

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2022.10.009

基于 *COI* 基因序列的日本医蛭疑似种鉴定

余米¹, 苏胜齐², 周梦¹, 曹敏^{1,3}, 封孝兰¹

1. 重庆市药物种植研究所, 重庆 南川 408435; 2. 西南大学 水产学院, 重庆 400715;

3. 特色生物资源研究与利用川渝共建重点实验室, 重庆 南川 408435

摘要: 采用线粒体 *COI* (细胞色素氧化酶 I 亚基, *cytochrome oxidase subunit I*) 基因序列鉴别日本医蛭及其常见疑似种, 并分析其遗传多样性和亲缘关系。以日本医蛭及其疑似种为材料, 提取线粒体 DNA, 扩增其 *COI* 基因后进行测序, 并计算遗传距离和聚类分析。结果显示, 日本医蛭 *COI* 序列长度为 680 bp, 碱基 A, T, C, G 质量分数分别为 35.1%, 28.7%, 16.2% 和 20.0%, 碱基 AT 质量分数为 63.8%; 疑似种 YS1~YS10 的碱基 A, T, C, G 平均质量分数分别为 39.8%, 29.4%, 15.2% 和 14.9%, 碱基 AT 质量分数为 69.2%。11 种蛭类 *COI* 序列中有 569 个一致位点, 84 个变异位点, 其中, 40 个位点发生了碱基转换, 44 个位点发生了碱基颠换, 转换与颠换的比值为 0.90。日本医蛭与疑似种的遗传距离在 0.159~0.166 之间。基于 *COI* 序列的 DNA 条形码技术可以很好地鉴定正品日本医蛭与其疑似种, 本试验鉴定的疑似种均不是日本医蛭。

关键词: 日本医蛭; 细胞色素氧化酶 I 亚基; 物种鉴定

中图分类号: S917 **文献标志码:** A

文章编号: 1673-9868(2022)10-0074-07

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Identification of Suspected Species of *Hirudo nipponica* Based on *COI* Gene Sequence

YU Mi¹, SU Shengqi², ZHOU Meng¹,
CAO Min^{1,3}, FENG Xiaolan¹

1. Chongqing Institute of Medicinal Plant Cultivation, Nanchuan Chongqing 408435, China;

2. College of Fisheries, Southwest University, Chongqing 400715, China;

3. Bio-resource Research and Utilization Joint Key Laboratory of Sichuan and Chongqing, Nanchuan Chongqing 408435, China

Abstract: The mitochondrial *COI* gene sequence was used to analyze the genetic diversity and relationship between *Hirudo nipponica* and its suspected species. The mitochondrial DNA of *H. nipponica* and its suspected species were extracted. The *COI* gene were amplified and sequenced. Genetic distance and relationship were analyzed. The results showed that the sequence length of *COI* of *H. nipponica* was 680 bp. The contents of A, T, C and G were 35.1%, 28.7%, 16.2% and 20.0%, respectively, with 63.8% of

收稿日期: 2021-03-08

基金项目: 重庆市科技局技术创新与应用发展项目(cstc2019jcsx-msxmX0357, cstc2019jcsx-dxwtBX0021); 重庆市卫健委“药用动物学”重点学科建设项目。

作者简介: 余米, 助理研究员, 主要从事药用水生动物繁育的研究。

通信作者: 曹敏, 助理研究员。

AT content. The average contents of A, T, C and G in YS1~YS10 were 39.8%, 29.4%, 15.2% and 14.9%, respectively, with 69.2% of AT content. There were 569 consensus sites, 84 variation sites in 11 *Hirudo* species. Among them, 40 loci had base conversion and 44 had transversions. The ratio of conversion versus transversion was 0.90. The genetic distance between *H. nipponica* and 10 suspected species ranged from 0.159 to 0.166. DNA barcoding technology based on *COI* sequence can be used to identify authentic *H. nipponica* and its suspected species. All the suspected species identified in this study were not *H. nipponica*.

Key words: *Hirudo nipponica*; *COI* gene; species identification

日本医蛭(*Hirudo nipponia*)俗称水蛭、日本医水蛭或稻田医蛭等,隶属于医蛭形亚目(Hirudini-formes Caballero)、医蛭科(Hirudinidae Whitman)、医蛭属(*Hirudo*),在我国众多省份均有野生资源分布^[1],其人工养殖地主要集中在山东、重庆、广东以及东北各省市^[1-2].日本医蛭是《中华人民共和国药典》收录的唯一的吸血蛭,在我国最早被应用在断指再植、皮肤撕脱伤和解除皮瓣瘀血的研究中^[3-4];又因其咽周体含有高效抗凝血物质(水蛭素和肝素),被作为心脑血管疾病药物的主要动物原材料.虽然近年来日本医蛭人工养殖与繁育取得了一定的突破^[2, 5],但人工养殖产量依然不能满足市场的需求,其药材伪混现象严重,常以外形和习性相似的其他蛭类冒充日本医蛭,替代品以菲牛蛭为主^[6-7].因此对基于 *COI* 的日本医蛭疑似种进行鉴定,有利于以日本医蛭为原料的中成药的基原保证.

《中国动物志·环节动物门·蛭纲》记录:不同蛭类的种间鉴定主要通过背部纵纹的颜色、数量和形状,雌雄生殖孔所在位置以及阴道囊的形状等来区分^[1].但其外部形态和体色易受环境影响,因此传统鉴定方法具有不确定性,而分子鉴定具有快速、准确等特点,在蛭类的鉴定中已有报道,且多用于蛭类种间遗传距离和遗传多样性分析^[8-10].*COI* 是动物线粒体氧化呼吸链中的重要基因,在蛭类种群遗传结构和分子系统发育等研究方面应用广泛.已有学者应用 *COI* 序列分析了日本医蛭、宽体金线蛭、尖细金线蛭、光润金线蛭、日本山蛭、菲牛蛭、棒纹牛蛭、八目石蛭等物种的亲缘关系^[11-12].Borda 等^[13-14]采用 *COI* 序列研究《中国动物志·环节动物门·蛭纲》中多个物种,发现传统分类与系统分类进化结果存在一定的差异.目前,蛭类 *COI* 序列的研究主要集中在对已知蛭类品种亲缘关系的分析上,关于日本医蛭疑似种的鉴定尚无研究报道.现以市场上流通的日本医蛭疑似种为研究对象,测定 *COI* 序列,比较其序列特征并检验其利用 *COI* 序列鉴别日本医蛭与其疑似种的可行性.

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验组样品购买于山东省鱼台县王庙镇水蛭市场,根据其背部形态分为 10 类,每一类至少 5 个样本完全一致,依次编号为 YS1~YS10(图 1),对照组日本医蛭(CK, 5 个样本)为重庆市药物种植研究所养殖,共计 11 类.根据背部形态选取每类 1 尾水蛭进行解剖取肌肉组织,将组织样品附着的血液冲洗干净,置于-80℃冰箱中保存备用,其余样品备用.

1.2 样本 DNA 提取、PCR 扩增及测序

1.2.1 DNA 提取和目的基因扩增

采用天根海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA,并对线粒体 *COI* 基因片段进行 PCR 扩增.使用的上游引物 LCO1490(5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3')和下游引物 HCO2198(5'-TAAACTTCAGGGTGACCCAAAAAATCA-3')由北京天一辉远生物科技有限公司合成^[15].PCR 扩增的反应体系为 40 μL,包括 20 μL 2x EasyTaq PCR SuperMix,上、下游引物各 1.5 μL, DNA 模板 1 μL, 16 μL ddH₂O.反应条件:95℃预变性 1 min; 95℃变性 1 min, 45℃退火 1.5 min, 72℃延伸 1.5 min, 5 个循环; 95℃变性 1 min, 50℃退火 1.5 min, 72℃延伸 1 min, 35 个循环; 72℃总延伸 5 min. PCR 产物用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测,结果如图 2.

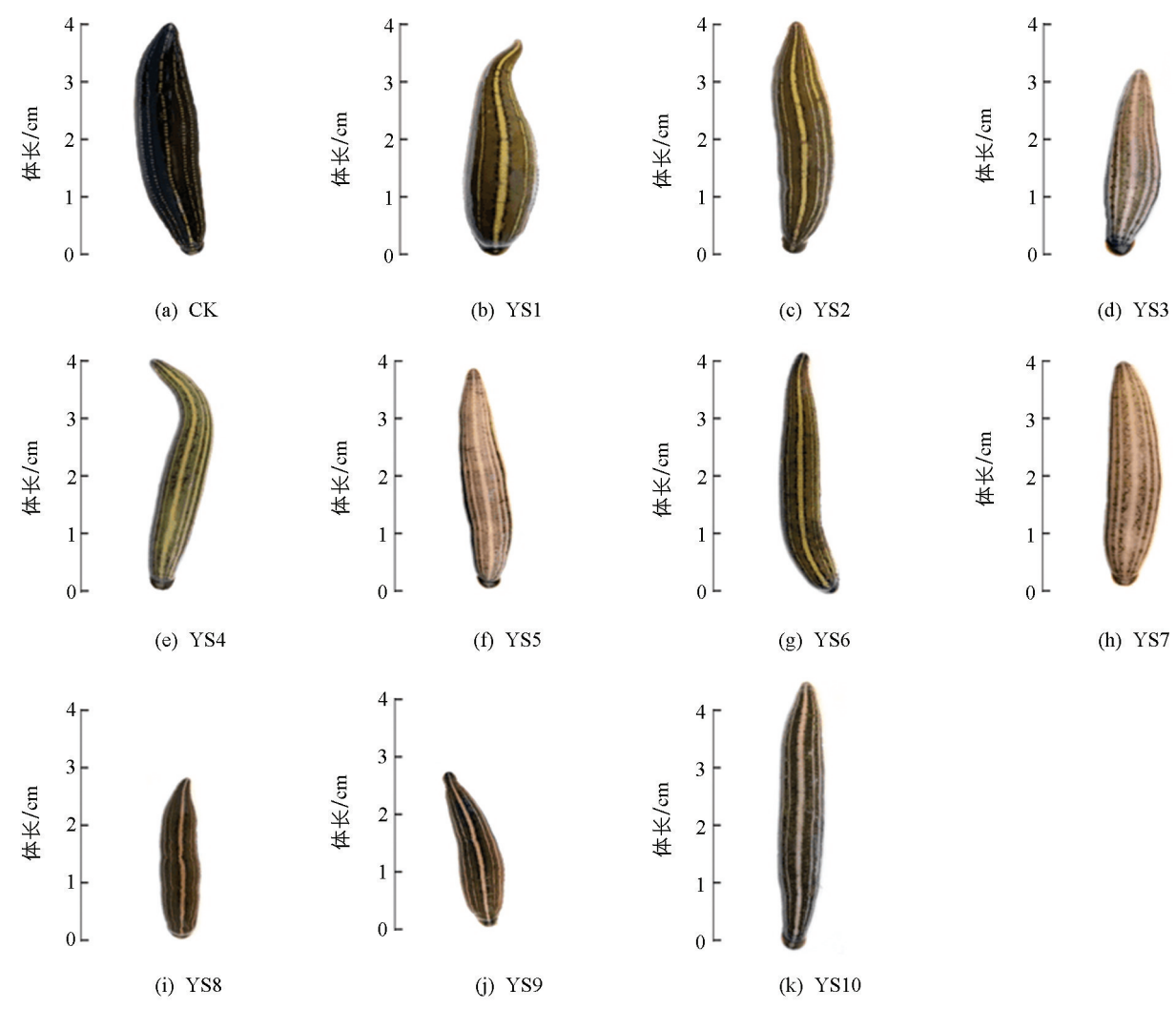


图 1 日本医蛭及疑似种背部图

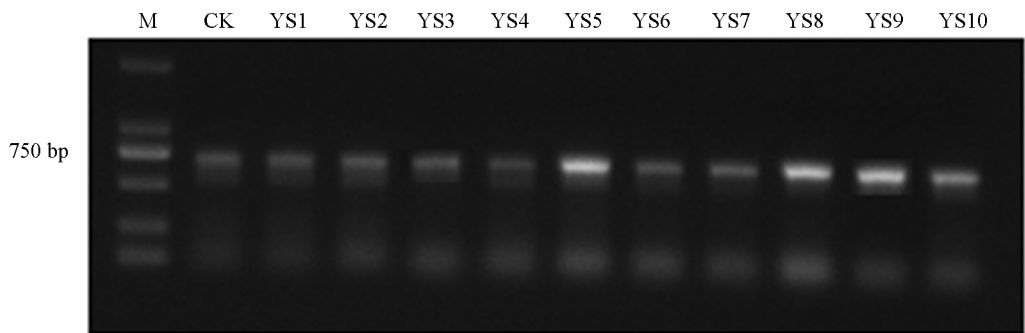


图 2 11 种蛭类 COI-PCR 扩增图

1. 2. 2 测序结果

测序结果采用 DNASTar 7 软件中的 SeqMan 进行序列拼接，拼接获得单个个体完整的序列后，利用 MAGE 5.0 软件的 Align 功能进行多序列比对，将比对结果保存为 .meg 文件构建 NJ(邻位相连法: neighbor_joining) 和 ML(最大似然法: maximum likelihood) 进化树。对照组 COI 基因序列登录号为 GQ368749.1。

1. 3 不同种蛭类的抗凝血酶活性测试

根据 COI 基因的鉴定结果，抗凝血酶活性试验分为 CK 组、YS7 组以及其他组(YS1~YS10, 除 YS7)，每组样本总质量 2 g 以上，3 次重复，参照《中华人民共和国药典》中水蛭抗凝血酶活性的方法进行测试^[16]。

2 结果与分析

2.1 11 种蛭类 *COI* 序列分析

11 种蛭类的 *COI* 基因碱基组成如表 1, CK 的 *COI* 序列长度为 680 bp, 碱基 A,T,C,G 质量分数分别为 35.1%,28.7%,16.2%和 20.0%, 碱基 AT 质量分数为 63.8%, YS1~YS10 的碱基 A,T,C,G 质量分数分别为 39.8%,29.4%,15.2%和 14.9%, 碱基 AT 质量分数为 69.2%. 在所测的种类中 CK 的 AT 质量分数最低, 序列最短, YS5 和 YS9 序列长度为 681 bp, 其余种序列长度均为 684 bp. 在所测的 11 种蛭类 *COI* 序列中有 569 个一致位点, 84 个变异位点, 其中 40 个位点发生了碱基转换, 44 个位点发生了碱基颠换, 转换主要发生在 AG 之间, 颠换主要发生在 AT 之间, 转换与颠换的比值为 0.90(表 2).

表 1 11 类蛭类 *COI* 基因的碱基组成

物种	碱基组成/%				AT 质量分数/	序列长度/
	A	T	C	G	%	bp
CK	35.1	28.7	16.2	20.0	63.8	680
YS1	39.8	29.2	15.9	15.1	69.0	684
YS2	39.8	29.2	15.9	15.1	69.0	684
YS3	39.8	29.4	15.9	14.9	69.2	684
YS4	39.8	29.5	15.8	14.9	69.3	684
YS5	39.6	29.4	16.2	14.8	69.0	681
YS6	39.8	29.5	15.8	14.9	69.3	684
YS7	39.5	29.2	16.2	15.1	68.7	684
YS8	39.9	29.4	15.9	14.8	69.3	684
YS9	40.2	29.5	15.7	14.5	69.7	681
YS10	39.9	29.5	15.8	14.8	69.4	684
平均值	39.8	29.4	15.2	14.9	69.2	683

注: 平均值为 YS1~YS10 的平均值.

表 2 *COI* 序列碱基替换

密码子位点	一致位点	转换位点	颠换位点	<i>R</i>
第一位点/个	198	15	5	2.93
第二位点/个	156	24	38	0.63
第三位点/个	214	2	2	0.78
平均/个	569	40	44	0.90

注: *R* 为转换位点与颠换位点全数据的比值.

2.2 遗传距离与系统发育

11 种蛭类的平均遗传距离(表 3)为 0.038, 日本医蛭与被测试的 10 种蛭类的遗传距离均大于 0.159. YS4,YS5,YS6,YS8 与 YS3 的遗传距离均为 0.001, YS1 与 YS2 的遗传距离为 0.003, YS9 与 YS10 的遗传距离为 0.000. 结合 NJ 和 ML 系统发育树(图 3,图 4)YS3,YS4,YS5,YS6,YS8 聚为一大类, YS1,YS2,YS9,YS10 聚为一类, 对照组日本医蛭均不与疑似种聚为一类. 除 YS7 外, YS1~YS10 的平均种间遗传距离为 0.007, 小于 0.020, 说明这 9 个物种属于同一物种. CK 与 YS1~YS10(不包括 YS7)之间的平均种间遗传距离为 0.162, YS7 与 YS1~YS10 之间的平均遗传距离为 0.025, 是 YS1~

YS10 平均种内遗传距离的 3.749 倍.

表 3 11 种蛭类的 *COI* 基因的遗传距离

	CK	YS1	YS2	YS3	YS4	YS5	YS6	YS7	YS8	YS9	YS10
CK	—										
YS1	0.166										
YS2	0.163	0.003									
YS3	0.160	0.012	0.009								
YS4	0.160	0.013	0.010	0.001							
YS5	0.161	0.012	0.009	0.001	0.003						
YS6	0.162	0.013	0.010	0.001	0.003	0.003					
YS7	0.159	0.025	0.022	0.025	0.026	0.025	0.026				
YS8	0.159	0.013	0.010	0.001	0.003	0.003	0.003	0.026			
YS9	0.164	0.012	0.009	0.009	0.007	0.010	0.010	0.024	0.010		
YS10	0.163	0.012	0.009	0.009	0.007	0.010	0.010	0.025	0.010	0.000	—

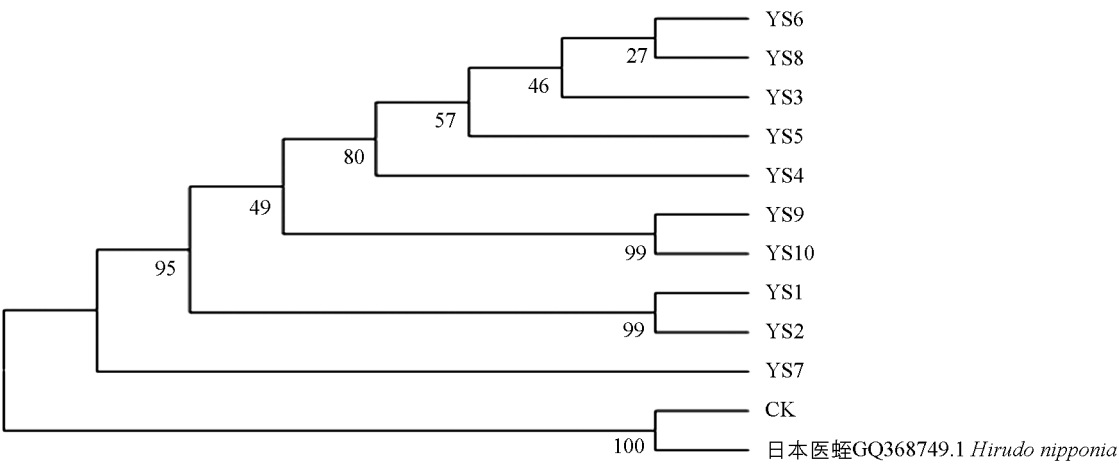


图 3 基于 *COI* 基因序列构建的 NJ 系统进化树

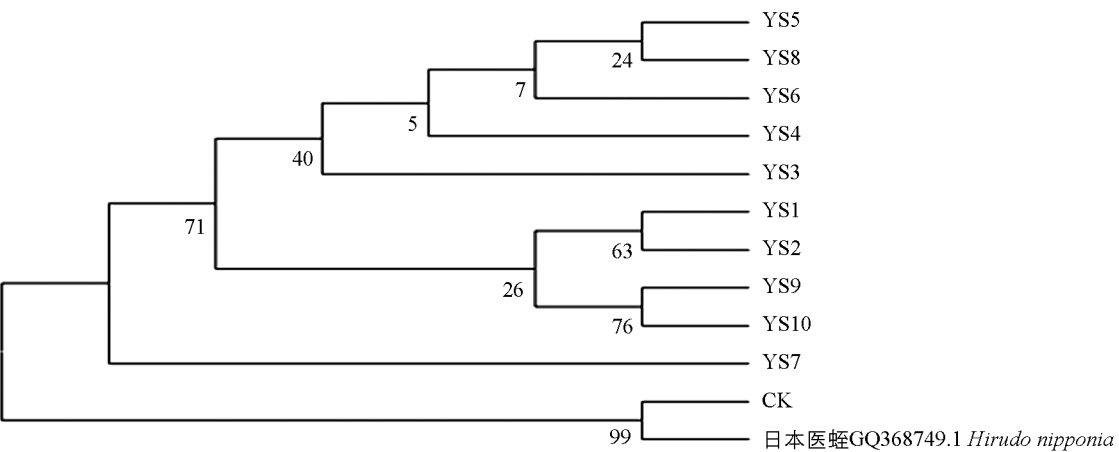


图 4 基于 *COI* 基因序列构建的 ML 系统进化树

2.3 不同种蛭类的抗凝血酶活性

分别对养殖的日本医蛭类、鉴定的 YS7 类以及其他类吸血蛭进行抗凝血活性测定,结果显示,

YS7 类和其他类吸血蛭均有较强的抗凝血酶活性(图 5)。

3 讨论

水蛭的鉴定主要有基于其形态特征和 DNA 分子鉴定两种方式,形态特征鉴定主要根据其外部形态和生殖器官的形状来区分^[17-19],而 DNA 分子鉴定主要是 PCR 技术和 DNA 条形码技术^[20]。目前基于 *COI* 序列的 DNA 条形码技术已被广泛应用于药用水蛭的分类以及水蛭相关中成药的基原鉴定中^[21]。相较于传统的形态特征鉴定方法,基于 *COI* 序列的 DNA 条形码技术具有快速准确等优点,能有效避免因为形态的相似性造成的误认。

本试验中被测序的 11 种水蛭,其 *COI* 序列长度为 680~684 bp,碱基 AT 质量分数在 63.8%~69.7% 之间,与徐云玲等^[11]的研究结果类似。本试验所测样品碱基均存在明显的偏好性,且 YS1~YS10 的 AT 质量分数明显高于 CK(日本医蛭)的 AT 质量分数。李咏梅等^[22]认为在动物线粒体 DNA 的变异中,近亲种间更容易频繁发生转换,而颠换则更容易发生在远缘种间。本试验结果转换与颠换的比值为 0.90,说明本试验所鉴定的水蛭品种与日本医蛭亲缘关系较远。根据软件 MEGA 5.0 计算 11 种蛭类种间遗传距离,在 ML 和 NJ 系统进化树中 CK 与 YS7 遗传距离最近,所测其他疑似种则聚为一大类,其平均种间遗传距离为 $0.007 < 0.020$,Hebert 等^[23]认为鉴定最小种间遗传距离为 0.020,说明这 9 个样品属于同一物种。CK 与 YS1~YS10(不包括 YS7)之间的平均种间遗传距离为 0.162。YS7 与 YS1~YS10 之间的平均遗传距离为 0.025,是 YS1~YS10 平均种内遗传距离的 3.749 倍,并没有达到 10 倍以上。综上所述,被测的 11 种水蛭中,CK 与疑似种的亲缘关系较远,YS7 为一物种,另外 9 种蛭类为同一物种。

测试的疑似种均来源于山东鱼台县,其外部形态与丽医蛭(只分布在浙江省)差异较大,可以断定所测试的疑似种并不是丽医蛭,且根据本文的结果可以判定为 2 个新种。《中国动物志·环节动物门·蛭纲》中记载了我国蛭类共有 93 种,其中吸血蛭有日本医蛭、丽医蛭、菲牛蛭、南京牛蛭、湖北牛蛭、棒纹牛蛭、天目山蛭等。而杨谋等^[7]认为日本医蛭是传统中医使用品种和医学古典中记录的品种,加之日本医蛭的抗凝血活性远远高于非吸血蛭^[24-26],因此具有较高的生态和经济价值。但由于我国耕作方式的改变使连续性水体成为了季节性水体,严重影响了日本医蛭的生存环境^[7],加之历史上为发展农业对稻田水域日本医蛭的大量捕杀^[27],以及现有养殖模式相对落后等因素,导致其资源量远不能满足市场需求。而在山东鱼台境内 YS1~YS10 的野生资源相对丰富,且抗凝血酶活性较强,表明了这 2 种水蛭具有较高的潜在利用价值,可作为日本医蛭的补充替代品种进行深入研究。

4 结论

基于 *COI* 序列的 DNA 条形码技术可以很好地鉴定正品日本医蛭与其疑似种,本试验鉴定的疑似种均不是日本医蛭。

参考文献:

[1] 杨潼. 中国动物志·环节动物门·蛭纲 [M]. 北京:科学出版社,1996.

[2] 余米,刘嘉,周梦,等. 日本医蛭生境水质及生物学特性初探 [J]. 中药材,2019,42(12): 2782-2785.

[3] 彭建强,陈振光,余国荣,等. 医蛭吸血法在断指再植及皮肤撕脱伤的应用 [J]. 修复重建外科杂志,1988,2(4): 11-13.

[4] 彭建强,陈振光,蔡林,等. 应用医蛭解除皮瓣瘀血的实验研究 [J]. 中华整形烧伤外科杂志,1990,6(2): 118-120, 159, 163.

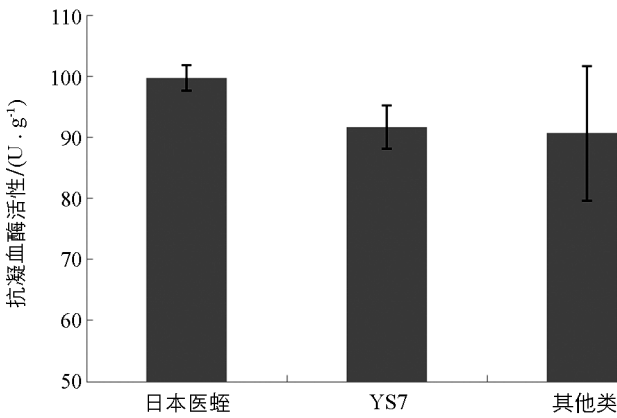


图 5 3 种蛭类的抗凝血酶活性

- [5] 余米, 刘嘉, 蒲德成, 等. 不同体质量规格的日本医蛭适宜越冬密度与繁殖性能研究 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2021, 43(2): 47-52.
- [6] 游华建, 鲁增辉, 张植纬, 等. 药用水蛭及其代用品的人工养殖进展 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2017(19): 86-89.
- [7] 杨谋, 张选杰, 张娇, 等. 水蛭的药用价值和养殖现状 [J]. 当代畜牧, 2018(18): 58-60.
- [8] 刘飞. 蚂蟥生长繁殖习性及其遗传多样性分子标记研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2008.
- [9] 姜爱兰, 王信海, 丁辰龙, 等. 宽体金线蛭 5 个地理群体遗传多样性的 RAPD 分析及生长指标的比较研究 [J]. 江西农业学报, 2018, 30(10): 7-12.
- [10] 岳丽佳, 熊良伟, 王帅兵, 等. 基于线粒体 Cytb 序列的 3 个宽体金线蛭群体遗传多样性分析 [J]. 上海海洋大学学报, 2020, 29(1): 9-16.
- [11] 徐云玲, 聂晶, 肖凌. 6 种水蛭的 COI、12S rRNA 和 16S rRNA 基因及分子进化分析 [J]. 生物学杂志, 2013, 30(6): 10-13.
- [12] 徐云玲, 聂晶. 水蛭及其近缘物种的 rDNA-ITS 序列分析 [J]. 中药材, 2013, 36(6): 874-879.
- [13] BORDA E, SIDDALL M E. Arhynchobdellida(Annelida: Oligochaeta; Hirudinida): Phylogenetic Relationships and Evolution [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2004, 30(1): 213-225.
- [14] BORDA E, OCEGUERA-FIGUEROA A, SIDDALL M E. On the Classification, Evolution and Biogeography of Terrestrial Haemadipsoid Leeches (Hirudinida: Arhynchobdellida: Hirudiniformes) [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2008, 46(1): 142-154.
- [15] 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.
- [16] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.
- [17] 杨潼, 莫潇, 王德斌. 洞穴吸血陆蛭一新种在中国云南省西陲的发现 [J]. 动物分类学报, 2009, 34(1): 125-129.
- [18] 王德斌, 杨潼. 中国牛蛭属一新种记述(吻蛭目, 医蛭科) [J]. 动物分类学报, 2008, 33(2): 344-347.
- [19] 马燕, 游华建, 李晋, 等. 宽体金线蛭生殖系统形态结构与胚胎发育 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2017, 39(7): 64-71.
- [20] 卢富华, 李明玥, 魏妙洁, 等. 水蛭分子鉴定方法的研究进展 [J]. 世界中医药, 2020, 15(5): 670-676.
- [21] 朱晓泉, 胡恺恩, 邵鹏柱, 等. 脑心通胶囊中水蛭的特异性 DNA 鉴别 [J]. 中山大学学报(自然科学版), 2020, 59(1): 114-124.
- [22] 李咏梅, 陈秀荔, 赵永贞, 等. 钦州湾牡蛎线粒体 16S rRNA 和 COI 基因片段的序列变异分析 [J]. 广东海洋大学学报, 2009, 29(3): 11-18.
- [23] HEBERT P D N, RATNASINGHAM S, DEWAARD J R. Barcoding Animal Life: Cytochrome c Oxidase Subunit 1 Divergences among Closely Related Species [J]. Proceedings Biological Sciences, 2003, 270(Suppl 1): S96-S99.
- [24] 张卫, 张瑞贤, 李健, 等. 中药水蛭品种考证及资源可持续利用发展探讨 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(6): 914-918.
- [25] 吴志军, 张灵霞, 于立华. 四种不同品种水蛭生物活性的研究与比较 [J]. 中成药, 2006, 28(2): 232-234.
- [26] 李军, 于翔, 张健, 等. 4 种水蛭粗提物抗凝活性及冻存时间对菲牛蛭抗凝活性影响 [J]. 水产科学, 2014, 33(9): 591-593.
- [27] 宋大祥, 冯钟琪. 蚂蟥 [M]. 北京: 科学出版社, 1978.

责任编辑 周仁惠