



“十三五”国家重点图书出版规划项目

国家新闻出版改革发展项目

国家出版基金项目

国家“重大新药创制”科技重大专项项目

国家自然科学基金项目

中国药用动物 DNA条形码研究

Research on DNA Barcode of
Chinese Medicinal Animals

主 编
黄璐琦
李军德



海峡出版发行集团

THE STRAITS PUBLISHING & DISTRIBUTING GROUP

福建科学技术出版社

FUJIAN SCIENCE & TECHNOLOGY PUBLISHING HOUSE



“十三五”国家重点图书出版规划项目
国家新闻出版改革发展项目
国家出版基金项目
国家“重大新药创制”科技重大专项项目
国家自然科学基金项目

Research on DNA Barcode of
Chinese Medicinal Animals

中国药用动物

DNA条形码研究

主 编
黄璐琦
李军德

■ 环境保护部『生物多样性保护专项』支持
■ 中央本级重大增减支『名贵中药资源可持续利用能力建设专项』支持



海峡出版发行集团

福建科学技术出版社
FUJIAN SCIENCE & TECHNOLOGY PUBLISHING HOUSE

图书在版编目 (CIP) 数据

中国药用动物DNA条形码研究 / 黄璐琦, 李军德
主编. — 福州: 福建科学技术出版社, 2016. 11
(中国中药资源大典)
ISBN 978-7-5335-5173-5

I. ①中… II. ①黄… ②李… III. ①药用动物-脱
氧核糖核酸-条形码-研究-中国 IV. ①Q959.9

中国版本图书馆CIP数据核字 (2016) 第251361号

书 名 中国药用动物DNA条形码研究
中国中药资源大典
主 编 黄璐琦 李军德
出版发行 海峡出版发行集团
福建科学技术出版社
社 址 福州市东水路76号 (邮编350001)
网 址 www.fjstp.com
经 销 福建新华发行 (集团) 有限责任公司
印 刷 福州德安彩色印刷有限公司
开 本 889毫米×1194毫米 1/16
印 张 27
图 文 432码
版 次 2016年11月第1版
印 次 2016年11月第1次印刷
书 号 ISBN 978-7-5335-5173-5
定 价 298.00元

书中如有印装质量问题, 可直接向本社调换

编委会

主 编 黄璐琦 李军德

副 主 编 刘春生 晁 志 袁 媛

国锦林 刘 越 陈仕江

主要编著人员（按姓氏笔画排序）

王 茜	王艺璇	王玉贤	刘 杰	刘 越	刘春生
刘晓帆	孙佳明	李 力	李军德	杨瑶珺	吴立洁
张 亮	张 恬	陈 康	陈仕江	赵 晶	国锦林
郑 琪	金 艳	侯飞侠	袁 媛	晁 志	徐 佳
殷幼平	唐仕欢	黄璐琦	梁镇标	彭 成	童雨茹
谢佳燕	廖 婧	薛 塍	戴 待		

项目研究单位

主持单位

中国中医科学院中药资源中心

承担单位（按内容先后顺序排序）

南方医科大学

广西药用植物园

长春中医药大学

北京中医药大学

成都中医药大学

武汉轻工大学生物与制药工程学院

中国中医科学院中药资源中心

中央民族大学

重庆市中药研究院

序言

药用动物暨动物药材是我国传统医药学的重要组成部分，有着悠久的历史。临床上被广泛用于治疗疑难杂症、急重病症等。动物药材特别是斑蝥、桑螵蛸、海马、水蛭、龟甲、虻虫等，为多来源品种并且较为混乱；加之动物类药材大部分为贵重紧缺药材，临床上多以粉末等形式入药，给动物药材的准确鉴定带来了极大的困难。传统中药鉴定技术，主要是经验性的性状鉴别，虽然简便、快速，但对多来源药材、破碎药材、粉末药材以及中成药的鉴定有一定局限性。

随着现代科学技术发展，分子鉴定、显微鉴定、红外光谱、紫外吸收光谱、薄层色谱等方法也在动物药材的鉴定中起到了重要作用，其中分子鉴定具有准确性高、重现性好、所需检样量少，且不受样品形态的限制等特点，其不仅能对动物药材的整体及破碎部分的器官、组织进行准确鉴定，而且还可以对以动物粉末、体液、分泌物和排泄物入药的动物药材及其制剂进行有效的真伪鉴定、纯度检查与质量评价。尤其是蛇类药材的分子鉴别方法成为 2010 年版《中华人民共和国药典》（以下简称《中国药典》）收录的第一个中药分子鉴别方法，标志着中药分子鉴定技术已从实验室研究进入实际应用。

目前针对中药鉴定中存在的各种问题，分别涌现了一批特色迥异的中药材 DNA 分子鉴定技术，如 DNA 条形码技术、限制性片段长度多态性技术（RFLP）、随机扩增多态 DNA 技术（RAPD）、随机引物扩增技术

(AP-PCR)、基因芯片技术等。尽管 DNA 条形码技术存在部分物种通用引物难以扩增、近缘物种难以鉴别、序列易出现杂合等现象,但因其只需要几条通用引物即可实现大部分物种的鉴别,且易于标准化、重复性好,故而仍然给动物药材鉴定带来了新的蓬勃生机。

为配合《中国药用动物志》(第2版)的编撰工作,2010年8月,由中国中医科学院中药资源中心组织全国10余家大专院校科研院所,在开放研究项目“中国药用动物 DNA 条形码研究”的资助下,率先启动并开展中国药用动物暨动物药材 DNA 条形码研究,为了规范、统一实验研究,项目组制定了统一的药用动物 DNA 条形码实验样品采(收)集规范、实验研究基本路径和实施方案。该项目还先后获得国家“重大新药创制”科技重大专项[综合性中药新药研究开发技术大平台——中药资源评价和开发平台(2009ZX09301-005-03)]和国家自然科学基金委员会项目[虻科(Tabanidae)药用虻虫 mtCO I 基因的 DNA 条形码研究(81073000)]的资助。在5年多时间里,项目组的专家与同仁齐心努力,顺利完成了研究工作。项目涉及蛇类、蛤蚧类、哈蟆油类、龟甲类、水蛭类、海马类、鮑属类、虻虫类、桑螵蛸类、斑蝥类、鹿茸类、羚羊角类等十二大类正品及其伪混品之 mtCO I 和(或) Cyt b DNA 条形码鉴定研究,以期为动物药材的准确、快速鉴定奠定理论与技术基础。

《中国药用动物 DNA 条形码研究》即为该项目研究成果的总结。书中首次系统地介绍了药用动物暨动物药材 DNA 条形码鉴定技术的原理、方法、技术规范及其应用。总论部分对 DNA 条形码概念、DNA 条形码技术操作流程、动物药材分子鉴定、药用动物 DNA 条形码技术的缺陷及争议等内容进行了详细介绍;各论为十二大类药用动物暨动物药材研究之详细记述,每一大类包括概述、物种信息、实验研究、CO I 条形码序列等内容。项目研究涉及药用动物 77 种,采集实验样品 2401 份(号),彩图 200 余幅。获得正品药用动物暨动物药材 DNA 条形码序列 57 条,伪混品

DNA 条形码序列 88 条，针对每一大类动物药材制定了 DNA 条形码鉴定技术标准操作规程（SOP）。

本书在编撰过程中，参考了有关专业书籍和文献，对所引述的作者致以崇高的敬意和感谢。另外，虽然我们尽最大努力对实验数据进行了反复的核对与验证，但因水平和经验所限，一定会存在一些不足或差错，恳请国内外相关领域专家、学者、读者不吝赐教，并提出批评与建议。

A large, stylized handwritten signature in black ink, likely belonging to the author or a reviewer, positioned centrally on the page.

2016 年 6 月 28 日

目 录

■ 总 论

DNA 条形码在药用动物鉴定中的应用	1
第一章 DNA 条形码概论	2
第二章 DNA 条形码技术操作流程	11
第三章 动物药材分子鉴定	26
第四章 药用动物 DNA 条形码技术的缺陷及争议	37

■ 各 论

代表性药用动物 DNA 条形码研究成果	39
第五章 蛇类	40
第六章 蛤蚧类	68
第七章 哈蟆油类	87
第八章 龟甲类	130
第九章 水蛭类	170
第十章 海马类	197
第十一章 鮑属类	230
第十二章 虻虫类	238
第十三章 桑螵蛸类	266
第十四章 斑蝥类	298
第十五章 鹿茸类	314
第十六章 羚羊角类	331
附 录	349
相关推荐论文汇编	349
药用动物 DNA 条形码实验样品采(收)集规范	386
NCBI 使用教程	389
构建生物进化树的常用软件及方法	397
DNA 琼脂糖凝胶电泳操作规程	406
本书常用术语中英文对照表	410
药用动物中文名索引	412
药用动物拉丁学名索引	415
主要参考文献	417



总论

DNA 条形码
在药用动物鉴定中的
应用

第一章 DNA 条形码概论

一、概述

（一）条形码、DNA 条形码

条形码 (barcode) 是将宽度不等的多个黑条和空白, 按照一定的编码规则排列, 用以表达一组信息的图形标识符。常见条形码是由反射率相差很大的黑条 (简称“条”) 和白条 (简称“空”) 排成的平行线图案, 用于条形码识读设备的扫描识读。在经济全球化、信息化、生活国际化、文化本土化的资讯社会到来之际, 条形码与条形码技术及各种应用系统起源于 20 世纪 40 年代, 研究于 60 年代, 应用于 70 年代, 普及于 80 年代, 引起了世界流通领域大变革。条形码技术风靡全球, 作为一种可印制的计算机语言, 未来学家将其称为“计算机文化”。

商品条形码是由一组规则排列的条、空及其对应字符组成的标识, 用以表示一定商品信息的符号。其图案下方对应字符由一组阿拉伯数字组成, 供人们直接识读或通过键盘向计算机输入数据使用。通常由 13 个数字排列组合, 最后 1 位校验码用来校验商品条形码中左起第 1~12 数字代码的正确性; 每一种排列对应一种特点的商品, 以此来区分各式各样的商品。条形码在商品流通、图书管理、邮政管理、银行系统等许多领域都得到广泛的应用。

全球生物种类数以亿万计, 除了传统技术即依据大量形态学、生态学、遗传学等资料, 对物种进行鉴定和分类外, 借鉴商品条形码技术, 一种高效、准确、可靠的自动扫描并采集数据信息, 进而对物种进行鉴定和分类的现代新技术——DNA 条形码技术 (DNA barcoding technique) 雏形由此诞生了。在生物分类学上, 根据对一个统一的目标基因 DNA (deoxyribonucleic acid, 脱氧核糖核酸) 序列的分析来完成物种鉴定的过程被称为 DNA 条形码编码过程。国际生命条形码协会对 DNA 条形码的定义为: 一段短的能够高效鉴定物种的 DNA 标准区域。而 DNA 条形码技术是利用一个标准的、有足够变异的、易扩增的、相对较短的 DNA 片段自身在物种种内的特异性和种间的多样性而创建的一种新的生物身份识别系统, 它可以对物种进行快速、准确的自动鉴定。简而言之, DNA 条形码技术之关键是对一个或一些相关基因进行大范围扫描, 进而鉴定某个未知的物种或者发现新物种。这种新兴的生物分类学技术已引起越来越多生物学家的关注, 它代表了生物分类学研究的新方向。除生物分类学领域外, DNA 条形码技术在医药、农林、食品、检验检疫、生态、环境等诸多领域也都有广泛应用。

(二) 基因、基因组与线粒体基因组

基因(gene)是指DNA或RNA(ribonucleic acid,核糖核酸)分子中具有特定遗传功能的一段序列,主要位于染色体上。此外,细菌的质粒,真核生物的叶绿体、线粒体等细胞器也含有一定的DNA序列,其中大部分是具有遗传功能的基因,这些位于染色体外的DNA称为染色体外遗传物质。

基因组(genome)一词最早出现于1922年,是指单倍体细胞中所含整套染色体,基因组被定义为整套染色体中的全部基因。随着对不同生物基因组DNA测序,人们发现,对基因组这个名词需要更精确的定义。现在一般认为,基因组是指细胞或生物体全套染色体中所有的DNA,包括所有基因和基因之间的间隔序列。

原核生物基因组就是其细胞内构成染色体的DNA分子,真核生物基因组是指单倍体细胞核内整套染色体所含有的DNA分子。除了核基因组外,真核细胞内还有细胞器基因组,即动物细胞、植物细胞的线粒体基因组和植物细胞的叶绿体基因组。目前已经完成了多种模式生物如大肠杆菌、酵母菌、流感嗜血杆菌、秀丽线虫、果蝇、小鼠及拟南芥等基因组测序工作,基本阐明了它们基因组的结构、功能及生物进化关系间普遍规律,为研究高等生物,尤其是人类生、老、病、死提供了生物模式。2003年人类基因组测序工作也宣告完成。

线粒体(mitochondrion)是真核细胞内的一种重要和独特的细胞器,它是细胞内的动力站,提供了细胞生命活动中需要的约80%的能量,是细胞进行生物氧化和能量转换的主要场所,可谓“动力工厂(power house)”。正常细胞中含有1000~2000个线粒体,精子的线粒体较少,约有25个,哺乳动物成熟的红细胞中无线粒体。1963年发现线粒体中存在DNA,线粒体是动物细胞核外唯一含有DNA的细胞器。

线粒体基因组(mitochondrial genome)是指线粒体内的所有遗传物质。线粒体是真核细胞内能通过半自主复制进行繁殖的细胞器。每个线粒体都有多个自身的DNA分子,即线粒体DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)。所有mtDNA分子均为闭合双链环状分子,裸露不与组蛋白结合,分散在线粒体基质中。一般来说,mtDNA一条为重链(H),一条为轻链(L)。不同种属生物mtDNA大小不一,动物mtDNA较小,酵母线粒体基因组较大,植物线粒体DNA的大小差异很大,一般不小于100kb。

线粒体基因组包含多种基因或基因簇,主要有rRNA基因、tRNA基因、ATP酶基因和细胞色素氧化酶基因等。线粒体基因组只能编码部分所需的蛋白质,许多重要的多亚基蛋白质复合物由核基因组与线粒体基因组各自编码部分亚基。例如,细胞色素C氧化酶(mitochondrial cytochrome C oxidase)的各亚基由2个基因组分别编码的,细胞色素bc₁复合物中的一个亚基来源于线粒体基因组,另6个亚基来源于核基因组。

线粒体基因组编码呼吸链中的13种蛋白质亚基与核基因编码的亚基一起,共同构成了呼吸链上的电子传递体蛋白质,其中有复合体I的7个亚基,复合体III的1个亚基,复合体IV的3个亚基,复合体V的2个亚基(ATP酶6和ATP酶8)。但线粒体基因组自身编码的蛋白质只占呼吸链组分的一小部分,大部分仍由核基因编码,在细胞质内合成后运输到线粒体内发挥作用。

人类 mtDNA 为 16569bp, 有 37 个基因, 其中 2 个 rRNA 基因 (12S 和 16S), 22 个 tRNA 基因和 13 个蛋白质基因, tRNA 基因位于编码 rRNA 和蛋白质基因之间。人类 mtDNA 中的蛋白质编码基因与酵母相同的有细胞色素 b (Cyt b)、细胞色素氧化酶 (cytochrome oxidase) 的 3 个亚基, ATP 酶的 1 个亚基; 与酵母不同的有哺乳动物线粒体编码 NADH (reduced form of nicotinamide-adenine dinucleotide, 还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸、还原型辅酶 I) 脱氢酶的 7 个亚基 (或相关蛋白质), 其中 5 个阅读框缺乏标准的终止密码 (终止密码为 AGA 或 AGG, 在标准的遗传密码表中, 这 2 个密码编码精氨酸)。

动物 mtDNA 基因排列紧密, 在哺乳动物线粒体基因组中, 结构尤其紧密, 不存在内含子, 却存在着重叠基因, 大部分序列在编码区。只有 D 环是一个非编码区, 但这一区域与 DNA 复制起始有关。不同种类动物 mtDNA 结构在细节方面存在一定差异, 但其共同的特征是分子较小, 基因排列紧密。

虽然 mtDNA 基因组是存在于细胞核染色体之外的基因组, 也没有与组蛋白组装而成的染色质结构。但由于其具有遗传上的半自主性, 因此具有自我复制、转录和编码蛋白质等物质的功能。

mtDNA 的突变与衰老有关。研究表明, mtDNA 的变化随着年龄增加而增加, 从而导致老年退化性疾病, 如多种神经性病变和肌肉疾病等。mtDNA 的突变率比核 DNA 高 5~10 倍。可能原因是: ① mtDNA 缺少组蛋白的保护。②线粒体内 DNA 修复机制很少。③线粒体内进行着大量的生物氧化过程, 所产生的自由基对其 DNA 有损伤作用。mtDNA 的变异有点突变、缺失和由于核 DNA 缺陷引发的 mtDNA 缺失或数量减少等类型。这些变异都能以细胞质遗传的方式传递到子代。

二、DNA 条形码发展历程

2002 年, Tautz 等提出利用 DNA 序列作为生物分类系统的主要平台, 即 DNA 分类学。2003 年, 加拿大圭尔夫 (Guelph) 大学生物学家保罗·赫伯特 (Paul Hebert) 及其同事在《英国皇家学会学报 B 辑》上发表了一篇论文, 首先提出以某种基因的序列作为鉴定不同物种的“条码”, 他们所说这一基因即指线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 I (mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I, mtCO I) 基因, 其长度为 648bp。通过对此基因 DNA 序列进行分析, 能够在 DNA 水平上鉴定某个未知的物种或发现新种。保罗·赫伯特等对动物界包括脊椎动物和无脊椎动物共 11 门 13320 个物种的 mtCO I 基因序列进行比较分析, 除刺胞动物 *Cnidaria* 外, 98% 的物种遗传距离差异在种内为 0~2%, 种间平均可达到 11.3%, 据此提出可以用单一的小片段基因来代表物种, 作为物种的条形编码, 为全球生物编码。他们认为利用 mtCO I 基因从分子演化角度, 将提供一种快速、准确、可信的物种分类与鉴定方法。这种方法逐步发展起来并被研究者命名为 DNA 条形码技术。

2003 年, Alfred Sloan 基金会在美国冷泉港举办的两次小型研讨会上, 提出以自然历史博物馆为核心, 将 DNA 序列鉴定技术、物种收集机构的凭证标本和当前的林奈分类系统统一起来

的构想。该基金会于 2004 年在美国华盛顿哥伦比亚特区的国家自然历史博物馆举办了一个关于 DNA 条形码的大型研讨会，此次会议创立了“生命条形码联盟”（the consortium for the barcode of life, CBOL），大部分国家的自然历史博物馆、标本馆以及研究机构和私人机构等都加入了这个组织。

2004 年秋，美国国立生物技术信息中心（national center for biotechnology information，NCBI）与生命条形码联盟合作，宣布为标准 DNA 条形码序列及相关支持性数据提供检索服务。物种条形码的标准 DNA 序列及其相关数据将存档于 GenBank（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/taxonomyhome.html/>）（图 1-1）。在 CBOL 支持下，开展了一系列 DNA 条形码计划，包括所有鸟类的 All Birds Barcoding Initiative 计划、鱼类的 Fish Barcode of Life Initiative 计划、所有鳞翅目昆虫的 All Lepes Barcode of Life 计划，世界性入侵有害物种及脊椎动物鉴定也在积极研究与探索中。

2005 年 2 月，第一届全球 DNA 条形码会议在伦敦举行。大会对 DNA 条形码的分类概念与思想、

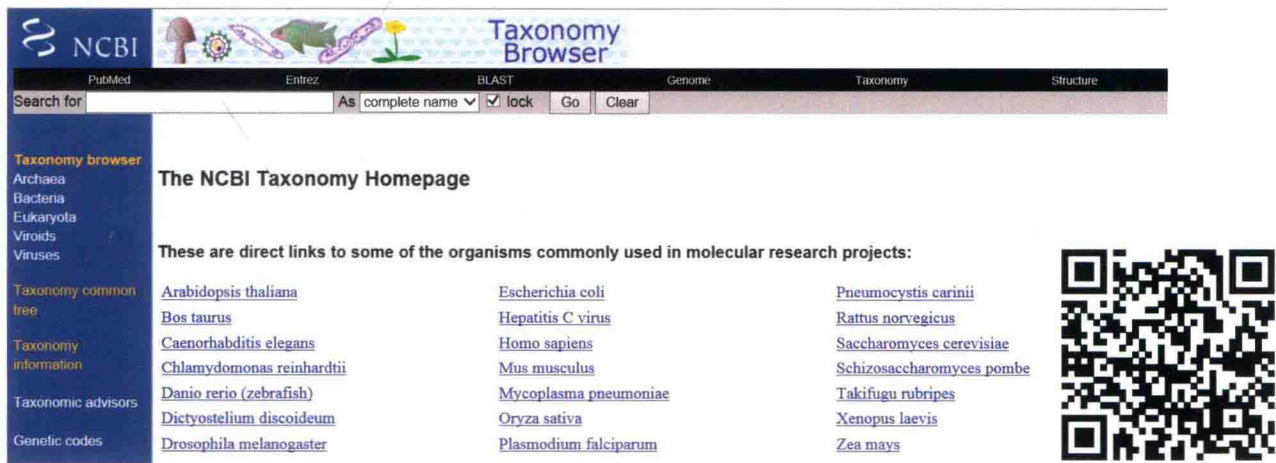


图 1-1 GenBank 网页与网址

实验技术的细节分析以及资料库建立等议题进行了讨论。目前，全球有很多不同项目在不同的类群中进行，最终目的是联合各个类群 DNA 条形码数据库组建一个全球生物 DNA 条形码数据库，此数据库将设置在 GenBank 中，是一个公众可以登陆的 DNA 序列数据库。

截至 2016 年 6 月底，在生物条形码数据库（BOLD）（http://www.barcodinglife.org/index.php/TaxBrowser_Home）（图 1-2）中已经收录来自 6685034 个样本的 5011648 条序列，其中来自 253032 种生物中的 237019 种或中间过渡种动物的 4484815 条序列符合 mtCO I 基因 DNA 条形码标准，可供动物物种鉴别参考使用。

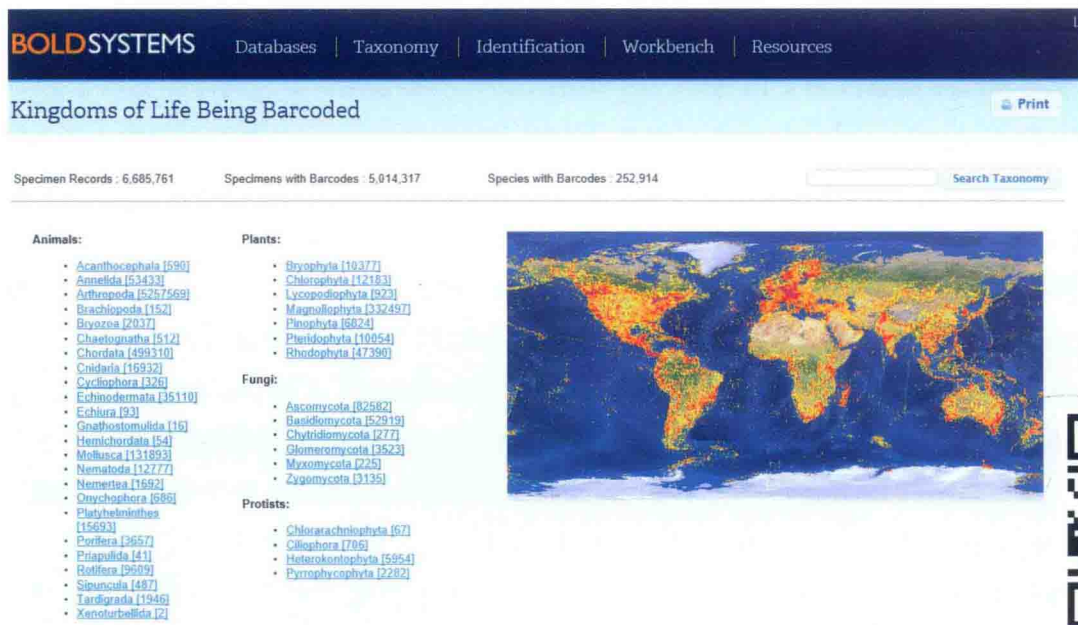


图 1-2 BOLD 网页和网址

三、DNA 条形码技术原理

(一) DNA 条形码识别原理

DNA 条形码技术有一种潜在的可能性，那就是可能成为地球上已被认知的 1000 多万种真核生物有效的鉴定方法。理论上一个长度为 15bp 的序列，每个位点有 4 个状态，能产生 10 亿个代码，远超过全世界预估的动物种数。当然由于进化选择压力，一些位点是不变的，这个约束可以通过选择蛋白编码基因、延长编码长度来解决，蛋白编码基因的第三密码子通常可以发生改变，一个长度为 45bp 的序列能够产生 10 个状态。依据每百万年 2% 的进化速率，一个有 100 万年生殖隔离历史的物种类群，约 600bp 的 DNA 序列平均就有 12 个特征信号位点可用于识别，即使在亲缘关系很近的类群中，大多数物种的进化历史都超过 100 万年。例如，一个长度约 600bp 的蛋白质编码基因核苷酸片段在第三密码子位点含有 200 个核苷酸，这些位点上发生的替代经常都是中性选择，并且突变大多是通过随机漂变的方式在种群中固定下来。假设在一组物种中第三位点的核苷酸全部是 AT 或全部是 GC，即在其 200 多个位点上只有 2 种可能的核苷酸，那么就仅第三密码子位点的变化而言能够产生 2^{200} 或 10^{60} 如此大数量的可能序列，所以 mtCO I 基因约 650bp 的 DNA 片段足够满足全球绝大多数动物物种鉴定分类需要。

实践中，DNA 条形码技术是以 mtCO I 基因作为分子标记的基础，与分子系统发育和传统物种分类学研究相关的一项技术。即利用不同生物的一小块组织提取 DNA 后，对其短的同源的特异

DNA 序列（约 650bp）进行扩增和测序，然后对其序列进行多重比对和聚类分析，最后将这些物种精确定位到一个在数据库中可查询到的已描述过且序列相似度极高的类群当中去，甚至还可以对某些特定物种定位到特定地理种群中去。目前 DNA 参考序列数据主要来源于凭证标本，此即为鉴定物种的标准。在分类学研究中，DNA 条形码首选线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 I 基因，即 *mtCO I* 基因；当然，细胞核基因标记也可用作动物 DNA 条形码来使用。

（二）DNA 条形码技术的适用性与优势

DNA 条形码技术是传统的依据形态进行物种鉴定之分类学强有力的补充，更使得物种鉴定快速有效；它将显著提升人类认识、了解、监测和利用生物多样性的能力。当利用传统分类学经验和方法受阻时，即可充分发挥此技术之优势。同时，为生物分类学家发现新种提供了新的辅助技术手段。

DNA 条形码技术的优势主要体现为：

- 1) 所需材料极少，只需一小块生物体组织就可以准确快速鉴别出该物种属于哪个分类阶元。
- 2) 能够鉴定不同年龄段的各物种，如昆虫的不同变态期，均可利用 DNA 条形码技术准确予以鉴定。
- 3) 准确区分外表形态极其相似的不同物种。
- 4) 鉴定过程更加快捷。
- 5) 减少鉴定的模糊性。
- 6) 对分子系统进化树有新的贡献。
- 7) 传统分类学与现代信息学相结合。
- 8) 展示收藏标本（样本）的价值。
- 9) 鉴定过程无限制，即被鉴定对象和鉴定者无限制。
- 10) 完善生命百科全书。

将物种标本与条形码数据库以及物种产地、特点、用途等相关信息联合起来，使公众更好地认识、了解、保护和利用生物。

（三）DNA 条形码技术应用的局限性

目前，DNA 条形码技术主要应用于物种的分类与鉴定。种内与种间遗传相似度和序列差异的界定是 DNA 条形码指导物种鉴定的重点。然而，就目前研究看，百分比范围到底多少是属于种内变异，多少又是属于种间变异，这还不明确。而且相同物种间由于不同亚种、地理隔离、年龄差距、环境改变等也可以影响碱基序列，不同物种的变异范围也不相同。因此，界定严格的范围似乎不太可能。就 *mtDNA* 而言，理论上种内差异通常小于种间差异，但据目前研究并不是一成不变的。

利用 *mtCO I* 基因鉴定物种有 3 个方面的局限，幸好这些局限不会影响一般水平的物种鉴定（Will *et al.*, 2004; Ebach *et al.*, 2005; Gregory, 2005）。

具体的局限如下:

1. 杂交 / 基因渗入

使用 *mtCO I* 基因解决所有物种复杂的分类关系是不可能的。首先,物种的边界由于杂交或基因渗入而显得模糊不清,因此就需要联合几个核内基因来增加标记数;其次,当物种新近起源于多倍体化,就需要基因组尺度分析。不过在绝大多数动物类群中,存在杂交、多倍体化和线粒体基因渗入的个体不到 1%。

2. 新近起源物种

假设碱基序列分异速率为每百万年 2%,那么在 100 万年前分开的物种之间,在长度约 650bp 的 *mtCO I* 基因片段上就平均有 12 个鉴定位点。当物种之间产生生殖隔离的时间非常短的时候,鉴定物种就比较困难。然而,化石记录显示大多数物种分化时间都超过 100 万年,因此鉴定工作比较简单。

3. 分子进化速率差异

如果某个动物类群中各个谱系分子进化速率不一致,当差异达到 100 倍时,由于进化快的谱系存在二次突变,在这个类群中鉴定出进化速率慢的物种将变得非常困难。在大多数动物类群中 *mtCO I* 基因的进化速率比较慢,有学者利用鳞翅目的序列数据分析结果表明,同属各种 *mtCO I* 序列的平均差异程度是 11.3%,而种内的 *mtCO I* 序列差异程度通常都很低,低于 2%,因此不妨碍物种鉴定。

随着研究的深入和 DNA 条形码数据库的不断补充,到底序列差异到什么程度分别是种内差别、种间差别,什么程度又分别是属间、科间差别,必须深入探索、研究,并建立和完善种内、种间、属间、科间 DNA 条形码阶元划分标准。

(四) DNA 条形码标准序列选择

理想的 DNA 条形码序列应当符合下列标准:

- 1) 具有标准的短片段,在尽可能多的分类群中都存在;长度适中,以便于有部分降解的 DNA 分析。
- 2) 具有足够变异性和系统进化信息,以区分不同物种及其分类地位。
- 3) 具有相对保守性,序列两端相对保守,有利于引物的设计。

1. 动物标准序列选择

目前,对不同动物类群研究结果显示:超过 95% 的物种其 *mtCO I* 基因序列拥有特异性,该基因可用于动物物种水平的鉴定。其理由为:

- 1) 动物机体绝大部分阶段都有明显的 *mtCO I* 基因序列。
- 2) 大多数细胞中虽有上百个以上的线粒体,但只有一组染色体。等量样品中,线粒体 DNA 更容易被放大和使用。
- 3) 与细胞核 DNA 相比,mtDNA 突变速度是核 DNA 的 10 倍,即核 DNA 的变异容易被保留,