OD_{260/280}$
100	23.45 $\pm$ 0.05	1.93 $\pm$ 0.03	21.65 $\pm$ 0.1	1.61 $\pm$ 0.11	8.95 $\pm$ 0.3	1.5 $\pm$ 0.12
50	12.75 $\pm$ 0.15	1.86 $\pm$ 0.04	15.95 $\pm$ 0.21	1.91 $\pm$ 0.3	19.85 $\pm$ 0.42	1.69 $\pm$ 0.4
20	1.0 $\pm$ 0.8	0.89 $\pm$ 0.25	1.45 $\pm$ 0.33	1.26 $\pm$ 0.06	6.25 $\pm$ 1.2	1.81 $\pm$ 0.45
10	0.35 $\pm$ 0.12	0.78 $\pm$ 0.5	0.35 $\pm$ 0.2	2.33 $\pm$ 0.9	1.65 $\pm$ 0.3	2.71 $\pm$ 0.23



注: 泳道依次为: 1. 集安; 2. 安图; 3. 琿春; 4. 白山; 5. 图们; 6. 汪清; 7. 丹东; 8. 伊春; 9. 蛟河; 10. 靖宇; 11. 抚松; 12. 桦甸; 13. 临江; 14. 恒仁; 15. 通化; 16. 吉林; 17. 黑龙江林蛙; 18. 中华蟾蜍; 19. 黑斑侧褶蛙; 20. 牛蛙。

图 1 引物 *COI* 3 的 PCR 产物电泳图

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of primer *COI* 3

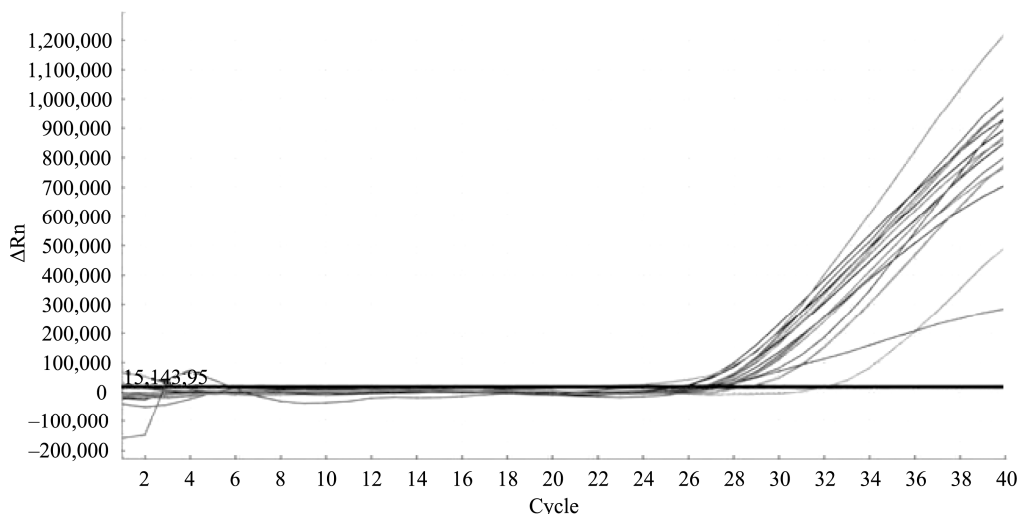
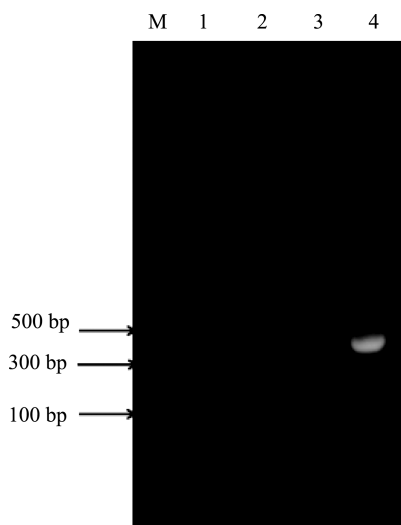


图 2 *COI 3* 引物探针对应的 16 个地区东北林蛙样品扩增效果图  
Fig.2 The effect of *COI 3* primer probe detecting samples of *Rana dybowskii* from 16 areas

仿照实际食用方法泡发比较干燥林蛙油和牛蛙油, 结果表明经温水浸泡后体积泡发为原体积的 100 倍的东北林蛙油和 40 倍的牛蛙油进行普通 PCR 扩增, 经过普通 PCR 方法扩增取得的反应产物在凝胶成像仪上未见扩增片段(见图 3)。说明普通 PCR 方法不适用于泡发后林蛙油真伪鉴别。



注: 扩增条带 M 为 100 bp Marker; 1 为泡发后东北林蛙; 2 为泡发后牛蛙; 3 为阴性对照; 4 为东北林蛙。

图 3 引物 *COI 3* 对泡发后东北林蛙和牛蛙的基因片段琼脂糖凝胶电泳图

Fig.3 Agarose gel electrophoresis of primer *COI 3* by the *Rana dybowskii* sample and *Rana (Lithobates) catesbeianus* sample after water absorbing

引物探针 *COI 3* 对东北林蛙(2 份样品)、泡发后东北林蛙、黑龙江林蛙、黑斑侧褶蛙、中华蟾蜍和牛蛙的实时

荧光 PCR 扩增图(见图 4), 表明实时荧光 PCR 方法可以鉴别经泡发后的林蛙油样品。

### 2.3 引物探针的特异性验证

取 19 种 DNA(包括 3 份东北林蛙、土豆、藕粉、红薯粉、银耳、绿豆、玉米、鹿心、牛、羊、鸭、蛇、川贝母、白花蛇、乌梢蛇、牛蛙、黑斑侧褶蛙、黑龙江林蛙、中华蟾蜍)进行实时荧光 PCR 检测, 其中不含有东北林蛙成分的样品中无扩增信号, 只有东北林蛙样品有扩增信号, 表明所设计的引物和探针基因具有良好的特异性(见图 5)。

### 2.4 引物探针的灵敏性验证

以 DNA 浓度为 20 ng/μL 的东北林蛙油样品为原液, 制成 4 个连续梯度(DNA 浓度分别为 20、2、0.2、0.02 ng/μL)的稀释液后, 对 *COI 3* 引物探针进行灵敏性实验, 结果见图 6, 标准曲线见图 7。说明本方法可以在 DNA 含量浓度较低的条件有效鉴别东北林蛙油。

### 2.5 引物探针的重复性验证

经过 8 次重复实时荧光 PCR 检测, 表明 *COI 3* 引物探针具有良好的重复性(见图 8), 对东北林蛙油的 DNA 扩增非常稳定, 实验数据可信。

### 2.6 目的基因片段 PCR 扩增产物测序结果分析

引物 *COI 3* 的 PCR 扩增产物经上海生工所得正反向测序结果在 GenBank 中 Blast N 分析见表 3。各地的东北林蛙比对结果与东北林蛙 *COX 1* 基因公布的序列 MH481231.1、MH481253.1、MH481251.1、MH481241.1、MH481234.1 的序列对比结果同源性在 97.9%~100%, 表明 16 个地域的东北林蛙遗传相似性非常高, 具有高度的同源性, 同时也验证了本鉴别方法的有效性。

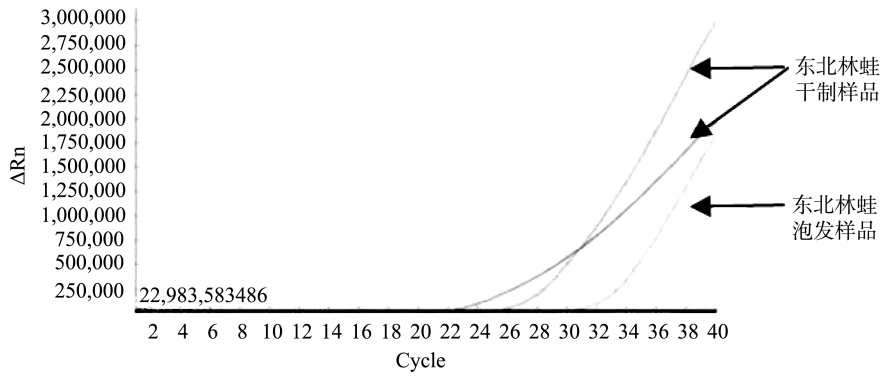


图 4 样品不同处理方式的引物探针 *COI 3* 的扩增效果图  
 Fig.4 Effects of *COI 3* primer and probe detecting different treatment methods of samples

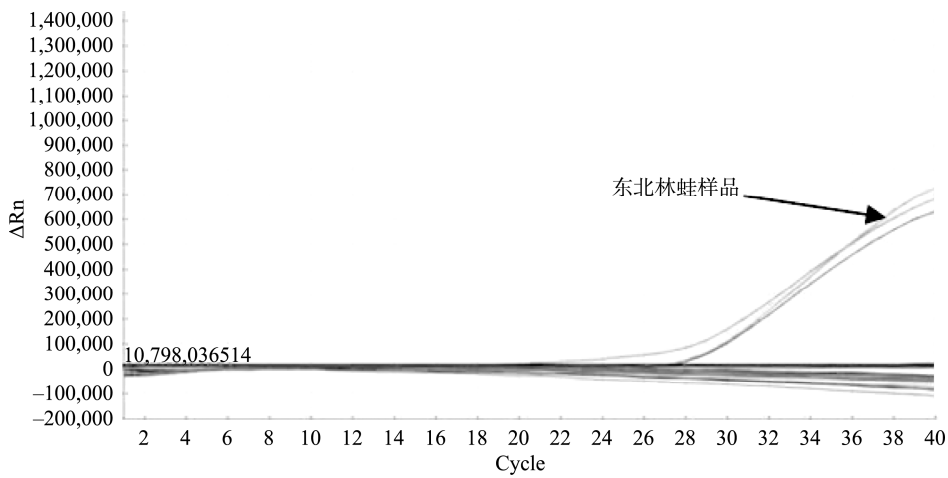


图 5 *COI 3* 引物探针的特异性实验  
 Fig.5 Specificity experiment of *COI 3* primer and probe

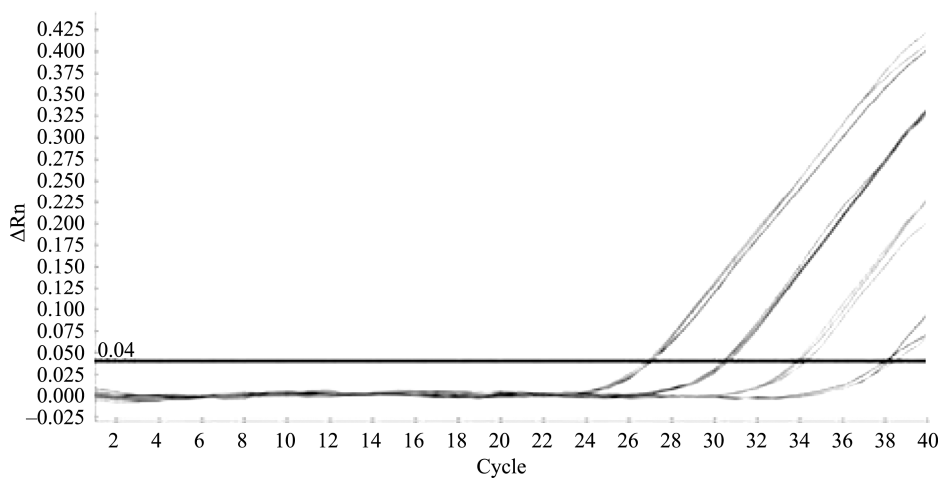


图 6 *COI 3* 引物探针实时荧光 PCR 的东北林蛙样品灵敏性实验  
 Fig.6 Sensitivity experiments of *Rana dybowskii* sample by *COI 3* primer and probe

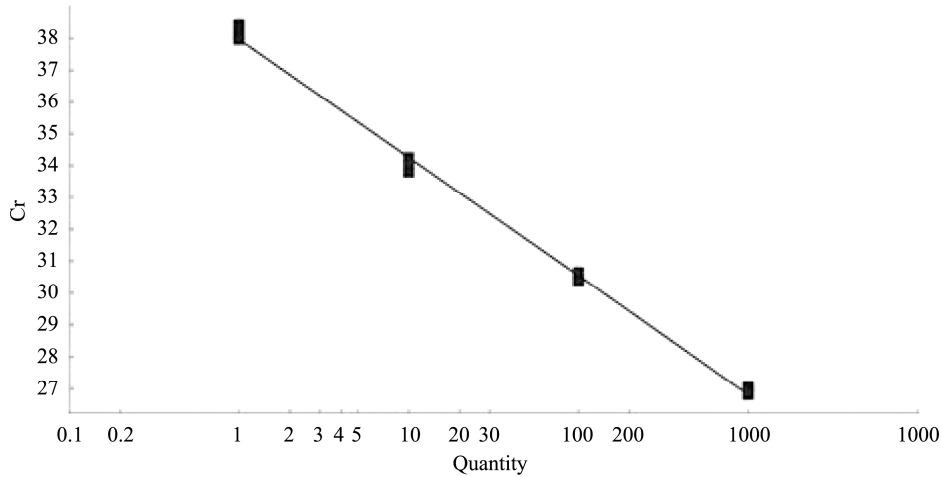


图 7 *COI* 3 引物探针的东北林蛙样品 4 个连续稀释度标准曲线

Fig.7 Standard curve of sensitivity experiments of *Rana dybowskii* sample by *COI* 3 primer and probe

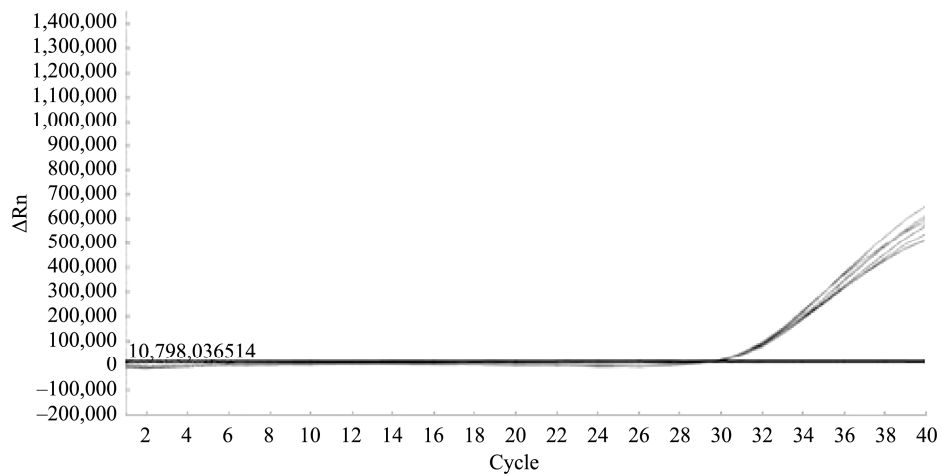


图 8 *COI* 3 引物探针实时荧光 PCR 的重复性实验

Fig.8 Repetitive experiment of *COI* 3 primer and probe

表 3 各地区东北林蛙 *COI* 基因片段 Blast 比对结果

Table 3 Blast comparison of *COI* gene fragments of *Rana dybowskii* in different regions

样品编号	采样地点	基因序列/bp	形态学鉴定样品名称	基因比对结果 Blast N 实际比对结果 ID E-value
1	集安	241	东北林蛙	东北林蛙分离得到 HSSA0082 细胞色素氧化酶亚基I(cytochrome oxidase subunit, <i>COX</i> 1)基因, 部分 cds; 线粒体 MH481231.1 5e-119, 99.95% 东北林蛙分离得到 HSSA0082 <i>COX</i> 1 基因, 部分 cds; 线粒体 MH481231.1 5e-119, 99.95%
2	安图	238	东北林蛙	东北林蛙分离得到 HSSA0082 <i>COX</i> 1 基因, 部分 cds; 线粒体 MH481231.1 5e-114, 97.9% 东北林蛙分离得到 HSSA0082 <i>COX</i> 1 基因, 部分 cds; 线粒体 MH481231.1 5e-114, 97.9%

表 3(续)

样品编号	采样地点	基因序列/bp	形态学鉴定样品名称	基因比对结果 Blast N 实际比对结果 ID E-value
3	琿春	238	东北林蛙	东北林蛙分离得到 HSSA0079 COX 1 基因, 部分 cds; 线粒体 MH481253.1e-119100% 东北林蛙分离得到 HSSA0079 COX 1 基因, 部分 cds; 线粒体 MH481253.1 1e-119, 100%
4	白山	219	东北林蛙	东北林蛙分离得到 HSSA0029 COX 1 基因, 部分 cds; 线粒体 MH481251.14e-109100% 东北林蛙分离得到 HSSA0029 COX 1 基因, 部分 cds; 线粒体 MH481251.1 4e-109, 100%
5	图们	241	东北林蛙	东北林蛙分离得到 HSSA0082 COX 1 基因, 部分 cds; 线粒体 MH481231.1 3e-121, 100% 东北林蛙分离得到 HSSA0082 COX 1 基因, 部分 cds; 线粒体 MH481231.1 3e-121, 100%
6	汪清	238	东北林蛙	东北林蛙分离得到 HSSA0029 COX1 基因, 部分 cds; 线粒体 MH481253.11e-114, 98.74% 东北林蛙分离得到 HSSA0029 COX 1 基因, 部分 cds; 线粒体 MH481253.1 1e-114, 98.74%
7	丹东	235	东北林蛙	东北林蛙分离得到 HSSA0092 COX 1 基因, 部分 cds; 线粒体 MH481241.18e-117, 99.57% 东北林蛙分离得到 HSSA0092 COX 1 基因, 部分 cds; 线粒体 MH481241.1 8e-117, 99.57%
8	伊春	239	东北林蛙	东北林蛙分离得到 HSSA0093 COX 1 基因, 部分 cds; 线粒体 MH481234.16e-118, 99.58% 东北林蛙分离得到 HSSA0093 COX 1 基因, 部分 cds; 线粒体 MH481234.1 6e-118, 99.58%
9	蛟河	232	东北林蛙	东北林蛙分离得到 HSSA0082 COX 1 基因, 部分 cds; 线粒体 MH481231.1 3e-116, 100% 东北林蛙分离得到 HSSA0082 COX 1 基因, 部分 cds; 线粒体 MH481231.1 3e-116, 100%
10	靖宇	243	东北林蛙	东北林蛙分离得到 HSSA0082 COX 1 基因, 部分 cds; 线粒体 MH481231.1 2e-122, 100% 东北林蛙分离得到 HSSA0082 COX 1 基因, 部分 cds; 线粒体 MH481231.1 2e-122, 100%
11	抚松	242	东北林蛙	东北林蛙分离得到 HSSA0082 COX 1 基因, 部分 cds; 线粒体 MH481231.1 8e-122, 100% 东北林蛙分离得到 HSSA0082 COX 1 基因, 部分 cds; 线粒体 MH481231.1 8e-122, 100%
12	桦甸	236	东北林蛙	东北林蛙分离得到 HSSA0082 COX 1 基因, 部分 cds; 线粒体 MH481231.13e-116, 99.58% 东北林蛙分离得到 HSSA0082 COX 1 基因, 部分 cds; 线粒体 MH481231.1 3e-116, 99.58%
13	临江	238	东北林蛙	东北林蛙分离得到 HSSA0029 COX 1 基因, 部分 cds; 线粒体 MH481251.11e-114, 98.74% 东北林蛙分离得到 HSSA0029 COX 1 基因, 部分 cds; 线粒体 MH481251.1 1e-114, 98.74%

表 3(续)

样品编号	采样地点	基因序列/bp	形态学鉴定样品名称	基因比对结果 Blast N 实际比对结果 ID E-value
14	恒仁	234	东北林蛙	东北林蛙分离得到 HSSA0082 <i>COX</i> 1 基因, 部分 cds; 线粒体 MH481231.11e-114, 99.57% 东北林蛙分离得到 HSSA0082 <i>COX</i> 1 基因, 部分 cds; 线粒体 MH481231.1 1e-114, 99.57%
15	通化	231	东北林蛙	东北林蛙分离得到 HSSA0082 <i>COX</i> 1 基因, 部分 cds; 线粒体 MH481231.1e-115100% 东北林蛙分离得到 HSSA0082 <i>COX</i> 1 基因, 部分 cds; 线粒体 MH481231.1 1e-115, 100%
16	吉林	233	东北林蛙	东北林蛙分离得到 HSSA0082 <i>COX</i> 1 基因, 部分 cds; 线粒体 MH481231.11e-114, 99.57% 东北林蛙分离得到 HSSA0082 <i>COX</i> 1 基因, 部分 cds; 线粒体 MH481231.1 1e-114, 99.57%

### 3 结 论

东北地区林蛙养殖业的发展, 导致其种群分布受到人为干扰, 故本研究未采用 GB/T 19507—2008《地理标志产品 吉林长白山中国林蛙油》<sup>[16]</sup>的地理分布范围, 而是采用 2005 版《中国药典》<sup>[17]</sup>初步认定的吉林省地区分布范围。由于其珍贵性, 导致野生种群锐减, 为对其进行保护, 世界自然保护联盟将其列入《中国濒危动物红皮书(两栖类和爬行类)》<sup>[18]</sup>为易危物种。本研究表明利用线粒体 DNA 特异片段对其进行鉴定具有可行性。本项目旨在明确东北林蛙的品种, 为更好地促进林蛙保护和发育、为鉴定东北林蛙活体及其产品的有效检测提供参考, 为地方特色产业野生生物种资源提供保护, 促进生态文明建设, 也为海关打击走私和保护濒危物种提供检测依据。

#### 参考文献

- [1] 谢锋, 叶昌媛, 费梁, 等. 中国东北地区林蛙属物种的分类学研究(两栖纲: 蛙科) [J]. 动物分类学报, 1999, 24(2): 224–231.  
XIE F, YE CY, FEI L, *et al.* Taxonomical studies on brown frogs (*Rana*) from Northeastern China [J]. J Zool Syst Evol Res, 1999, 24(2): 224–231.
- [2] 谢锋, 叶昌媛, 费梁, 等. 中国西北地区中国林蛙各居群的分类学研究(两栖纲: 蛙科) [J]. 动物分类学报, 2000, 25(2): 228–235.  
XIE F, YE CY, FEI L, *et al.* Taxonomical studies on the populations of *Rana dybowskii* in North-Western China [J]. J Zool Syst Evol Res, 2000, 25(2): 228–235.
- [3] 费梁, 胡淑琴, 叶昌媛, 等. 中国动物志两栖纲: 无尾目, 蛙科 [M]. 北京: 科学出版社, 2009.  
FEI L, HU S, YE CY, *et al.* Fauna sinica, amphibia v OL. 3, Anura ranidae [M]. Beijing: Science Press, 2009.
- [4] DUBOIS A. Notes sur la classification des Ranidae (*Amphibiens anoures*) [J]. B Mens Soc Linn Lyon, 1992, 61(10): 305–352.
- [5] TANAKA T, MATSUI M, TAKENAKA O. Phylogenetic relationships of brown frogs from Taiwan and Japan assessed by mitochondrial cytochrome b gene sequences (Rana: Ranidae) [J]. Biochem Syst Ecol, 1996, 24(4): 299–307.
- [6] TANAKA-UENO T, MATSUI M, SATO T, *et al.* Phylogenetic relationships of brown frogs with 24 chromosomes from Far East Russia and Hokkaido assessed by mitochondrial cytochrome b gene sequences (Rana: Ranidae) [J]. Biochem Syst Ecol, 1998, 15(2): 289–294.
- [7] TANAKA T, MATSUI M, TAKENAKA O. Phylogenetic relationships of brown frogs from Taiwan and Japan assessed by mitochondrial cytochrome b gene sequences (Rana: Ranidae) [J]. Biochem Syst Ecol, 1996, 24(4): 299–307.
- [8] TANAKA T, MATSUI M, TAKENAKA O. Estimation of phylogenetic relationships among Japanese brown frogs from mitochondrial cytochrome b gene (Amphibia: Anura) [J]. Zoological Ence, 1994, 11(5): 753.
- [9] 董瑶, 钱元梅, 宋曼, 等. 利用线粒体 DNA 上的 *cytB* 鉴定林蛙及林蛙油 [J]. 吉林化工学院学报, 2019, 36(1): 52–57.  
DONG Y, QIAN YM, SONG M, *et al.* Identification of ranae and oviductus ranae by application of *cytB* in mitochondrial DNA [J]. J Jilin Instit Chem Technol, 2019, 36(1): 52–57.
- [10] 王孟虎, 康廷国, 许亮, 等. 基于 *COI* 序列的哈蟆油基原动物 DNA 条形码鉴定研究 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(8): 1572–1577.  
WANG MH, KANG TG, XU L, *et al.* Identification of ranae oviductus original animal based on *COI* sequences [J]. Chin Metharia Med, 2017, 42(8): 1572–1577.
- [11] CHEN SL, PANG XH, SONG JY, *et al.* A renaissance in herbal medicine identification: From morphology to DNA [J]. Biotechnol Adv, 2014, 32(7): 1237–1244.
- [12] 杨学干, 王义权, 周开亚, 等. 中药材哈蟆油 PCR 鉴定的初步研究 [J]. 应用与环境生物学报, 2000, 6(2): 166–170.  
YANG XG, WANG YQ, ZHOU KY, *et al.* Study on PCR identification of the Chinese crude drug oviductus ranae [J]. Chin J Appl Environ Biol, 2000, 6(2): 166–170.
- [13] 裴林国, 席焕久, 刘海东. 线粒体 DNA 多态性在人类学研究中的应用



[J]. 中国组织工程研究, 2010, 14(7): 1291-1294.  
 PEI LG, XI HJ, LIU HD. Application of mitochondrial DNA polymorphism in the anthropology [J]. J Clin Rehabil Tissue Eng Res, 2010, 14(7): 1291-1294.

[14] 吉林省野生动物保护协会. 吉林省野生动物图鉴 两栖类 爬行类 哺乳类[M]. 长春: 吉林科学技术出版社, 1988.  
 Jilin wildlife protection association. Jilin wildlife atlas, amphibians, reptiles and mammals [M]. Changchun: Jilin Science and Technology Press, 1988.

[15] GB/T 25884—2010 蛙类形态性状测定[S].  
 GB/T 25884—2010 Measurement of characters for batrachia [S].

[16] GB/T 19507—2008 地理标志产品吉林长白山中国林蛙油[S].  
 GB/T 19507—2008 Product of geographicat Jilin Changbaishan forest indication—frog's oviduct [S].

[17] 汪松, 赵尔宓. 中国濒危动物红皮书: 两栖类和爬行类[M]. 北京: 科学出版社, 1998.  
 WANG S, ZHAO EM. Red book of endangered animals in China: Amphibians and reptiles [M]. Beijing: Science Press, 1998.

[18] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 化学工业出版社,

2005.  
 State Pharmacopoeia Committee. Pharmacopoeia of the people's Republic of China [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005.

(责任编辑: 王 欣)

### 作者简介



聂丹丹, 高级工程师, 主要研究方向为食品真伪鉴定。  
 E-mail: niedandan1982@sina.com



胡婷婷, 高级工程师, 主要研究方向为食品检验。  
 E-mail: 178068609@qq.com



## “动物性食品加工与质量安全”专题征稿函

当前我国经济飞速发展, 人们对动物性食品的要求也不再仅仅是数量上的追求, 正在向质量要求进行转变, 然而目前国内动物性食品在各个方面仍需要进行完善。因此, 如何解决这些问题, 使动物性食品安全真正得到保障, 已显得尤为重要。

鉴于此, 本刊特别策划了“动物性食品加工与质量安全”专题, 由东北农业大学食品学院许晓曦教授担任专题主编。专题将围绕现代化加工与副产物综合利用技术、质量安全和检测技术、营养及风味成分分析技术、污染防控与危害分析、法律法规和发展政策几方面, 或您认为本领域有意义的问题综述及研究论文均可, 专题计划在 2021 年 5 月出版。

本刊主编国家食品安全风险评估中心吴永宁研究员与本专题主编许晓曦教授特邀请有关食品领域研究人员为本专题撰写稿件, 综述、研究论文和研究简报均可。请在 2021 年 4 月 1 日前通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并经审稿合格后优先发表。

同时烦请您帮忙在同事之间转发一下, 希望您能够推荐该领域的相关专家并提供电话和 E-mail。再次感谢您的关怀与支持!

投稿方式(注明专题**动物性食品加工与质量安全**):

网站: [www.chinafoodj.com](http://www.chinafoodj.com)(备注: 投稿请登录食品安全质量检测学报主页-作者

登录-注册投稿-投稿栏目选择“2020 专题: **动物性食品加工与质量安全**”)

邮箱投稿: E-mail: [jfoodsqa@126.com](mailto:jfoodsqa@126.com)(备注: **动物性食品加工与质量安全**专题投稿)

《食品安全质量检测学报》编辑部