

鹿茸物种来源 DNA 条形码鉴定技术研究

王佳雯^{1,2}, 邢冉冉², 葛毅强^{1,3}, 张九凯², 邓婷婷², 钟震宇⁴, 陈颖^{2*}

(1. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083; 2. 中国检验检疫科学研究院, 北京 100176;
3. 中国农村技术开发中心, 北京 100045; 4. 北京麋鹿生态实验中心, 北京 100076)

摘 要: **目的** 评估不同 DNA 条形码技术在梅花鹿鹿茸和马鹿鹿茸中的鉴定能力。**方法** 以线粒体细胞色素氧化酶 I 基因(cytochrome oxidase I gene, *COI*)和线粒体细胞色素 b 基因(cytochrome b gene, *Cytb*)为靶基因对鹿茸样品进行鉴定, 并对两种基因的鉴别能力进行比较。**结果** *Cytb* 对梅花鹿和马鹿的鉴别效率高于 *COI*, 且可以将所有鹿茸鉴定至种水平。将 *Cytb* 作为目标片段, 建立了鹿茸中物种来源鉴定的 DNA 条形码方法。利用该方法对市场上销售的 53 份鹿茸样品进行标签符合性鉴定。发现仅有 21 份样品与标签标识物种相符; 25 份样品存在将低价鹿茸标为高价鹿茸的现象; 7 份样品缺少明确的物种信息。**结论** 本研究建立了基于 *Cytb* 片段的鹿茸物种来源 DNA 条形码鉴定技术, 可以有效鉴定出市售鹿茸样品的物种来源, 并发现鹿茸市场存在虚假标签标识现象。本研究结果可以为监管部门规范鹿茸产品标签标识提供技术支撑。

关键词: 鹿茸; DNA 条形码; 线粒体细胞色素 b 基因; 物种鉴定

Research on DNA barcoding authentication for species origin of deer antler

WANG Jia-Wen^{1,2}, XING Ran-Ran², GE Yi-Qiang^{1,3}, ZHANG Jiu-Kai²,
DENG Ting-Ting², ZHONG Zhen-Yu⁴, CHEN Ying^{2*}

(1. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China;
2. Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100176, China; 3. China Rural Technology Development Center, Beijing 100045, China; 4. Beijing Elk Ecological Experiment Center, Beijing 100076, China)

ABSTRACT: Objective To assess the capabilities of DNA barcoding technology in identifying different *Cervus nippon* antler and *Cervus elaphus* antler. **Methods** Mitochondrial cytochrome oxidase I gene (*COI*) and mitochondrial cytochrome b gene (*Cytb*) were used as target genes to identify antler samples, and the discriminatory ability of the two genes was compared. **Results** *Cytb* was more efficient than *COI* for discriminating between *Cervus nippon* and *Cervus elaphus*, and could identify all antlers to the species level. Thus, *Cytb* was used as the target fragment to establish a DNA barcoding method for species origin identification in deer antlers. Fifty-three antler samples sold in the market were identified for label conformity using this method. Only 21 samples were consistent with the labeled species; 25 samples were found with the substitution of high valued species by low-value species; 7 samples lacked specific information on the species. **Conclusion** This study has established a DNA barcoding technology based on *Cytb* to identify the species origin of deer antlers, which can effectively identify the species of commercial deer antlers and find mislabeling in the antler market. The results of this study can provide

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFC1603504)

Fund: Supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFC1603504)

*通信作者: 陈颖, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品质量安全。E-mail: chenyingcai@163.com

*Corresponding author: CHEN Ying, Ph.D, Professor, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, No.11, Rong Hua South Road, Beijing Economic-Technological Development Area, Beijing 100176, China. E-mail: chenyingcai@163.com

technical support for the regulatory authorities to regulate the labeling of antler products.

KEY WORDS: deer antler; DNA barcoding; cytochrome b gene; species identification

0 引 言

鹿茸为鹿科动物梅花鹿(*Cervus nippon*)或马鹿(*Cervus elaphus*)的雄鹿未骨化而密生茸毛的幼角^[1], 为我国传统的名贵中药材和食材。近年来, 通过对鹿茸药理活性成分及作用的研究发现, 鹿茸对一些生理功能具有调节作用, 保健功效显著^[2-5]。随着鹿茸及鹿茸食品、保健品等深加工产品的需求量快速增长, 国际和国内市场上的鹿茸及其加工制品存在用鹿茸混伪品以假乱真、以次充好等不同程度的掺假情况^[6]。因此, 迫切需要建立一系列的鹿茸真伪鉴别方法, 用以规范市售鹿茸的商品标签符合情况, 合理制定不同物种来源鹿茸的质量标准。

传统的鹿茸物种鉴定主要依赖形态学鉴定方法^[7], 但形态学鉴定对鹿茸完整度要求较高, 且对鉴定人员的专业能力要求较高, 不适宜加工产品的鉴定。由于生物活性物质容易受到季节、产地和环境等因素的影响, 理化鉴定方法在鹿茸产品的鉴定方面存在一定的局限性。而基于核酸的分子生物学检测技术对物种的判别基质是遗传物质, 可以克服形态学破坏和环境因素的影响。常用于鹿种鉴定的分子生物学检测技术包括限制片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)^[8]、DNA 单链构象多态性(single strand conformation polymorphism, SSCP)^[9]和 DNA 条形码^[10]等技术。其中, RFLP、SSCP 等技术主要针对已知物种的检测, 受遗传中位点变化的影响, 易导致错判。DNA 条形码的技术核心是利用公认的通用引物扩增某基因区段, 测序后通过数据库比对获得物种信息, 可用于未知样品的物种鉴定^[11-12]。相比于核基因, 线粒体 DNA 具有更大的基因拷贝数, 所以在加工过程中更容易保存, 经常作为遗传进化的分子标记^[13]。

基于线粒体 DNA 的线粒体细胞色素氧化酶 I 基因(cytochrome oxidase subunit I, COI)或线粒体细胞色素 b 基因(cytochrome b gene, Cytb)常被用于鹿种来源鉴定^[14-17]。在本研究中, 选用 COI 片段和 Cytb 片段进行鹿茸鹿种的鉴别, 并比较了两个靶基因的物种鉴别能力, 针对目前国内市场上鹿茸标签标识不明的现状, 利用 DNA 条形码技术对市售鹿茸制品进行鉴定, 并初步调研了市售鹿茸商品的标签符合度, 以期在市售鹿茸产品的市场监管提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

鹿茸样品: 共收集到 25 份鹿茸样品, 其中梅花鹿(*Cervus nippon*)鹿茸样品和马鹿(*Cervus elaphus*)鹿茸样品各

10 份, 驯鹿(*Rangifer tarandus*)鹿茸 4 份, 麋鹿(*Elaphurus davidianus*)鹿茸 1 份。梅花鹿鹿茸样品中, 鹿茸粉样品 9 份, 经长春中医药大学药学院鉴定, 梅花鹿整枝鹿茸样品 1 份, 由中国农业科学院特产研究鹿茸实验基地提供。10 份马鹿鹿茸样品为块状样品, 4 份驯鹿鹿茸样品为片状样品, 由北京麋鹿苑提供。1 份麋鹿鹿茸为块状样品, 由吉林农业大学提供。

此外, 从药店、中药材公司和电子商务平台共收集 53 份市售鹿茸样品, 样品形态包括 42 份鹿茸粉、9 份鹿茸片、1 份鹿茸块、1 份整枝的鹿茸。

无水乙醇(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 2×Taq PCR StarMix(北京莱贝斯生物科技有限公司); DL2000 DNA Marker[宝生物技术(大连)有限公司]; 6×buffer 上样缓冲液(北京康润诚业生物科技有限公司); Nucleospin®Food DNA 提取试剂盒(德国 MN 公司); 1%的琼脂糖(北京擎科新业生物有限公司)。

将 PCR 扩增所需的引物送去生工生物工程(上海)股份有限公司进行合成。

1.2 仪器与设备

TissueLyser 2 组织研磨器(德国凯杰公司); 165-5050 电泳仪(美国伯乐公司); VersaDoc™4000MP 凝胶成像系统(美国伯乐公司); BT323S 电子天平(感量 0.01 g, 德国赛多利斯科学仪器有限公司); PICO17 离心机、NanoDrop One C 超微量紫外光度计(美国赛默飞科技公司); Researchplus 微量移液器(德国艾本德公司); Veriti 96-well Thermal Cycler 梯度 PCR 仪(美国应用生物系统公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 样品前处理

对于整枝鹿茸, 用 75%的乙醇冲洗 3 次, 洗毕后切成片状, 放入烘箱烘干, 随后将烘干后的鹿茸再切成 1 cm×1 cm 的块状; 若为片状的干鹿茸, 则直接切成 1 cm×1 cm 的块状。将处理好的块状鹿茸样品放入组织研磨器中, 在频率 30 Hz 下研磨 60 s, 转移至离心管中, 置于 4 °C 下保存。

1.3.2 DNA 提取及质量和浓度鉴定

称取 100 mg 经充分研磨成粉状的鹿茸样品, 按 NucleoSpin®Food DNA 提取试剂盒说明书进行 DNA 提取实验操作。所得的鹿茸样品 DNA, 利用 Nano Drop ONE 超微量分光光度计分别测定所提试样 DNA 的浓度和其在 230、260 和 280 nm 处的吸收值^[18], 并通过 A_{260}/A_{280} 的比值判断 DNA 纯度, 若提得 DNA 的 $A_{260}/A_{280} < 1.7$ 或 $A_{260}/A_{280} > 2.0$, 则判断 DNA 中有蛋白质、酚污染或 RNA 污染。

1.3.3 PCR 扩增及测序

将样品 DNA 原液稀释至 10 ng/μL, 作为后续 PCR 扩

增的模板。分别选择扩增长度为 750 bp 的 *COI* 基因片段和长度为 226 bp 的 *Cytb* 基因片段设计的通用引物进行 PCR 扩增(表 1), 并对 *Cytb* 引物扩增体系的退火温度、循环数、DNA 模板量和引物添加量进行优化。。

PCR 反应体系总体积为 25 μ L, 包括: *COI* 片段的引物按表 1 中 1:3 的比例分别加入 0.5 和 1.5 μ L(引物浓度 10 μ mol/L); *Cytb* 片段的扩增中, 添加浓度为 10 μ mol/L 的上、下游引物 0.2 μ L, DNA 添加量为 50 ng, 2 $\times$ PCR Master 预混液 12.5 μ L, 加无菌去离子水补足体积到 25 μ L。*COI* 引物的扩增程序为: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 50 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 5 个循环; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环; *Cytb* 引物的扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 64 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 28 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min; 4 $^{\circ}$ C 保存。

DNA 扩增反应在 PCR 仪中进行。产物用 2%的琼脂糖凝胶电泳, 随后用凝胶成像仪对扩增产物进行分析, 根据所使用的 DNA 分子标记观察扩增的目标带的长度, 并评估扩增产物的质量和数量。将扩增后质量合格的产物送到生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

1.3.4 测序数据分析

对双向测序得到的样品结果用 DNASTAR 中的 SeqMan 程序进行序列拼接和人工校正, 然后除去拼接后的序列两端的低质量区^[21], 并将拼接后的序列去除上游引物和下游引物区域。分别将处理后的 *COI* 序列用 BOLD 数据库和 GenBank 数据库比对, 确定鹿茸物种来源; 在 GenBank 数据库中比对 *Cytb* 基因序列, 并通过相似性、覆盖度和综合评价等来判断鹿茸样品的鹿种信息。在 GenBank 数据库中下载了一些梅花鹿、马鹿、驯鹿、麋鹿和水鹿 *COI* 和 *Cytb* 的参考序列。将下载的基因序列与样品序列用 MEGA6.0 软件进行多序列比对分析,

并基于邻接法(Neighbor-Joining, N-J)构建 *COI* 和 *Cytb* 系统发育树, 然后将自展系数设置为 1000, 用 Bootstrap 检验法比较 DNA 条形码的比对结果^[22]。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增结果分析

利用 Nano Drop ONE 超微量分光光度计测得的所有 25 个鹿茸样品的 DNA 质量浓度均大于 10 ng/ μ L, A_{260}/A_{280} 的比值均在 1.8~2.0 之间, A_{260}/A_{230} 的比值均在 2.0~2.4 之间, 表明 DNA 的纯度和质量都较好, 可满足后续 PCR 扩增的要求。

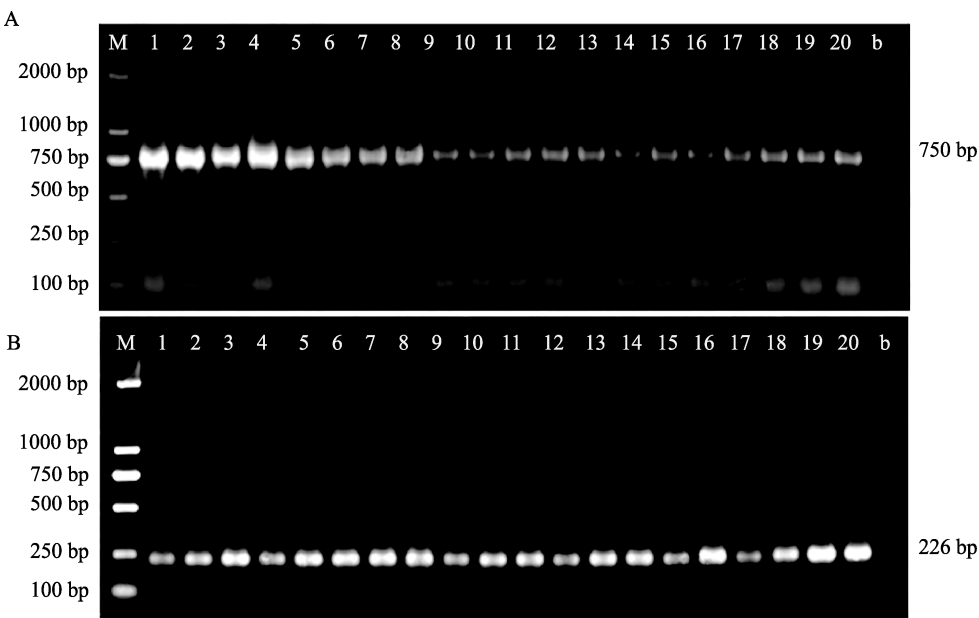
将 DNA 浓度稀释为 10 ng/ μ L 后作为模板对 25 份鹿茸样品 DNA 分别进行 *COI* 片段和 *Cytb* 片段的 PCR 扩增, 结果表明, 25 个被测的鹿茸样品 DNA 对 *COI* 目的片段的扩增长度在 750 bp 左右, 用 *Cytb* 目的片段的扩增长度在 226 bp 左右, 均能得到清晰明亮的目标条带(图 1~2), 说明这 25 份鹿茸样品可用于后续的基因测序分析。

2.2 *COI* 与 *Cytb* 对鹿茸的物种鉴别能力分析

长度约为 650 bp 的 *COI* 片段是公认的动物物种鉴定 DNA 条形码^[23-24], 其参考序列数据库包括 BOLD 数据库(www.barcodinglife.org)^[25]和 NCBI 的 GenBank 数据库(https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)^[26], 结合这两种数据库的比对结果更能确定 *COI* 基因识别结果的正确性^[27]。本研究将对 25 份鹿茸样品中扩增获得的 *COI* 序列, 与 BOLD 和 GenBank 数据库中的参考序列进行了比对, 发现 *COI* 序列的相似度均为 100%(表 2)。研究表明, 同一物种间 *COI* 分离的遗传距离小于 1.5%^[28], 所以将鹿茸扩增产物的 *COI* 序列进行比对时, 若比对相似度 $\geq$ 98.5%时可判定为同一物种。在 25 份鹿茸样品中, 编号 1~10 的 10 份梅花

表 1 PCR 扩增引物
Table 1 PCR amplification primers

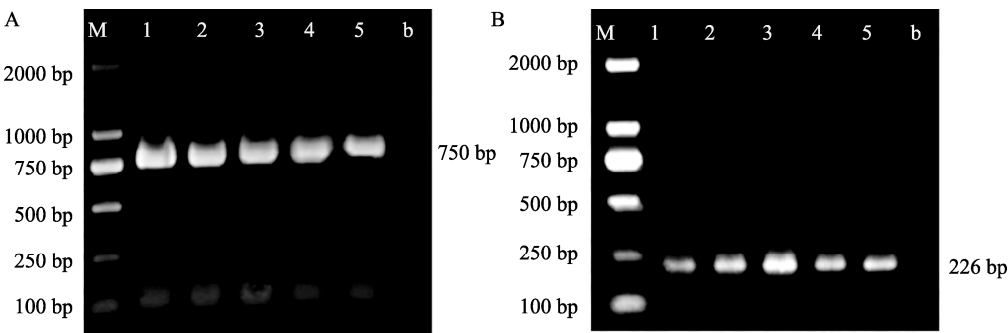
扩增区域	引物名称	引物序列 5'-3'	比例	参考文献
COI	VFl-t1	TGTAACACGACGGCCAGTTCTCAACCAACCACAAAGACATTGG	1	[19]
	VFld-t1	TGTAACACGACGGCCAGTTCTCAACCAACCACAARGAYATYGG	1	
	VFli-t1	TGTAACACGACGGCCAGTTCTCAACCAACCAIAAIGAIATIGG	3	
	LepFl-t1	TGTAACACGACGGCCAGTATTCAACCAATCATAAAGATATTGG	1	
	VRl-t1	CAGGAAACAGCTATGACTAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA	1	
	VRld-t1	CAGGAAACAGCTATGACTAGACTTCTGGGTGGCCRAARAAYCA	1	
	VRli-t1	CAGGAAACAGCTATGACTAGACTTCTGGGTGICCAIAAIAICA	3	
Cytb	LepRl-t1	CAGGAAACAGCTATGACTAAACTTCTGGATGTCCAAAAAATCA	1	[20]
	Cervus-F	TCATCGCAGCACTCGCTATAGTACACT	1	
	Cervus-R	ATCTCCAAGCAGGTCTGGTGCGAATAA	1	



注: A: *COI* 基因; B: *Cytb* 基因; M: DL 2000 分子量标准; 1~10: 梅花鹿鹿茸样品; 11~20: 马鹿鹿茸样品; b: 空白对照。

图 1 梅花鹿鹿茸和马鹿鹿茸样品 *COI* 和 *Cytb* 基因片段的 PCR 扩增结果

Fig.1 Electrophoresis results of PCR products of *Cervus nippon* antler and *Cervus elaphus* antler samples using *COI* and *Cytb* barcodes



注: A: *COI* 基因; B: *Cytb* 基因; M: DL 2000 分子量标准; 1~4: 驯鹿鹿茸样品; 5: 麋鹿鹿茸样品; b: 空白对照。

图 2 驯鹿鹿茸和麋鹿鹿茸样品 *COI* 和 *Cytb* 基因片段的 PCR 扩增结果

Fig.2 Electrophoresis results of PCR products of *Rangifer tarandus* antler and *Elaphurus davidianus* antler samples using *COI* and *Cytb* barcodes

鹿鹿茸、编号 21~24 的 4 份驯鹿鹿茸和编号为 25 的 1 份麋鹿鹿茸鉴定结果与收集到的样品鹿种信息一致,而在编号 11~20 的 10 份马鹿鹿茸的鉴定中,只有 2 份(编号 12、17)马鹿鹿茸的鉴定结果与收集到的马鹿鹿茸样品信息一致,其余的 8 份马鹿鹿茸样品由于其所扩增的 *COI* 基因序列在 GenBank 数据库和 BOLD 数据库中与梅花鹿和马鹿的序列相似度都为 100%,无法区分梅花鹿鹿茸和马鹿鹿茸(表 2)。导致这种情况出现的原因包括: (1)GenBank 数据库对于上传的序列信息缺少专家审核环节,因此同一物种序列存在被标注不同名称的可能性^[29]; (2)上传到数据库中的序列本身出现了错误^[30]; (3)梅花鹿是马鹿的后期分支,在所有

鹿科动物中,梅花鹿和马鹿的亲缘关系最近^[31],而 BOLD 数据库和 GenBank 数据库无法区分关系密切的物种^[32]。相比于 *COI* 序列, *Cytb* 序列的种间变异程度更大,可以更好地实现种间鉴别^[33-34]。基于 *Cytb* 序列比对的相似度结果表明,25 份鹿茸样品的序列相似度均大于 97.5%。研究表明, *Cytb* 的同一物种分离的遗传距离小于 2.5%^[28]。所以在对鹿茸样品的测序结果进行序列比对时,当 *Cytb* 的比对相似度 $\geq 97.5\%$ 时可判定为同一物种。利用 *Cytb* 序列对 25 份鹿茸样品的鹿种来源鉴定结果与收集到的 10 份梅花鹿鹿茸样品、10 份马鹿鹿茸样品、4 份驯鹿鹿茸样品和 1 份麋鹿鹿茸样品物种信息一致(表 2)。

表 2 基于 DNA 条形码技术的鹿茸样品物种鉴定结果
Table 2 Species identification results of deer antler samples based on DNA barcoding technology

样品 编号	物种名称	DNA 条形码鉴定结果					
		COI			Cytb		
		BOLD 数据库	序列 相似度/%	GenBank 数据库	序列 相似度/%	GenBank 数据库	序列 相似度/%
1~10	梅花鹿鹿茸	<i>Cervus nippon</i>	100	<i>Cervus nippon hortulorum</i>	100	<i>Cervus nippon hortulorum</i>	100
11	马鹿鹿茸	<i>C. nippon</i> <i>C. elaphus yarkandensis</i>	100	<i>C. nippon</i> <i>C. elaphus yarkandensis</i>	100	<i>C. elaphus bactrianus</i>	99.29
12	马鹿鹿茸	<i>C. elaphus</i>	100	<i>C. elaphus yarkandensis</i>	100	<i>C. elaphus yarkandensis</i>	100
13	马鹿鹿茸	<i>C. nippon</i> <i>C. elaphus yarkandensis</i>	100	<i>C. nippon</i> <i>C. elaphus yarkandensis</i>	100	<i>C. elaphus yarkandensis</i>	97.87
14	马鹿鹿茸	<i>C. nippon</i> <i>C. elaphus yarkandensis</i>	100	<i>C. nippon</i> <i>C. elaphus yarkandensis</i>	100	<i>C. elaphus bactrianus</i>	97.87
15	马鹿鹿茸	<i>C. nippon</i> <i>C. elaphus yarkandensis</i>	100	<i>C. nippon</i> <i>C. elaphus yarkandensis</i>	100	<i>C. elaphus bactrianus</i>	99.29
16	马鹿鹿茸	<i>C. nippon</i> <i>C. elaphus yarkandensis</i>	100	<i>C. nippon</i> <i>C. elaphus yarkandensis</i>	100	<i>C. elaphus bactrianus</i>	97.86
17	马鹿鹿茸	<i>C. elaphus</i>	100	<i>C. elaphus yarkandensis</i>	100	<i>C. elaphus yarkandensis</i>	100
18	马鹿鹿茸	<i>C. nippon</i> <i>C. elaphus yarkandensis</i>	100	<i>C. nippon</i> <i>C. elaphus yarkandensis</i>	100	<i>C. elaphus bactrianus</i>	97.87
19	马鹿鹿茸	<i>C. nippon</i> <i>C. elaphus yarkandensis</i>	100	<i>C. nippon</i> <i>C. elaphus yarkandensis</i>	100	<i>C. elaphus bactrianus</i>	99.29
20	马鹿鹿茸	<i>C. nippon</i> <i>C. elaphus yarkandensis</i>	100	<i>C. nippon</i> <i>C. elaphus yarkandensis</i>	100	<i>C. elaphus bactrianus</i>	99.29
21~24	驯鹿鹿茸	<i>Rangifer tarandus</i>	100	<i>Rangifer tarandus</i>	100	<i>Rangifer tarandus</i>	100
25	麋鹿鹿茸	<i>Elaphurus davidianus</i>	100	<i>Elaphurus davidianus</i>	100	<i>Elaphurus davidianus</i>	99.34

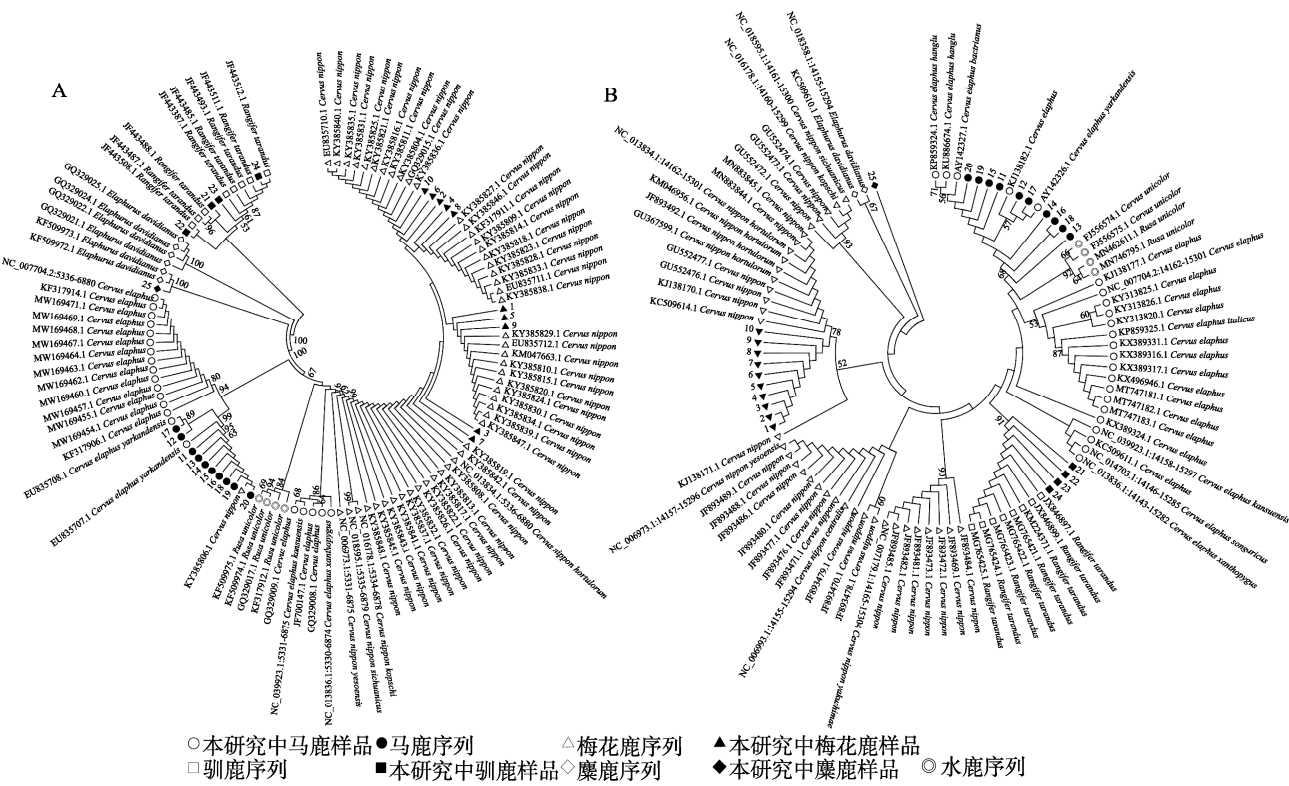
2.3 系统发育树分析

从 GenBank 数据库下载了马鹿、梅花鹿、驯鹿、麋鹿和水鹿的 COI 序列和 Cytb 序列，分别与本研究中扩增得到的 25 条 COI 和 25 条 Cytb 序列进行了比对分析，通过构建 N-J 树以评价 DNA 条形码技术对鹿茸鹿种的鉴别能力，其中隐去自展值低于 50% 的值(图 3)。基于 COI 基因的系统发育树显示所收集的梅花鹿鹿茸样品与梅花鹿鹿种聚成了一支，马鹿鹿茸样品与马鹿鹿种聚成了一支，驯鹿鹿茸样品与驯鹿鹿种聚成一支，麋鹿鹿茸样品与麋鹿鹿种聚成了一支，水鹿鹿种自成一支。但是在马鹿聚成的一支中出现了个序列号为 KY385806.1 的梅花鹿鹿种(图 3A)。基于 Cytb 基因的系统发育树显示所收集的梅花鹿鹿茸样品与梅花鹿鹿种聚成了一支，马鹿鹿茸样品与马鹿鹿种聚成了一支，驯鹿鹿茸样品与驯鹿鹿种聚成一支，麋鹿鹿茸样品与麋鹿鹿种聚成了一支，水鹿鹿种自成一支(图 3B)。基于种内和种间遗传差异的系统发育树结果表明，所收集的鹿茸样品的鹿种聚类结果与所收集到的鹿种信息一致。

基于 COI 对所收集的编号为 11~20 的 10 份马鹿鹿茸的序列比对结果发现，除了 2 份(编号 12、17)马鹿鹿茸的鉴定结果与收集到的马鹿鹿茸样品信息一致外，其余的 8 份马鹿鹿茸样品由于其所扩增的 COI 基因序列在 BOLD 数据库和 GenBank 数据库中与梅花鹿和马鹿的序列相似度都为 100%，因此无法区分鹿种来源。通过 GenBank 数据库的序列号信息可知，与 8 份马鹿鹿茸样品序列匹配度为

100% 的梅花鹿序列只有一条，其序列号均为 KY385806.1。经进化树分析发现，序列号为 KY385806.1 的该条梅花鹿序列在进化树结果中与马鹿聚为了一支(图 3A)。在 BOLD 数据库中，与 8 份未鉴定出鹿种的马鹿鹿茸 COI 序列匹配度为 100% 的该条梅花鹿数据来源于 GenBank 数据库，并且在 GenBank 数据库的序列号为 KY385806。可知，在 BOLD 数据库和 GenBank 数据库中，均是该条梅花鹿序列影响了比对结果。此外，在对这 8 份马鹿鹿茸样品的序列进行比对时发现，BOLD 数据库和 GenBank 数据库中与 8 份马鹿鹿茸比对时出现的所有的比对结果中只有序列号为 KY385806 的该条序列鹿种为梅花鹿，表明该序列的物种名称可能存在错误标记。

由于 GenBank 数据库的序列信息由上传序列的作者本人提供，所传序列信息也只能由上传者修改^[35]，这使得序列的真实性由上传者控制^[36]。比对时数据库中的参考序列可能存在一定的错误^[37]。在本研究中，25 份鹿茸样品用 COI 的鉴定结果表明，由于序列号为 KY385806 的序列信息对 COI 比对结果的干扰，COI 在基因序列与 KY385806 的碱基序列相近的马鹿鹿茸样品中无法实现梅花鹿鹿种和马鹿鹿种的区分。25 份鹿茸样品用 Cytb 的鉴定结果表明 25 份鹿茸的鉴定结果均与收集到的鹿茸物种信息一致。考虑到 Cytb 对于鹿茸的物种鉴别准确度更高，并且近缘物种间的鉴定能力更强，扩增的序列长度更短，也更适合鹿茸加工制品的鉴定，所以本研究选择 Cytb 基因对市售的鹿茸进行鉴定。



注: A: COI; B: Cytb; 自展值(>50%)显示在相关分支的上方; 样品编号与表 2 中的编号一致。

图 3 基于 COI 和 Cytb 序列构建的鹿种 N-J 系统发育树

Fig.3 Neighbor-joining phylogenetic tree of deer species based on sequences of COI and Cytb

2.4 市售鹿茸样品的物种鉴定结果分析

本研究利用 Cytb 对市售鹿茸鹿种进行鉴定, 并对目前市场上销售的鹿茸商品的标签符合性情况进行了分析。本研究共收集了 53 份市售鹿茸商品, 其中, 43 份样品标签为梅花鹿鹿茸(H1~H43)、3 份样品标签为马鹿鹿茸(M1~M3), 剩余 7 份样品无标签标识(N1~N7)(表 3)。鉴定结果表明基于 Cytb 的 53 份市售鹿茸产品均可鉴别出明确的物种。

将 DNA 条形码鉴定的物种结果与标签标识物种对比

发现, 43 份标签为梅花鹿鹿茸的商品中, 25 份(58.1%)样品与 DNA 条形码鉴定结果不一致, 其中 23 份样品将马鹿(Cervus elaphus)鹿茸标记为市场经济价值更高的梅花鹿(Cervus nippon)鹿茸, 2 份(H25~H26)样品将驯鹿(Rangifer tarandus)鹿茸标为梅花鹿(Cervus nippon)鹿茸进行出售, 存在标识不符, 以次充好的现象。3 份马鹿鹿茸样品经鉴定均与标签标识物种一致。7 份鹿茸鹿种信息未标识的样品, 利用 Cytb 的 DNA 条形码技术对其鉴定, 可获得准确的鹿茸物种信息。

表 3 基于 DNA 条形码技术的市售鹿茸产品真实性鉴定结果
Table 3 Authenticity identification results of commercial antler deer products based on DNA barcoding technology

编号	标签名称	Genbank 数据库	序列相似度/%	中文鹿种名称	是否与标签相符
H1~H13	梅花鹿茸粉	Cervus nippon hortulorum	100	梅花鹿	是
H14	梅花鹿茸骨片粉	C. nippon hortulorum	100	梅花鹿	是
H15	梅花鹿整枝鹿茸	C. nippon hortulorum	100	梅花鹿	是
H16	梅花鹿鹿茸骨片	C. nippon hortulorum	100	梅花鹿	是
H17	梅花鹿茸粉	C. nippon hortulorum	100	梅花鹿	是
H18	梅花鹿鹿茸蜡片	C. nippon kopschi C. nippon sichuanicus C. nippon hortulorum	100	梅花鹿	是
H19	梅花鹿茸粉	C. elaphus hippelaphus	100	马鹿	否
H20	梅花鹿茸粉	C. elaphus xanthopygus C. elaphus alxaicus	100	马鹿	否

表 3(续)

编号	标签名称	Genbank 数据库	序列相似度/%	中文鹿种名称	是否与标签相符
H21~H22	梅花鹿茸粉	<i>C. elaphus xanthopygus</i> <i>C. canadensis songaricus</i>	100	马鹿	否
H23	梅花鹿茸红粉片	<i>C. elaphus scoticus</i> <i>C. elaphus hippelaphus</i> <i>C. elaphus atlanticus</i>	100	马鹿	否
H24	梅花鹿鹿茸粉片	<i>C. elaphus scoticus</i> <i>C. elaphus hippelaphus</i> <i>C. elaphus atlanticus</i>	100	马鹿	否
H25~H26	梅花鹿茸粉	<i>Rangifer tarandus granti</i>	100	驯鹿	否
H27	梅花鹿茸粉	<i>C. elaphus xanthopygus</i> <i>C. canadensis songaricus</i>	98.75	马鹿	否
H28	梅花鹿茸粉	<i>C. elaphus bactrianus</i>	99.29	马鹿	否
H29~H43	梅花鹿茸粉	<i>C. canadensis songaricus</i> <i>C. canadensis sibiricus</i>	100	马鹿	否
M1~M3	马鹿茸粉	<i>C. canadensis songaricus</i> <i>C. canadensis sibiricus</i>	100	马鹿	是
N1	鹿茸粉	<i>C. nippon hortulorum</i>	100	梅花鹿	/
N2	鹿茸粉片	<i>C. nippon hortulorum</i>	100	梅花鹿	/
N3~N4	鹿茸红粉片	<i>C. elaphus scoticus</i> <i>C. elaphus hippelaphus</i> <i>C. elaphus atlanticus</i>	100	马鹿	/
N5	鹿茸蜡片	<i>Cervus elaphus barbarus</i> <i>Cervus elaphus corsicanus</i>	100	马鹿	/
N6	鹿茸半蜡片	<i>C. elaphus scoticus</i> <i>C. elaphus hippelaphus</i> <i>C. elaphus atlanticus</i>	100	马鹿	/
N7	鹿茸块	<i>C. canadensis</i>	100	马鹿	/

注: /表示标签信息不明确无法判断标签符合性。

3 结 论

本研究比较了 *COI* 和 *Cytb* 对鹿茸的鹿种来源鉴别能力,发现 *COI* 存在无法区分梅花鹿和马鹿的情况,而 *Cytb* 作为靶基因的 DNA 条形码方法可以准确鉴定出鹿茸样品的鹿种来源。因此,本研究提出将 *Cytb* 作为目标片段,建立了鹿茸及其制品中物种来源鉴定的 DNA 条形码方法,并利用该方法进行市售鹿茸样品的真实性鉴定。发现所收集的鹿茸商品存在标签不符的现象,主要表现为将部分马鹿鹿茸标识为价格更高的梅花鹿鹿茸进行销售。无论是出于追求经济利益的目的,还是由于未对鹿茸物种进行区分而导致的标签标识物种与实际鹿茸物种不符,都提示监管部门需要加强对鹿茸市场的监管。本研究采用 DNA 条形码技术的鹿茸商品鹿种来源鉴定结果表明,用 *Cytb* 的 DNA 条形码方法能准确将单一鹿种的鹿茸样品识别至种水平,效率高、特异性强,可以为监管部门监控市售鹿茸产品的标识符合性提供有力鉴定工具,为加强我国对市售鹿茸的市场监管提供技术支撑,提高商品标识的规范性。

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, 2020.
Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China Part I [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2020.

[2] 林喆, 黎清俊佳, 周佳, 等. 鹿茸及其活性成分对心血管系统保护作用机制研究进展[J]. 人参研究, 2021, 33(6): 57–61.
LIN Z, LI QJY, ZHOU J, et al. Research progress on protective effects and mechanisms of velvet antler and its active ingredients on cardiovascular system [J]. Ginseng Res, 2021, 33(6): 57–61.

[3] 王响, 鞠贵春. 鹿茸多肽的研究进展[J]. 野生动物学报, 2020, 41(2): 518–522.
WANG X, JU GC. Research progress of antler peptides [J]. J Wildlife, 2020, 41(2): 518–522.

[4] SUI Z, ZHANG L, HUO Y, et al. Bioactive components of velvet antlers and their pharmacological properties [J]. J Pharm Biomed Anal, 2014, 87: 229–240.

[5] KAWTIKWAR PS, BHAGWAT DA, SAKARKAR DM. Deer antlers-traditional use and future perspectives [J]. Indian J Tradit Know, 2010, 9(2): 245–251.

[6] WEI F, LIU W, YAN H, et al. Analysis of quality and related problems of Chinese herbal medicines and decoction pieces in China [J]. Chin Pharm J, 2015, 50(4): 277–283.

[7] LI L, KANG T. Microscopical identification and hierarchical cluster analysis of seven kinds of pilose antler velvet [J]. J Chin Med Mater, 2009, 32(3): 345–347.

[8] XU Y, SHAO BY, XU N, et al. An experimental study on the identification of sika deer antler and cervus pilose antler by PCR-RFLP [J]. J Chin Pharm, 2020, (55): 2021–2028.

[9] LI M, GAO L, QU L, et al. Characteristics of PCR-SSCP and RAPD-HPCE methods for identifying authentication of *Penis et testis cervi* in traditional Chinese medicine based on cytochrome b gene [J].

- Mitoch DNA Mapp Seq Anal, 2016, 27(4): 2757–2762.
- [10] JIA J, SHI LC, XU ZC, *et al.* Identification of antler powder components based on DNA barcoding technology [J]. Acta Pharm Sin, 2015, 50(10): 1356–1361.
- [11] FERNANDES TJR, AMARAL JS, MAFRA I. DNA barcode markers applied to seafood authentication: An updated review [J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2021, 61(22): 3904–3935.
- [12] XING RR, HU RR, HAN JX, *et al.* DNA barcoding and mini-barcoding in authenticating processed animal-derived food: A case study involving the Chinese market [J]. Food Chem, 2020, 309: 125653.
- [13] NIEDZIAŁKOWSKA M, JEDRZEJEWSKA B, HONNEN AC, *et al.* Molecular biogeography of red deer *Cervus elaphus* from Eastern Europe: Insights from mitochondrial DNA sequences [J]. Acta Theriol, 2011, 56(1): 1–12.
- [14] GAO L, XIA W, AI J, *et al.* Development of multiplex PCR assay for authentication of *Cornu cervi pantotrichum* in traditional Chinese medicine based on cytochrome b and C oxidase subunit I genes [J]. Mitoch DNA Mapp Seq Anal, 2016, 27(4): 2989–2992.
- [15] KOEHLER AV, ZHANG Y, WANG T, *et al.* Multiplex PCRs for the specific identification of marsupial and deer species from faecal samples as a basis for non-invasive epidemiological studies of parasites [J]. Parasit Vector, 2020, 13(1): 144.
- [16] LIU XH, WANG YQ, ZHOU KY, *et al.* Study on allele-specific diagnostic PCR of the traditional chinese medicines of the deers [J]. Acta Pharm Sin, 2001, 36(8): 631–635.
- [17] YANG Y, ZHENG Y, LU B, *et al.* Rapid identification of *cervus antlers* by species-specific PCR assay [J]. Nat Prod Res, 2020, 34(9): 1315–1319.
- [18] WEN J, TINACCI L, ACUTIS PL, *et al.* An insight into the Chinese traditional seafood market: Species characterization of cephalopod products by DNA barcoding and phylogenetic analysis using *COI* and 16S rRNA genes [J]. Food Control, 2017, 182: 333–342.
- [19] IVANOVA NV, CLARE EL, BORISENKO AV. DNA barcoding in mammals [J]. Methods Mol Biol, 2012, 858(858): 153–182.
- [20] MATSUNAGA T, CHIKUNI K, TANABE R, *et al.* Determination of mitochondrial cytochrome B gene sequence for red deer (*Cervus elaphus*) and the differentiation of closely related deer meats [J]. Meat Sci, 1998, 49(4): 379–385.
- [21] SHAIBU JO, ONWUAMAH CK, JAMES AB, *et al.* Full length genomic sanger sequencing and phylogenetic analysis of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) in Nigeria [J]. PLoS One, 2021, 16(1): e0243271.
- [22] XU XJ, ZHANG DG, ZHAO T, *et al.* Characterization and expression analysis of seven selenoprotein genes in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* to dietary selenium levels [J]. J Trace Elem Med Biol, 2020, 62: 126600.
- [23] HEBERT PD, CVWINSKA A, BALL SL, *et al.* Biological identifications through DNA barcodes [J]. Proc Biol Sci, 2003, 270(1512): 313–321.
- [24] HANDY SM, DEEDS JR, IVANOVA NV, *et al.* A single-laboratory validated method for the generation of DNA barcodes for the identification of fish for regulatory compliance [J]. J AOAC Int, 2011, 94(1): 201–210.
- [25] RATNASINGHAM S, HEBERT PDN. BOLD: The barcode of life data system (www.barcodinglife.org) [J]. Mol Ecol Not, 2007, 7(3): 355–364.
- [26] BENSON DA, KARSCHMIZRACHI I, LIPMAN DJ, *et al.* GenBank [J]. Nucl Acid Res, 1999, 24(1): 1.
- [27] MACHER JN, MACHER TH, LEESE F. Combining NCBI and BOLD databases for OTU assignment in metabarcoding and metagenomic data: The BOLD_NCBI_Merger [J]. Peer J Preprints, 2017, 5: e3133v1.
- [28] TOBE SS, KITCHENER AC, LINACRE A, *et al.* Reconstructing mammalian phylogenies: A detailed comparison of the cytochrome b and cytochrome oxidase subunit I mitochondrial genes [J]. PLoS One, 2010, 5(11): e14156.
- [29] KVIST S. Barcoding in the dark?: A critical view of the sufficiency of zoological DNA barcoding databases and a plea for broader integration of taxonomic knowledge [J]. Mol Phylogenet Evol, 2013, 69(1): 39–45.
- [30] LAL D, LAL R. Wrong sequences in databases: whose fault? [J]. Indian J Microbiol, 2011, 51(3): 413.
- [31] LI M, TAMATE HB, WEI FW, *et al.* Phylogenetic relationships among deer in China derived from mitochondrial DNA cytochrome b sequences [J]. Acta Theriol, 2003, 48(2): 207–219.
- [32] SONET G, JORDAENS K, BRAET Y, *et al.* Utility of GenBank and the barcode of life data systems (BOLD) for the identification of forensically important diptera from Belgium and France [J]. ZooKeys, 2013, 30(365): 307–328.
- [33] TOBE SS, KITCHENER AC, LINACRE A. Cytochrome b or cytochrome c oxidase subunit I for mammalian species identification-An answer to the debate [J]. Forensic Sci Int, 2009, 2(1): 306–307.
- [34] TOBE SS, KITCHENER AC, LINACRE A. Assigning confidence to sequence comparisons for species identification: A detailed comparison of the cytochrome b and cytochrome oxidase subunit I mitochondrial genes [J]. Forensic Sci Int, 2011, 3(1): 246–247.
- [35] BIDARTONDO MI. Preserving accuracy in GenBank [J]. Science, 2008, 319(5870): 1616.
- [36] HARRIS DJ. Can you bank on GenBank? [J]. Trends Ecol Evol, 2003, 18(7): 317–319.
- [37] PENTINSAARI M, RATNASINGHAM S, MILLER SE, *et al.* BOLD and GenBank revisited-Do identification errors arise in the lab or in the sequence libraries? [J]. PLoS One, 2020, 15(4): e0231814.

(责任编辑: 于梦娇 郑 丽)

作者简介



王佳雯, 硕士研究生, 主要研究方向
为食品质量与安全。

E-mail: 951721568@qq.com



陈 颖, 博士, 研究员, 主要研究方向
为食品质量安全。

E-mail: chenyingcaiq@163.com