

专题——分子生药学研究

基于形态和 DNA 序列分析的海龙类
药材商品的基原调查刘富艳^{1,2} 金艳² 袁媛² 秦雯¹ 蒋超² 赵玉洋² 黄璐琦²

(1 北京城市学院生物医学学部,北京,100083; 2 道地药材国家重点实验室培育基地,中国中医科学院中药资源中心,北京,100700)

摘要 目的:为市售海龙药材的鉴别以及建立质量控制标准提供科学依据。方法:对我国主要药材市场的海龙类商品进行收集,并通过形态鉴别和 DNA 分子鉴别确定海龙商品基原。结果:共有刁海龙 *Solenognathus hardwickii* (Gray, 1830)、拟海龙 *Syngnathoides biaculeatus* (Bloch, 1785)、舒氏海龙 *Syngnathus schlegeli* Kaup, 1856、宝珈枪吻海龙 *Doryichthys boaja* (Bleeker, 1850)、黑斑刁海龙 *Solegnathus lettiensis* Bleeker, 1860、斗氏刁海龙 *Solegnathus dunckeri* Whitley, 1927、多棘刁海龙 *Solegnathus spinosissimus* Günther, 1870、粗吻海龙 *Trachyrhamphus serratus* (Temminck et Schlegel, 1847)、光粗吻海龙 *Trachyrhamphus bicoarctatus* (Bleeker, 1857)、长吻粗吻海龙 *Trachyrhamphus longirostris* Kaup, 1856、葛氏海蠋鱼 *Halicampus grayi* Kaup, 1856 等 11 种基原,其中黑斑刁海龙、斗氏刁海龙、光粗吻海龙、长吻粗吻海龙为首次在中药市场中发现。结论:本文所进行的 DNA 序列分析结合形态鉴别方法也对其他中药材的市场调查和商品基原鉴别研究提供了模式。

关键词 海龙药材;市场调查;分子鉴别

Survey on Origin of Medicinal Commodities of *Syngnathus* Based on Morphology and DNA Sequencing IdentificationLiu Fuyan^{1,2}, Jin Yan², Yuan Yuan², Qin Wen¹, Jiang Chao², Zhao Yuyang², Huang Luqi²

(1 Department of Biomedical, Beijing City University, Beijing 100083, China; 2 State Key Laboratory of Dao-di Herbs Breeding Base, National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

Abstract Objective: To provide scientific basis for the identification and establishment of quality control standards of medicinal *Syngnathus* sold in the markets. **Methods:** The *Syngnathus* commodities in herbal markets were collected, and the origin base of *Syngnathus* commodities was determined through morphological characteristics and DNA molecule identification. **Results:** There were 11 species of origin including *Solenognathus hardwickii* (Gray, 1830), *Syngnathoides biaculeatus* (Bloch, 1785), *Syngnathus schlegeli* (Kaup, 1856), *Doryichthys boaja* (Bleeker, 1850), *Solegnathus lettiensis* (Bleeker, 1860), *Solegnathus dunckeri* (Whitley, 1927), *Solegnathus spinosissimus* (Günther, 1870), *Trachyrhamphus serratus* (Temminck et Schlegel, 1847), *Trachyrhamphus bicoarctatus* (Bleeker, 1857) and *Halicampus grayi* (Kaup, 1856). The origin of *S. lettiensis*, *S. dunckeri*, *T. bicoarctatus* and *T. longirostris* was observed for the first time in commercial herbal markets. **Conclusion:** The method of DNA sequences analysis combined with morphological characteristics identification also provided a model of other market surveys and commodity origin identification study in Chinese herbal markets.

Key Words *Syngnathus*; Market survey; Molecular identification

中图分类号:R284.1 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2018.02.001

中药商品基原调查是系统整理中药品种,改善药材市场品种混乱情况,确定真伪鉴别目标,提高中药质量标准的前提条件。海龙是我国传统名贵中药材,有温肾壮阳、散结消肿的作用。2015 年版《中华人民共和国药典》记载其基原为海龙科动物刁海龙 (*Solenognathus hardwickii*, Gray)、拟海龙 (*Syn-*

gnathoides biaculeatus, Bloch) 或尖海龙 (*Syngnathus acus* Linnaeus) 的干燥体^[1]。由于目前海龙未能实现有效的人工养殖,海龙野生资源日益减少,市场情况日趋复杂。此前调查研究认为,市场上常见混伪品主要有粗吻海龙 (*Trachyrhamphus serratus*)、海蠋鱼 (*Halicampus grayi*)、宝珈海龙 (*Doryichthys boaja*)、多

基金项目:国家药典委员会项目(2016-7)——《中华人民共和国药典》药品标准提高项目;中医药行业科研专项(201407003)——常用大宗中药材质量现场快速检测技术研究;中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助项目(ZZ10-008)

作者简介:刘富艳(1993.09—),女,在读研究生,研究方向:分子生药学,E-mail:1257970496@qq.com

通信作者:袁媛(1978.07—),女,博士,研究员,研究方向:中药鉴定与分子生药学,E-mail:y_yuan0732@163.com;蒋超(1988.06—),男,博士,助理研究员,研究方向:中药分子鉴定,E-mail:jiangchao0411@126.com

棘刁海龙(又名贡氏柄颌海龙,*Solegnathus spinosissimus*)、蓝海龙(又名蓝点副海龙,*Hippichthys cyanospilos*)、低海龙(又名低副海龙,*Hippichthys heptagonus*)、冠海龙(*Corythoichthys conspicillatus*)、舒氏海龙(*Syngnathus schlegeli*)等,但目前由于外来药材数量增加,且海龙的性状鉴别特征主要包括体长、体色、眼径、头长、背鳍、胸鳍、尾鳍形态等,在干制过程中,部分性状损坏,难以区分,而其体色和表面纹理特征在去除皮膜过程中消失或发生改变,部分混伪品与正品海龙形态差异不明显,需要建立更为稳定准确的基原鉴别方法。近年来随着分子系统学和生物信息学的发展,包含管口鱼目在内的动植物核酸数据库已逐步建立^[24]。而此前不同的药源研究结果均不一致、对于同一基原的形态描述也有差异^[5-7],造成市场上品种混乱,掺伪掺假现象普遍存在,急需对商品海龙的基原进行进一步的澄清。本文通过形态归类结合细胞色素 c 氧化酶 I 基因(COI)序列分析对收集到的 126 批市售商品海龙进行物种基原调查,为海龙鉴别提供参考依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Veriti 96 孔梯度 PCR 扩增仪(Applied Biosystem 公司)、VORTEX-2 GENIE 漩涡震荡仪(Scientific industries 公司)、SYNGENE 凝胶成像系统(GENE 公司)、Nanodrop 2000 微量核酸定量分析仪(Thermo Fisher 公司)。

1.2 试剂 蛋白酶 K(Promega 公司)、Ex Taq DNA 聚合酶(Takara 公司)、SpeedSTAR HS Taq DNA 聚合酶(Takara 公司)、2000 bp DNA Marker(Takara 公司)、Wizad® SV Genomic DNA Purification System 试剂盒(Promega 公司)。

1.3 分析样品 海龙药材采购于河北安国、安徽亳州、四川成都、广西玉林、广东清平、广东普宁、山东鄆城、云南昆明中药材市场,共收集样品 126 份,凭证标本保存于中国中医科学院中药资源中心。见表 1。

2 方法与结果

2.1 形态鉴别 所有样品均根据《中华人民共和国药典》《南海鱼类志》^[8]、《黄渤海鱼类图志》^[9]、《东海鱼类志》^[10]、《中国海洋鱼类》^[11]、FishBase 全球鱼类数据库^[12]的要求进行形态鉴别。

2.2 PCR 鉴别

2.2.1 DNA 提取 样品使用 70% 乙醇擦拭表面,晾干。取海龙肌肉组织样品约 30 mg,置洁净的 2 mL 离心管中,经 DNA 提取研磨仪研磨至粉末,按照

Wizad® SV Genomic DNA Purification System 试剂盒说明书提取总 DNA,采用 Nanodrop 2000 微量核酸定量分析仪测定其浓度,并根据 A_{260}/A_{280} 、 A_{260}/A_{230} 的值判断 DNA 提取质量,用于 PCR 反应或于 -20℃ 保存备用。

2.2.2 PCR 扩增及电泳检测 取所提取的 DNA,使用 COI 通用引物、鱼类通用引物 Fish 1 或鱼类通用引物 Fish 2 进行 PCR 扩增^[13-14]。PCR 反应体系为 25 μL,包含 dd H₂O 19 μL,2.5 μL 10 × PCR buffer,1.5 μL dNTP(10 mmol/L),上游及下游引物各 0.25 μL(10 μmol/L)、0.2 μL Ex Taq DNA 聚合酶或 SpeedSTAR HS Taq DNA 聚合酶(5 U/μL),1 μL Mg²⁺(10 μmol/L),1 μL DNA 模板。扩增结束后取 5 μL PCR 产物,加入 4 μL 6 × Loading buffer 于 EtBr 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,扩增引物及反应程序见表 2。

2.2.3 测序及数据处理 取阳性扩增产物经纯化后使用 ABI3730XL(Applied Biosystems Co.,USA)测序仪以对应引物进行双向测序,测序由睿博兴科生物技术有限公司完成。使用 BioEdit 7.2.6 软件对测序峰图进行校对、去除引物序列及拼接,获得对应测序结果。序列使用 DNAsp 5.0 软件进行单倍型分析,每种单倍型均经 NCBI 数据库(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)和 BOLD Systems v3(boldsystems.org)数据库进行 BLAST 比对,获得最相似物种信息。利用 MEGA 6.0 对获得的单倍型序列进行分析,基于 Kimura-2-parameter 模型使用 Neighbor-Joining 法构建系统发育树,bootstrap 值设定为 1 000 次重复。

表 1 海龙类样品实验材料表

序号	商品名	收集地	初步分类	备注	样品批数
1	三角海龙	亳州、安国、鄆城	拟海龙	未去皮膜	6
2	三角海龙	亳州、安国、鄆城	拟海龙	去皮膜	8
3	六角海龙	亳州、安国、鄆城	宝珈海龙	未去皮膜	5
4	六角海龙	亳州、安国、普宁	宝珈海龙	去皮膜	9
5	刁海龙	亳州、安国、广州	刁海龙类	具棘刺	16
6	刁海龙	亳州、安国	刁海龙类	具有黑斑	4
7	刁海龙	亳州、安国、广州、成都	刁海龙类	未去皮膜	23
8	海针	亳州、安国	尖海龙类	未去皮膜	7
9	小海龙	亳州、安国、成都、广州	尖海龙类	未去皮膜	4
10	尖海龙	亳州、安国	尖海龙类	未去皮膜	3
11	粗吻海龙	亳州、安国	粗吻海龙	未去皮膜	4
12	粗吻海龙	亳州、安国、广州	粗吻海龙	去皮膜	5
13	海蛇	亳州、安国、昆明	粗吻海龙	未去皮膜	12
14	海蛇	亳州、安国、玉林	粗吻海龙	去皮膜	13
15	黑海龙	亳州、安国	粗吻海龙	未去皮膜	7

表 2 COI 引物序列及 PCR 反应程序

引物对	引物	序列	反应程序
COI 通用引物	LCO1490	5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'	94 ℃ 预变性 3 min;94 ℃ 变性 30 s,45 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 30 s,共 5 个循环;94 ℃ 变性 20 s,50 ℃ 退火 20 s,72 ℃ 延伸 45 s,共 35 个循环,最后 72 ℃ 延伸 5 min。
	HCO2198	5'-TAAACTTTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'	
鱼类通用引物 1	Fish F1	5'-TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3'	95 ℃ 预变性 2 min;94 ℃ 变性 30 s,54 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 1 min,共 35 个循环;最后 72 ℃ 延伸 10 min
	Fish R1	5-TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA-3'	
鱼类通用引物 2	Fish F2	5'-TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC-3'	94 ℃ 预变性 3 min;94 ℃ 变性 20 s,52 ℃ 退火 20 s,72 ℃ 延伸 1 min,共 35 个循环;最后 72 ℃ 延伸 10 min
	Fish R2	5'-ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA-3'	

2.3 结果分析

2.3.1 基于形态的初步鉴别 商品海龙药材除小海龙和六角海龙外均有去除皮膜和未去皮膜的类型，由于是否去皮膜仅影响商品药材表面颜色和纹理特征，不影响棘棱数、头部形态或骨环数等，可明显将去皮膜和未去皮膜的同种药材归为一类。商品海龙药材形态上根据躯干部棘棱数和体型大小可明显分为 5 大类：1) 四棱形的拟海龙类（三角海龙）；2) 五棱形的刁海龙类（刁海龙）；3) 六棱形的宝珈海龙类（六角海龙）；4) 柱状六棱形的粗吻海龙类（粗吻海龙、海蛇或黑海龙）；5) 细长呈鞭状的尖海龙类（小海龙、尖海龙或海针）。同类海龙仅骨环数、吻长、体表棘刺有无，形态大小等具有可定性的区别，背鳍、胸鳍等数目难以准确测量，差异不显著。为确定市售海龙药材基原，本研究对所有样品的 COI 片段进行扩增、测序及比对分析。

2.3.2 PCR 和 DNA 序列分析结果 使用试剂盒提取的海龙类样品总 DNA 浓度均大于 10 ng/μL，OD₂₆₀/OD₂₈₀在 1.5 左右，符合中华中医药学会团体标准“T/CACM 010-2016 中药分子鉴别通则”的基本要求。使用 COI1490/2198 通用引物和条件进行 PCR 扩增其条带较弱，部分刁海龙类样品无法获得阳性条带，总测序成功率为 66.12%，无法获得序列的样品经由鱼类通用引物对 Fish1. F/Fish1. R 和 Fish2. F/Fish2. R 进行重扩增测序，经程序调整后均可获得 DNA 序列。以 3 对引物的最小共有 PCR 扩增产物序列为最终序列，进行 BLAST 比对及系统发育树分析。126 条序列长度均为 649 bp，共获得 68 种单倍型，BLAST 比对结果见表 3。除单倍型 Hap17 ~ Hap23、Hap33、Hap34、Hap38、Hap66 ~ Hap68 外，利用 NCBI 和 BOLD 数据库鉴别结果均一致，各单倍型序列所对应的物种分别为宝珈枪吻海龙、粗吻海龙、刁海龙、多棘刁海龙、拟海龙、舒氏海龙等 6 种。为进一步确定各单倍型

尤其是两数据库比对结果不一致的单倍型所对应的物种，对单倍型序列比齐后进行系统发育树分析。

从 Genbank 数据库中选择海龙科不同种属序列为参照序列，与所获得的单倍型序列一起，使用 BioEdit 软件进行序列对齐后一同构建系统发育树，海龙类单倍型序列共可分为 6 大支。见图 1。21 种单倍型与粗吻海龙聚为一类，13 种单倍型与拟海龙聚为一支，4 种单倍型与刁海龙聚为一支，2 种单倍型与多棘刁海龙聚为一支，5 种单倍型与宝珈枪吻海龙聚为一支，12 种单倍型与舒氏海龙聚为一支，另有 11 种单倍型单独分为 5 支，与 BLAST 结果相一致。其中单倍型 Hap17、Hap18 聚为一支，与单倍型 Hap19 ~ Hap22 及粗吻海龙共同聚为一大支；单倍型 Hap32、Hap33 聚为一支，与单倍型 Hap66 及刁海龙共同聚为一大支；单倍型 Hap67、Hap68 与黄带冠海龙 *Corythoichthys flavofasciatus* 聚为一支。为进一步确定各单倍型所对应的物种，对未能鉴别到种的样品依据对应分类学文献进行全属物种性状比较。

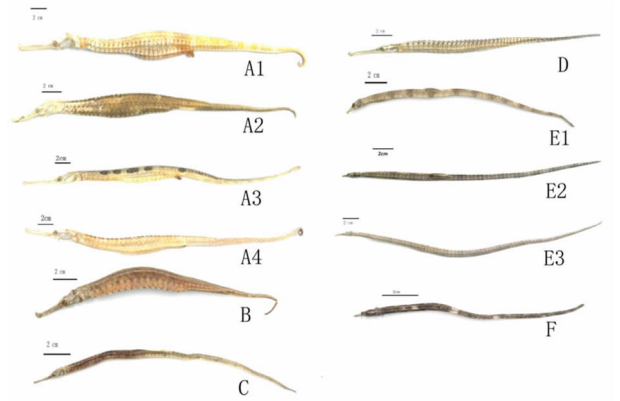


图 1 市售海龙商品形态图

注：A1: *Solegnathus spinosissimus*, A2: *Solegnathus dunckeri*, A3: *Solegnathus lettiensis*, A4: *Solegnathus hardwickii*; B: *Syngnathoides biaculeatus*; C: *Syngnathus schlegelii*; D: *Doryichthys boaja*; E1: *Trachyrhamphus serratus*, E2: *Trachyrhamphus bicoarctatus*, E3: *Trachyrhamphus longirostris*; F: *Halicampus grayi*

表 3 市售海龙药材 NCBI 和 BOLD 数据库 BLAST 比对结果

haplotype	NCBI			BOLD	
	Species identification	Identity %	Accession	Species identification	Probability %
Hap1	<i>Doryichthys boaja</i>	99	KP140432.1	<i>Doryichthys boaja</i>	99.53
Hap2	<i>Doryichthys boaja</i>	100	KP140457.1	<i>Doryichthys boaja</i>	100
Hap3	<i>Doryichthys boaja</i>	100	KP140453.1	<i>Doryichthys boaja</i>	100
Hap4	<i>Doryichthys boaja</i>	100	KP140432.1	<i>Doryichthys boaja</i>	99.84
Hap5	<i>Doryichthys boaja</i>	100	KP140456.1	<i>Doryichthys boaja</i>	99.84
Hap6	<i>Trachyrhamphus serratus</i>	100	KP140636.1	<i>Trachyrhamphus serratus</i>	100
Hap7	<i>Trachyrhamphus serratus</i>	100	KP140631.1	<i>Trachyrhamphus serratus</i>	100
Hap8	<i>Trachyrhamphus serratus</i>	100	KP140655.1	<i>Trachyrhamphus serratus</i>	100
Hap9	<i>Trachyrhamphus serratus</i>	99	KP140642.1	<i>Trachyrhamphus serratus</i>	99.84
Hap10	<i>Trachyrhamphus serratus</i>	100	KP140651.1	<i>Trachyrhamphus serratus</i>	100
Hap11	<i>Trachyrhamphus serratus</i>	100	KP140642.1	<i>Trachyrhamphus serratus</i>	100
Hap12	<i>Trachyrhamphus serratus</i>	99	KP140651.1	<i>Trachyrhamphus serratus</i>	99.53
Hap13	<i>Trachyrhamphus serratus</i>	100	KP140670.1	<i>Trachyrhamphus serratus</i>	100
Hap14	<i>Trachyrhamphus serratus</i>	99	KP140642.1	<i>Trachyrhamphus serratus</i>	99.84
Hap15	<i>Trachyrhamphus serratus</i>	99	KP140636.1	<i>Trachyrhamphus serratus</i>	98.6
Hap16	<i>Trachyrhamphus serratus</i>	100	KP140647.1	<i>Trachyrhamphus serratus</i>	100
Hap17	<i>Trachyrhamphus serratus</i>	92	KP140627.1	No match	–
Hap18	<i>Trachyrhamphus serratus</i>	92	KP140627.1	No match	–
Hap19	<i>Trachyrhamphus serratus</i>	99	KP140647.1	No match	–
Hap20	<i>Trachyrhamphus serratus</i>	86	KP140659.1	No match	–
Hap21	<i>Trachyrhamphus serratus</i>	86	KP140659.1	No match	–
Hap22	<i>Trachyrhamphus serratus</i>	85	KP140659.1	No match	–
Hap23	<i>Trachyrhamphus serratus</i>	86	KP140659.1	No match	–
Hap24	<i>Trachyrhamphus serratus</i>	99	KP140670.1	<i>Trachyrhamphus serratus</i>	99.69
Hap25	<i>Trachyrhamphus serratus</i>	99	KP140670.1	<i>Trachyrhamphus serratus</i>	99.84
Hap26	<i>Trachyrhamphus serratus</i>	99	KP140670.1	<i>Trachyrhamphus serratus</i>	99.53
Hap27	<i>Trachyrhamphus serratus</i>	99	KP140637.1	<i>Trachyrhamphus serratus</i>	99.84
Hap28	<i>Trachyrhamphus serratus</i>	99	KP140651.1	<i>Trachyrhamphus serratus</i>	99.84
Hap29	<i>Trachyrhamphus serratus</i>	99	KP140670.1	<i>Trachyrhamphus serratus</i>	99.84
Hap30	<i>Trachyrhamphus serratus</i>	99	KP140651.1	<i>Trachyrhamphus serratus</i>	99.84
Hap31	<i>Trachyrhamphus serratus</i>	99	KP140651.1	<i>Trachyrhamphus serratus</i>	99.53
Hap32	<i>Trachyrhamphus serratus</i>	100	KP140637.1	<i>Trachyrhamphus serratus</i>	100
Hap33	<i>Solegnathus hardwickii</i>	94	KY066146.1	<i>Solegnathus lettiensis</i>	99.69
Hap34	<i>Solegnathus hardwickii</i>	94	KY066146.1	<i>Solegnathus lettiensis</i>	98.91
Hap35	<i>Solegnathus hardwickii</i>	100	KP140478.1	<i>Solegnathus hardwickii</i>	100
Hap36	<i>Solegnathus hardwickii</i>	100	KP140463.1	<i>Solegnathus hardwickii</i>	100
Hap37	<i>Solegnathus hardwickii</i>	98	KP140478.1	<i>Solegnathus hardwickii</i>	98.44
Hap38	<i>Solegnathus dunckeri</i>	99	GQ502177.1	<i>Solegnathus hardwickii</i>	99.84
Hap39	<i>Solegnathus spinosissimus</i>	99	KY066147.1	<i>Solegnathus spinosissimus</i>	99.69
Hap40	<i>Solegnathus spinosissimus</i>	99	KY066147.1	<i>Solegnathus spinosissimus</i>	99.53
Hap41	<i>Syngnathoides biaculeatus</i>	99	KP140515.1	<i>Syngnathoides biaculeatus</i>	99.84
Hap42	<i>Syngnathoides biaculeatus</i>	99	KP140515.1	<i>Syngnathoides biaculeatus</i>	99.38
Hap43	<i>Syngnathoides biaculeatus</i>	100	KP140515.1	<i>Syngnathoides biaculeatus</i>	100
Hap44	<i>Syngnathoides biaculeatus</i>	99	KP140497.1	<i>Syngnathoides biaculeatus</i>	99.53
Hap45	<i>Syngnathoides biaculeatus</i>	99	KP140515.1	<i>Syngnathoides biaculeatus</i>	99.84
Hap46	<i>Syngnathoides biaculeatus</i>	99	KP140515.1	<i>Syngnathoides biaculeatus</i>	99.53
Hap47	<i>Syngnathoides biaculeatus</i>	99	KP140519.1	<i>Syngnathoides biaculeatus</i>	99.07
Hap48	<i>Syngnathoides biaculeatus</i>	99	KP140518.1	<i>Syngnathoides biaculeatus</i>	99.84
Hap49	<i>Syngnathoides biaculeatus</i>	100	KP140518.1	<i>Syngnathoides biaculeatus</i>	100
Hap50	<i>Syngnathoides biaculeatus</i>	99	KP140515.1	<i>Syngnathoides biaculeatus</i>	99.84
Hap51	<i>Syngnathoides biaculeatus</i>	98	KP140518.1	<i>Syngnathoides biaculeatus</i>	98.45
Hap52	<i>Syngnathoides biaculeatus</i>	99	KP140492.1	<i>Syngnathoides biaculeatus</i>	99.84
Hap53	<i>Syngnathoides biaculeatus</i>	99	KP140515.1	<i>Syngnathoides biaculeatus</i>	99.84

续表 3 市售海龙药材 NCBI 和 BOLD 数据库 BLAST 比对结果

haplotype	NCBI			BOLD	
	Species identification	Identity %	Accession	Species identification	Probability %
Hap54	<i>Syngnathus schlegeli</i>	99	KP140620. 1	<i>Syngnathus schlegeli</i>	99. 84
Hap55	<i>Syngnathus schlegeli</i>	99	KP140620. 1	<i>Syngnathus schlegeli</i>	98. 59
Hap56	<i>Syngnathus schlegeli</i>	100	KP140620. 1	<i>Syngnathus schlegeli</i>	100
Hap57	<i>Syngnathus schlegeli</i>	100	KP140540. 1	<i>Syngnathus schlegeli</i>	100
Hap58	<i>Syngnathus schlegeli</i>	99	KP140618. 1	<i>Syngnathus schlegeli</i>	99. 84
Hap59	<i>Syngnathus schlegeli</i>	99	KP140620. 1	<i>Syngnathus schlegeli</i>	99. 53
Hap60	<i>Syngnathus schlegeli</i>	99	KP140620. 1	<i>Syngnathus schlegeli</i>	99. 53
Hap61	<i>Syngnathus schlegeli</i>	99	KP140620. 1	<i>Syngnathus schlegeli</i>	99. 84
Hap62	<i>Syngnathus schlegeli</i>	99	KP140620. 1	<i>Syngnathus schlegeli</i>	99. 84
Hap63	<i>Syngnathus schlegeli</i>	99	KP140620. 1	<i>Syngnathus schlegeli</i>	99. 38
Hap64	<i>Syngnathus schlegeli</i>	99	KP140620. 1	<i>Syngnathus schlegeli</i>	99. 84
Hap65	<i>Syngnathus schlegeli</i>	98	KP140620. 1	<i>Syngnathus schlegeli</i>	97. 67
Hap66	<i>Solegnathus dunckeri</i>	99	GQ502177. 1	<i>Solegnathus hardwickii</i>	99. 37
Hap67	<i>Corythoichthys flavofasciatus</i>	97	KP140415. 1	<i>Corythoichthys flavofasciatus</i>	97. 21
Hap68	<i>Corythoichthys flavofasciatus</i>	98	KP140415. 1	<i>Corythoichthys flavofasciatus</i>	98. 59

表 4 市售海龙商品的主要鉴别点

拉丁名	中文名	吻	体形	躯干部
<i>Solegnathus hardwickii</i>	刁海龙*	吻管背腹面及顶部的后端均被有大小不等粗糙颗粒状棘	长条形,侧扁,腹部中央棱特别突出	五棱形,体淡黄色,背棱两侧有一列黑褐色斑点,尾部骨环为一列
<i>Solegnathus spinosissimus</i>	多棘刁海龙	被小尖棘	体侧扁,中部略粗壮,直径 2~5 cm,背棱突出	五棱形,背部微隆起,有类圆形突起的“雪花样”纹理,全体密被尖棘
<i>Solegnathus dunckeri</i>	斗氏刁海龙	管状	长条形,侧扁,腹部中央棱特别突出	五棱形,背棱两侧有一列黑褐色斑点,尾部骨环为平行的两列
<i>Solegnathus lettiensis</i>	黑斑刁海龙	管状	长条形,侧扁,腹部中央棱特别突出	五棱形,体侧有 5~8 枚圆形深色斑块
<i>Syngnathoides biaculeatus</i>	拟海龙*	长管状	长棱柱形,直径约 2 cm	四棱形,体宽远大于体高
<i>Syngnathus schlegeli</i>	舒氏海龙	细长	细小,方柱状直径 0.2~0.3 cm	六棱形,全体平滑无棘
<i>Doryichthys boaja</i>	宝珈枪吻海龙	扁管状,2.5~3 cm	体粗强,略平扁	六棱形,后缘锋锐,各有一棘状突起,具不规则灰白色“U”形斑
<i>Trachyrhamphus serratus</i>	粗吻海龙	短管状,如鸟喙	细长方柱状,直径 0.5~1 cm	六棱形,尾部骨环 41~50 个
<i>Trachyrhamphus bicoarctatus</i>	光粗吻海龙	吻长 1 cm 以上,平滑无棘	细长,略成圆柱状	六棱形,全体平滑无棘,尾部骨环 55 个以上
<i>Trachyrhamphus longirostris</i>	长吻粗吻海龙	吻短,约 0.5 cm,吻背有小棘	方柱状	六棱形,尾部骨环 41~50 个
<i>Halicampus grayi</i>	葛氏海蠋鱼	吻短,腮盖后有非常突出的骨结	方柱形	六棱形,体环上缘有小棘,尾部骨环 32~37

注: * 为药典收载种

2.3.3 DNA 和形态结合的商品海龙基原分析 单倍型 Hap32、Hap33、Hap66 以超过 95% 的支持度与刁海龙属为一支,根据 Dawson 的文献^[15]进行形态鉴别,依据其骨环、尾部颜色、体表斑纹特征确定单倍型 Hap32、Hap33 对应物种为黑斑刁海龙(*Solegnathus lettiensis*)、单倍型 Hap66 对应物种为斗氏刁海龙(*Solegnathus dunckeri*)。以相同的方式,确定单倍型 Hap17、Hap18、Hap19、Hap20、Hap21、Hap22 为粗吻海龙属物种序列,根据 Dawson 的文献^[16]进行形态鉴别,粗吻海龙属仅有 3 个物种,依据其吻长、

体宽、眼径、骨环数特征确定单倍型 Hap17、Hap18 对应物种为长吻粗吻海龙(*Trachyrhamphus longirostris*),单倍型 Hap19~Hap22 对应物种为光粗吻海龙(*Trachyrhamphus bicoarctatus*)。单倍型 Hap67、Hap68 均与黄带冠海龙(*C. flavofasciatus*)聚为一支,然而其体环上缘有细棘齿,体褐色有不明显横带,吻背中央隆起嵴有锯齿,与黄带冠海龙不符而与葛氏海蠋鱼(*Halicampus grayi*)相一致。分类上曾将葛氏海蠋鱼处理为黄带冠海龙的亚种(*Corythoichthys flavofasciatus conspicillatus*),序列有很高的相似性,

推断单倍型 Hap67、Hap68 对应物种为葛氏海蠋鱼。

DNA 序列分析结果表明商品名六角海龙基原物种为宝珈枪吻海龙,商品三角海龙基原物种为拟海龙,商品小海龙、尖海龙、海针的基原物种均为舒氏海龙,DNA 鉴别结果与形态鉴别结果完全一致。商品刁海龙共有 4 种不同基原,分别为刁海龙、多棘刁海龙、黑斑刁海龙和斗氏刁海龙,除多棘刁海龙外,其余 3 种海龙均符合 2015 年版《中华人民共和国药典》的性状描述,但均非《中华人民共和国药典》海龙基原物种。其中斗氏刁海龙形态与 2015 年版《中华人民共和国药典》规定的刁海龙形态最为相似,仅尾部骨环形态具有区别,斗氏刁海龙尾部为平行的双行骨环,刁海龙为单行骨环。商品海蛇、粗吻海龙、黑海龙商品为同一类,腹部均为柱状六棱形,其基原物种包括粗吻海龙、光粗吻海龙、长吻粗吻海龙和葛氏海蠋鱼,主要区别为吻长和骨环数,其中光粗吻海龙体细长,吻长 1.2 ~ 2 cm,尾部骨环 55 节以上;长吻粗吻海龙体粗壮,吻长 0.6 ~ 1.1 cm,吻背具小棘而呈锯齿状,尾部骨环 41 ~ 50 节;粗吻海龙体粗壮,吻长 0.4 ~ 0.8 cm,尾部骨环 41 ~ 50 节;葛氏海蠋鱼体粗壮,吻短,眼眶大而突出,尾部骨环 32 ~ 37 节。

2.3.4 海龙商品的快速性状鉴别 目前《中华人民共和国药典》中海龙性状项较为简略,无法完全区分正品和同属混伪品,而《中国海洋鱼类》等分类学著作仅关注原动物形态,其重要鉴别特征如体表颜色、棘棱位置、背鳍、胸鳍、尾鳍形态、骨环的数目在部分干燥的海龙药材中难以准确测定或发生改变,无法准确对海龙进行基原鉴别。故而本研究筛选出海龙商品药材特征性鉴别点(表 4),以达到快速性状鉴别目的。

3 讨论

3.1 市售海龙商品基原及其流变 本研究对主要中药材市场购买的 126 批海龙商品进行 DNA 提取,并进行性状鉴别和 DNA 序列分析,结果表明,126 批海龙基原物种有刁海龙(14 批)、多棘刁海龙(14 批)、黑斑刁海龙(14 批)、斗氏刁海龙(2 批)、宝珈枪吻海龙(14 批)、粗吻海龙(14 批)、光粗吻海龙(14 批)、长吻粗吻海龙(14 批)、拟海龙(14 批)、葛氏海蠋鱼(2 批)和舒氏海龙(16 批)。其中黑斑刁海龙、斗氏刁海龙、光粗吻海龙、长吻粗吻海龙为首次在中药市场上发现,表明近年来海龙商品基原已开始发生较大的流变。在商品标为刁海龙的样品中,多棘刁海龙所占比例与前期相比有所减少^[2],

但出现了 2 种新的混伪品黑斑刁海龙和斗氏刁海龙。市场中多家商户将刁海龙样品直接标注为澳洲海龙,由于刁海龙和黑斑刁海龙主产南海海域和澳大利亚海域,斗氏刁海龙产澳大利亚海域,市场上的刁海龙也有可能是从澳大利亚进口而来,表明我国海龙药材进口压力有所增加,也反映了我国海龙资源减少的现状。亳州、安国等多个药材市场的海龙商品中粗吻海龙类已占主流,且从单一的粗吻海龙发展为粗吻海龙和光粗吻海龙并重,并有长吻粗吻海龙和葛氏海蠋鱼混入,显示出海龙商品物种基原的复杂化。此外,本研究还发现,市场所称尖海龙、海针、小海龙的样品均非正品尖海龙,其基原均为海龙属舒氏海龙。虽然本研究仅收集到 16 批尖海龙类样品,不代表所有市场产品的基原,但其结果也对以海龙入药的中药饮片和中成药质量提出警示。税丕先、丁维毅等^[6-7]认为,海龙商品的基原物种还有蓝海龙、低海龙和冠海龙,但均为稀见种,本研究搜集的样品未出现,可能是多年来市场品种发生改变的结果。

3.2 分子鉴别用于中药商品市场调查 中药商品的市场调查是正本清源,确定鉴别和监管目标的前提条件。随着中药资源需求量扩大,资源蕴含量减少及中药国际贸易的进一步深化,市场地方习惯用药品种、民间药和民族药种类以及进口药材的呈现增加的趋势,中药材商品的物种基原日趋复杂,形态鉴别对于性状极为相似的近缘物种鉴别日趋困难。分子鉴别方法有望提高中药商品市场调查的结果准确性和稳定性,是传统市场调查的重要工具和有效补充。温莲珑等^[17]对市售海马商品物种基原进行分析,通过形态鉴别分为 13 个物种,而经 DNA 序列分析后修订 10 个物种。本研究也发现粗吻海龙、光粗吻海龙和长吻粗吻海龙 DNA 序列存在巨大差异,而其形态非常相似,极易混淆。基于 DNA 分子鉴别的手段,可以准确识别中药商品出可能存在的非药典收载基原物种,确定市场的混伪情况,贾静等^[18]对市售鹿茸粉进行 COI 测序,发现 62% 的商品为驯鹿基原;Newmaster 等^[19]使用 rbcL + ITS2 片段对北美 12 家公司中药材产品进行测序,发现 59% 的商品中含有未在标签上列出的物种;蒋超等^[20-21]使用 PCR-RFLP、DNA 测序和 CCP-FRET 荧光标记对我国药店、医院和饮片生产企业的鹿茸和川贝母饮片进行检测,发现 67.8% 的川贝母和 52.8% 的鹿茸均含有混伪品,市售鹿茸基原物种包括驯鹿、骡鹿、白唇鹿和麋鹿等。但仅通过 DNA 序列分析或形态鉴

别均进行物种基原鉴别均存在一定的局限性。受限于核酸序列数据库的准确性和完备程度,部分样品进行比对时仅在属这一层级具有高的支持度(>95%),在物种层级则容易出现错误。见表 2、图 2。而在确定属的情况下,通过对标本和图片进行核对,可以进一步确定其基原物种。

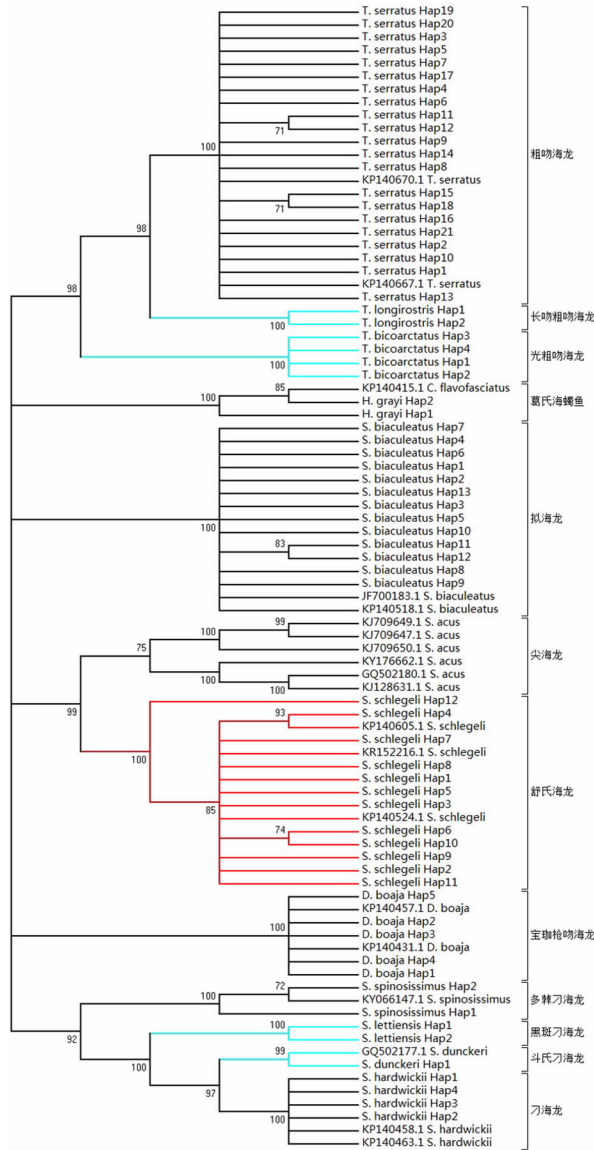


图 2 市售海龙 COI 片段系统发育树分析结果

将分子鉴别手段和形态鉴别结合品种鉴别的步骤如下:通过广泛采集有代表性的商品药材→对样品进行 DNA 提取和标准片段测序→分析单倍型的种类,进行序列比对从而确定商品药材所对应的属→对照样品的模式标本、模式图片或分类学文献,根据分类特征确定基原物种。在必要时,可以取经过确证动植物标本进行测序,与所获得的单倍型序列进行比对,进行交叉验证是否为同一物种。进而,在确定市场基原物种的情况下,根据各同类药材的共

有特征,总结出核心鉴别点,将进一步规范中药商品市场,提高中药质量标准。

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,2015:294.
- [2] Ratnasingham S, Hebert PDN. A DNA-based registry for all animal species: the Barcode Index Number(BIN) system[J]. Plo S one, 2013, 8(7): e66213.
- [3] Ratnasingham S, Hebert PDN. BOLD: The Barcode of Life Data System(www. barcodinglife. org)[J]. Mol Ecol Notes, 2007, 7(3): 355.
- [4] Sayers E W, Barrett T, Benson DA, et al. Database resources of the national center for biotechnology information[J]. Nucleic Acids Res, 2012, 40(D1): D13.
- [5] 张朝晖, 徐国钧, 徐路珊, 等. 海龙类药材性状与商品鉴别[J]. 中药材, 1997, 20(2): 63.
- [6] 税不先. 海龙及其混淆品掺假品的鉴别[J]. 中国药业, 2004, 13(7): 59.
- [7] 丁维毅, 王爱平, 王泽平. 海龙与常见混淆品的鉴别[J]. 基层中药杂志, 1992, 6(2): 7.
- [8] 朱元鼎, 张春霖, 成庆泰. 南海鱼类志[M]. 北京: 科学出版社, 1963: 1.
- [9] 中国科学院动物研究所. 中国科学院海洋研究所, 上海水产学院. 东海鱼类志[M]. 北京: 科学出版社, 1962: 1.
- [10] 张春霖. 黄渤海鱼类调查报告[M]. 北京: 科学出版社, 1960: 1.
- [11] 陈大刚, 张美昭. 中国海洋鱼类·上卷[M]. 青岛: 中国海洋大学出版社, 2015: 1.
- [12] Froese R, Pauly D. FishBase. World Wide Web electronic publication. www. fishbase. org, version(06/2017).
- [13] Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, et al. DNA barcoding Australia's fish species[J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2005, 360(1462): 1847.
- [14] Hebert PDN, Ratnasingham S, deWaard JR. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species[J]. Proc Biol Sci, 2003, 270(Suppl 1): S96-S99.
- [15] Dawson CE. Synopsis of the Indo-Pacific Genus Solegnathus (Pisces: Syngnathidae)[J]. Japan J Ichthyol, 1982, 29(2): 139.
- [16] Dawson CE. Review of the Indo-Pacific pipefish genus Trachyrhamphus (Syngnathidae)[J]. Micronesica, 1982, 18(2): 163.
- [17] 温琰莲, 李军德, 万德光, 等. 海马市场调查与基原动物鉴别研究[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(7): 969.
- [18] 贾静, 石林春, 徐志超, 等. 市售鹿茸药材的 DNA 条形码鉴别[J]. 药学报, 2015, 50(10): 1356.
- [19] Newmaster SG, Grguric M, Shanmughanandhan D, et al. DNA barcoding detects contamination and substitution in North American herbal products[J]. BMC Med, 2013, 11(1): 222.
- [20] Jiang C, Yuan Y, Yang G, et al. Fluorescence Visual Detection of Herbal Product Substitutions at Terminal Herbal Markets by CCP-based FRET technique[J]. Sci Rep, 2016, 6: 35540.
- [21] Jiang C, Jin Y, Zhao X, et al. Rapid and robust authentication of deer antler velvet product by fast PCR-RFLP analysis[J]. Mitochondrial DNA Part A, 2017: 1.