

基于 *COI* 序列的水牛角及其易混伪品 DNA 条形码鉴定研究

刘旭朝^{1,2}, 周丽思¹, 刘金欣^{1,3}, 贾 静¹, 宋经元^{1*}, 石林春^{1*}

(1. 中国医学科学院、北京协和医学院药用植物研究所, 中草药物质基础与资源利用教育部重点实验室, 北京 100193;
2. 山东中医药大学药学院, 山东 济南 250355; 3. 承德医学院, 河北省中药研究与开发重点实验室, 河北 承德 067000)

摘要: 水牛角作为犀角的代用品是急症用药安宫牛黄丸的主要成份, 近年来常有混伪品流入市场, 急需建立有效鉴定方法。本研究共收集 155 份原动物及市售水牛角样品, 通过优化 DNA 提取方法, PCR 扩增、双向测序、序列拼接获得 153 条 *COI* 序列。93 份原动物 *COI* 序列经条形码间隔法和建树法检验后纳入中药材 DNA 条形码动物药材数据库, 利用中药材 DNA 条形码鉴定系统 (www.tcmbarcode.cn) 对 62 份市售水牛角药材进行鉴定。除 2 份市售药材无法获得 *COI* 序列外, 54.8% 的市售药材为水牛角, 29% 的市售药材为牦牛角。本研究表明牦牛角为市售水牛角药材主要伪品来源, DNA 条形码技术可用于区分水牛角及其易混伪品, 应加强市场监管, 以确保急症用药临床疗效。

关键词: 水牛角; *COI* 序列; DNA 条形码; 鉴定; 混伪品

中图分类号: R931

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 03-0494-06

Identification of water buffalo horn and its adulterants using *COI* barcode

LIU Xu-zhao^{1,2}, ZHOU Li-si¹, LIU Jin-xin^{1,3}, JIA Jing¹, SONG Jing-yuan^{1*}, SHI Lin-chun^{1*}

(1. Key Laboratory of Bioactive Substances and Resources Utilization of Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education, Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China; 2. College of Chinese Medicine, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China; 3. Hebei Key Laboratory of Study and Exploitation of Chinese Medicine, Chengde Medical College, Chengde 067000, China)

Abstract: Bubali cornu (water buffalo horn) has been used as the substitute for Cornu rhinoceri asiatici (rhino horn) in clinical applications, and is the essential ingredient of Angong Niu Huang Wan. In recent years, there are a number of adulterants on the commercial herbal medicine markets. An efficient tool is required for species identification. In this study, 155 Bubali cornu samples have been taken from original animals and collected from commercial herbal medicine markets. 153 *COI* sequences have been successfully obtained from 155 samples through DNA extraction, PCR amplification, bidirectional sequencing and assembly. 93 *COI* sequences have been added to the DNA barcoding database of traditional Chinese animal medicine after validation using DNA barcoding GAP and tree-based methods. The species identification of the 62 commercial Bubali cornu medicines has been accomplished on the DNA barcoding system for identifying herbal medicine using the updated animal medicine database (www.tcmbarcode.cn). Except two samples failed to obtain *COI* sequences, 54.8% of the commercial Bubali cornu medicines were water buffalo horns and 29% were yak horns.

收稿日期: 2016-10-20; 修回日期: 2016-12-01.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81303158); 国家“重大新药创制”科技重大专项资助项目 (2014ZX09304307001).

*通讯作者 Tel: 86-10-57833206, E-mail: lcs@implad.ac.cn;

Tel: 86-10-57833199, E-mail: jysong@implad.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2016-1020

Our results showed that yak horn was the major adulterant of Bubali cornu and the DNA barcoding method may accurately discriminate Bubali cornu and their adulterants. Therefore, we recommend that supervision on the herbal medicine markets should be strengthened with this new method to warren the effectiveness of herbal medicines.

Key words: water buffalo horn; *COI* sequences; DNA barcoding; identification; adulterants

水牛角为牛科动物水牛 *Bubalus bubalis* Linnaeus 的角, 取角后, 水煮, 除去角塞, 干燥^[1]。上世纪 60 年代因犀角资源稀少, 商品奇缺, 价格昂贵, 科研工作者选取乙脑、小儿暑热等病症开展水牛角替代犀角临床实践研究, 指出“水牛角的性味、归经、功用、主治, 与犀角近似, 水牛角可用于犀角的适应症”^[2]。1977 版《中国药典》增加对水牛角和水牛角浓缩粉的收载^[3]。1993 年国务院颁布《关于禁止犀牛角和虎骨贸易的通知》, 《中国药典》删除收载犀角, 中药处方中所含有的犀角成分全部由水牛角或水牛角浓缩粉代替。2015 版《中国药典》(一部) 收载含水牛角或水牛角浓缩粉的中成药 44 种^[1], 占所收载中药成方及单味制剂总量的 11%, 包含被誉为中医治疗高热症“瘟病三宝”的安宫牛黄丸、局方至宝散和紫雪(散)。市售水牛角的商品规格以水牛角丝为主, 缺乏完整性状鉴定特征, 难以准确鉴定到物种, 药市中常有以牦牛角或其他牲畜角混作水牛角销售现象, 急需建立有效的鉴定方法。

DNA 条形码技术利用基因组内一段标准序列对物种进行鉴定, 不受材料外观形态影响^[4], 已经纳入《中国药典》^[5,6], 适用于中药材(包括药材及部分饮片)及基原物种的鉴定。本研究以 *COI* 序列为 DNA 条形码, 尝试建立基于 DNA 条形码技术的水牛角及其易混伪品鉴定方法, 为水牛角准确鉴别提供新方法, 保障其临床用药安全。

材料与方法

材料 本研究共收集水牛角及其易混品的原动物和市售药材样品 155 份, 其中 62 份样品为市售水牛角药材, 来自安徽亳州药市、河北安国药市、四川荷花池药市、广西玉林药市等全国 19 个省份, 所有实验样品均保存于中国医学科学院药用植物研究所(表 1 和表 2)。

方法

DNA 提取、PCR 扩增及测序 使用超纯水将角类样品清洗干净。对于全角、角尖、角丝, 使用 75% 乙醇(体积分数)擦拭样品表面, 置于经紫外消毒的

通风橱内 30 min 以挥干乙醇。使用骨钻、刮刀、剪刀、钥匙等工具取约 60 mg 样品, 使用液氮充分研磨至细粉。使用柱式骨骼 DNAout 试剂盒(北京天恩泽基因科技有限公司)提取总 DNA。采用 Nano Drop 2000 (Thermo Scientific, USA) 测定 DNA 浓度及 A_{260}/A_{280} 值。序列扩增、测序及数据处理依照中药材 DNA 条形码分子鉴定法指导原则进行^[6]。

Table 1 Original animal specimens used in the present study

Latin name	No. of specimens	Voucher No.	Collection location
<i>Bos grunniens</i>	13	SS0001MT01-10	Kangding, Sichuan
		SS0001MT11-13	Xining, Qinghai Tianzhu, Gansu
<i>Bos Taurus</i>	14	SS0002MT01-08	Xinxiang, Henan
		SS0002MT09-11	Bengbu, Anhui
		SS0002MT12-14	Jining, Shandong
<i>Bubalus bubalis</i>	20	SS0003MT01-14	Liuzhou, Guangxi
		SS0003MT15-17	Yangjiang, Guangdong
		SS0003MT18-20	Hengyang, Hunan
		SS0004MT01-22	Xinxiang, Henan
<i>Capra hircus</i>	28	SS0004MT23-25	Bengbu, Anhui
		SS0004MT26-28	Jining, Shandong
		SS0005MT01-12	Xinxiang, Henan
<i>Ovis aries</i>	18	SS0005MT13-15	Bengbu, Anhui
		SS0005MT16-18	Jining, Shandong

序列分析 采用 BLAST 和系统树(NJ 树)分析防错方法, 核验新获得原动物 *COI* 序列的准确性, 并将核验准确的序列加入中药材 DNA 条形码动物药材数据库^[7]。基于中药材 DNA 条形码鉴定系统^[8]对市售水牛角药材进行鉴定。使用 MEGA6.0 软件构建系统发育树(NJ 树), 利用 Bootstrap (1 000 次重复) 检验各分支的支持率^[9]。

结果

1 水牛角及其混伪品 DNA 提取方法优化

选取水牛、牦牛、黄牛、山羊、绵羊等 5 种原动物角类样品各 1 份, 市售水牛角样品 1 份, 从取样量、水浴时间和纯化流程 3 方面优化 DNA 提取方法。具体结果为: ① 取样量: 比较取样量 30、60、90 和 200 mg 对提取 DNA 浓度的影响。结果发现当取样量为 60 和 90 mg 时, DNA 浓度均大于 $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ (表 3);

Table 2 The identification result of specimens collected from herbal markets

No.	No. of samples	Format	Collection location	Species assignment
QR01-QR04	4	Horn tips	Anguo, Hebei	<i>Bos grunniens</i>
QR05-QR07	3	Horn wires	Beijing	<i>Bos grunniens</i>
QR08-QR10	3	Horn wires	Yulin, Guangxi	<i>Bos grunniens</i>
QR11	1	Horn wires	Anguo, Hebei	<i>Bos grunniens</i>
QR12	1	Horn wires	Nanchang, Jiangxi	<i>Bos grunniens</i>
QR13	1	Horn wires	Lasha, Xizang	<i>Bos grunniens</i>
QR14	1	Horn wires	Wulumuqi, Xinjiang	<i>Bos grunniens</i>
QR15-QR17	3	Horn wires	Kunming, Yunnan	<i>Bos grunniens</i>
QR18	1	Horn wires	Chongqing	<i>Bos grunniens</i>
QR19-QR23	5	Horn wires	Bozhou, Anhui	<i>Bubalus bubalis</i>
QR24-QR28	5	Horn wires	Beijing	<i>Bubalus bubalis</i>
QR29	1	Horn wires	Linzao, Gansu	<i>Bubalus bubalis</i>
QR30,QR31	2	Horn wires	Guangzhou,Guangdong	<i>Bubalus bubalis</i>
QR32,QR33	2	Horn wires	Nanning, Guangxi	<i>Bubalus bubalis</i>
QR34	1	Horn wires	Yulin, Guangxi	<i>Bubalus bubalis</i>
QR35	1	Horn wires	Haikou, Hainan	<i>Bubalus bubalis</i>
QR36-QR39	4	Horn wires	Anguo, Hebei	<i>Bubalus bubalis</i>
QR40	1	Horn wires	Wuhan, Hubei	<i>Bubalus bubalis</i>
QR41,QR42	2	Horn wires	Nanjing, Jiangsu	<i>Bubalus bubalis</i>
QR43,QR44	2	Horn wires	Nanchang, Jiangxi	<i>Bubalus bubalis</i>
QR45,QR46	2	Horn wires	Yinchuan, Ningxia	<i>Bubalus bubalis</i>
QR47	1	Horn wires	Jinan, Shandong	<i>Bubalus bubalis</i>
QR48	1	Horn wires	Chengdu, Sichuan	<i>Bubalus bubalis</i>
QR49-QR51	3	Horn wires	Hehuachi, Sichuan	<i>Bubalus bubalis</i>
QR52	1	Horn wires	Lasha, Xizang	<i>Bubalus bubalis</i>
QR53	1	Horn wires	Bozhou, Anhui	<i>Capra hircus</i>
QR54,QR55	2	Horn wires	Beijing	<i>Capra hircus</i>
QR56	1	Horn powders	Chendu, Sichuan	<i>Pythium</i> sp.
QR57	1	Horn powders	Chendu, Sichuan	<i>Attagenus</i> sp.
QR58	1	Horn powders	Zhenzhou, Henan	<i>Trichophyton</i> sp.
QR59	1	Horn powders	Zhenzhou, Henan	<i>Archaeoattacus</i> sp.
QR60	1	Horn powders	Tianjin	<i>Tinea</i> sp.
QR61	1	Horn tips	Baoding, Hebei	No sequence
QR62	1	Horn wires	Kunming, Yunnan	No sequence

Table 3 The optimization result of different sampling amount

Samples	DNA concentration/ng·μL ⁻¹ /DNA purity (A ₂₆₀ /A ₂₈₀)			
	30 mg	60 mg	90 mg	200 mg
<i>Bos grunniens</i> horn	20.6/1.55	54.6/1.65	60.1/1.70	4.5/1.34
<i>Bubalus bubalis</i> horn	32.0/1.39	87.4/1.67	86.5/1.78	2.0/1.38
<i>Capra hircus</i> horn	23.8/1.56	55.5/1.78	52.3/1.67	18.7/1.39
<i>Ovis aries</i> horn	29.3/1.49	61.5/1.77	63.1/1.72	13.2/1.49
<i>Bos taurus</i> horn	20.6/1.55	61.2/1.67	67.3/1.80	7.2/1.58
Commercial medicine	20.1/1.45	55.1/1.76	57.9/1.80	8.1/1.23

② 水浴时间: 在取样量为 60 mg 时, 比较水浴时间 0.5、1、2、8 h 对提取 DNA 浓度的影响, 结果显示当水浴 0.5 和 1 h 时, DNA 浓度在 50~100 ng·μL⁻¹ 之间 (表 4); ③ 纯化流程: 在取样量为 60 mg、水浴时间 1 h 条件下, 比较 3 种纯化流程对提取 DNA 纯

度的影响, 结果表明当采取溶液 B+氯仿抽提 2 次时, 提取 DNA 的 A₂₆₀/A₂₈₀ 值均在 1.65~1.80 之间 (表 5)。

2 水牛角及其易混伪品的原动物 COI 序列分析

共获得 93 条水牛角及其易混伪品的原动物 COI 序列, 经核后均已纳入中药材 DNA 条形码鉴定系

Table 4 The optimization result of of different water bath time

Samples	DNA concentration/ng· μL^{-1} /DNA purity (A_{260}/A_{280})			
	0.5 h	1 h	2 h	8 h
<i>Bos grunniens</i> horn	57.9/1.73	64.2/1.78	50.5/1.63	51.7/1.61
<i>Bubalus bubalis</i> horn	83.8/1.65	87.4/1.78	52.9/1.64	37.2/1.57
<i>Capra hircus</i> horn	64.5/1.71	93.1/1.81	58.7/1.77	51.5/1.56
<i>Ovis aries</i> horn	61.3/1.71	70.8/1.73	65.2/1.53	35.9/1.60
<i>Bos taurus</i> horn	62.8/1.84	67.8/1.83	49.3/1.61	51.2/1.60
Commercial medicine	54.9/1.77	56.1/1.79	37.8/1.78	39.7/1.61

Table 5 The optimization result of of different purification method

Samples	DNA concentration/ng· μL^{-1} /DNA purity (A_{260}/A_{280})		
	Solution B+chloroform, once	Solution B+phenol/chloroform/isoamyl alcohol, once	Solution B+chloroform, twice
<i>Bos grunniens</i> horn	56.6/1.60	58.9/1.41	50.2/1.67
<i>Bubalus bubalis</i> horn	77.4/1.48	69.5/1.51	73.9/1.68
<i>Capra hircus</i> horn	50.5/1.44	57.8/1.50	52.7/1.78
<i>Ovis aries</i> horn	67.5/1.43	62.4/1.51	60.1/1.77
<i>Bos taurus</i> horn	65.0/1.43	67.3/1.48	56.9/1.67
Commercial medicine	57.3/1.50	47.2/1.50	55.1/1.76

统数据库。水牛角共 20 条序列, 分为 2 个单倍型 (A1、A2), 含 2 个变异位点; 牦牛角共 13 条序列, 分为 3 个单倍型 (B1~B3), 含 7 个变异位点; 黄牛角共 14 条序列, 分为 2 个单倍型 (C1、C2), 含 10 个变异位点; 山羊角共 28 条序列, 分为 3 个单倍型 (D1~D3), 含 2 个变异位点; 绵羊角共 18 条序列, 分为 7 个单倍型 (E1~E7), 含 11 个变异位点。变异位点信

息见表 6~10。5 种原动物种内最大 K-2P 距离均小于 0.015、种内平均 K-2P 距离均小于 0.008。基于原动物单倍型构建的 NJ 系统发育树可以看出, 5 种原动物各自聚为一支, 可以相互区分, Bootstrap 支出率均为 100%, 见图 1。

3 基于 DNA 条形码技术鉴定市售水牛角

登录中药材 DNA 条形码鉴定系统, 点击鉴定功

Table 6 The intraspecific variable sites in the *COI* sequence of *Bubalus bubalis*

Haplotype	508	571
A1	A	T
A2	T	C

Table 7 The intraspecific variable sites in the *COI* sequence of *Bos grunniens*

Haplotype	11	220	226	235	496	499	601
B1	C	T	T	C	T	C	T
B2	C	C	C	T	C	T	C
B3	T	T	T	C	T	C	T

Table 10 The intraspecific variable sites in the *COI* sequence of *Ovis aries*

Haplotype	157	187	359	385	406	472	490	523	544	565	601
E1	T	T	T	T	C	C	T	T	C	T	T
E2	T	C	C	C	C	A	T	C	C	T	C
E3	T	C	C	T	T	C	T	T	C	T	T
E4	T	T	C	T	C	C	T	T	C	T	T
E5	T	T	C	T	C	C	T	T	T	C	T
E6	C	T	C	T	C	C	T	T	C	T	T
E7	T	T	C	T	C	C	C	T	C	T	T

Table 8 The intraspecific variable sites in the *COI* sequence of *Bos taurus*

Haplotype	12	50	157	184	265	382	502	607	634	646
C1	T	C	C	A	C	A	G	C	C	T
C2	C	T	T	G	T	T	A	T	T	C

Table 9 The intraspecific variable sites in the *COI* sequence of *Capra hircus*

Haplotype	151	334
D1	T	C
D2	C	C
D3	T	T

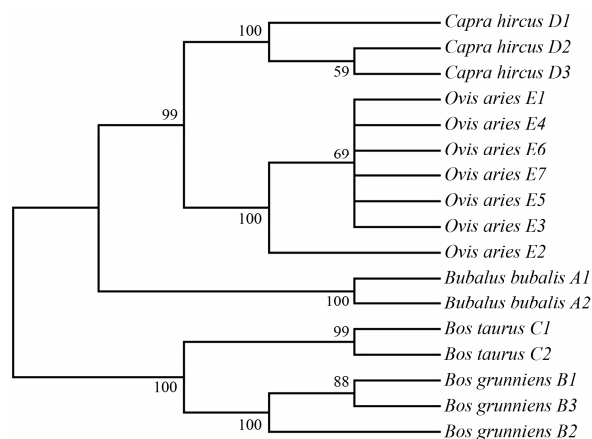


Figure 1 The NJ tree of *COI* haplotype sequences from *Bubalus bubalis*, *Bos grunniens*, *Bos taurus*, *Capra hircus* and *Ovis aries*. Bootstrap values of > 50% are indicated at the nodes.

能模块, 选择中药材 DNA 条形码动物药材数据库, 对购自药材市场和药店的水牛角药材进行基原物种鉴定, 结果表明: 34 份市售水牛角药材基原动物为水牛, 占 54.8%; 18 份市售水牛角药材基原动物为牦牛, 占 29.0%; 3 份市售水牛角药材基原动物为山羊, 占 4.8%, 2 份样品无法获得 *COI* 序列, 占 3.2%; 5 份样品无法鉴定到基原物种, 已被卵菌 (oomycetes)、子囊菌 (ascomycetes)、甲虫 (beetles)、蛾 (moths) 等外源物污染, 占 8.1% 鉴定结果见表 2。

讨论

稳定获得高质量 DNA 是水牛角 DNA 条形码鉴定的前提。水牛角是高度角质化的真皮组织, 由角质细胞组成, 质地坚韧, 富含蛋白质, 存储过程中表面易发生虫蛀或霉变。因此, 如何充分消化角质细胞, 使 DNA 更易溶出, 避免虫蛀霉变部位污染, 是水牛角 DNA 成功提取的关键。① 避免污染: 市售水牛角商品规格有去角塞整角 (个子)、角尖、角丝、角粉, 个子、角尖和角丝可用 75% 乙醇清洗表面, 并在通风橱或超净工作台内挥干乙醇。角粉可先使用无菌水浸泡, 再使用 75% 乙醇短时清洗, 低速离心后弃去上清, 沉淀物在烘箱中低温烘干, 但实验结果显示 5 份角粉均发生虫蛀或霉变, 可能与角粉存储时间较长或存储方法不当有关。② 研磨方法: 实验初期, 将水牛角用组织研磨仪 (Retsch MM400) 研磨 2~3 次, 发现组织研磨仪不能将样品充分研碎, 消化效果较差, 需使用液氮将水牛角研磨至细粉。③ 提高 DNA 提取浓度和质量: 减少取样量 (30~60 mg)、延长水浴时间 (1~2 h), 并将原有试剂盒中“加入溶液 B 和氯仿抽提”的操作重复 1 次, 可更好的去除蛋白质, 获得较

高质量的 DNA。

近年来水牛养殖数量持续下降, 水牛角制工艺价格走高, 水牛角资源紧缺, 牦牛角已成为水牛角主要混伪品来源, 本研究中发现 29% 的市售药材为牦牛角。全世界约 90% 的牦牛生活在我国青藏高原等地区, 资源丰富, 且牦牛角丝与水牛角丝功能主治、外观性状一定程度相似。根据中华本草记载^[10], 牦牛角具有清热解毒、凉血熄风的功效, 主治高热惊痫、血热出血等症。Wang 等^[11]研究证实牦牛角粗提取液有明显的解热和镇痛作用, 并从牦牛角粗提取液中分离得到不同分子量大小的具有解热和镇痛作用多肽。Shen 等^[12]比较西藏牦牛角替代古方犀角汤中的犀角后对发热家兔的退热作用, 认为其退热作用与原古方作用相当。Wang 等^[13, 14]通过元素、氨基酸、牛磺酸、胆固醇、氨基己糖等分析认为牦牛角较为接近犀 (广) 角。Shi 等^[15]观察发现牦牛角超细粉对小鼠大剂量灌胃给药后, 小鼠自发活动明显减少, 表明牦牛角超细粉具有镇静催眠作用。但是, 在尚不明确其能否代替中药犀角应用于临床的情况下应加强对市售水牛角药材的监管, 以避免牦牛角混作水牛角使用。

据 2015 版《中国药典》记载^[1], 水牛角的鉴别方法为性状鉴别法和粉末显微鉴别法。市售水牛角药材商品规格多以牛角尖、牛角丝或牛角粉形式出现, 其外观形态已被破坏, 缺乏进行性状鉴定的形态特征。运用粉末显微鉴别法鉴定水牛角药材真伪要求鉴定人员具有扎实的专业背景知识和丰富的鉴定经验, 易受水牛角镑片和角尖粉碎工艺的影响。近年来, DNA 条形码技术已广泛应用于植物类中药材 (包括药材及部分饮片) 及基原物种的鉴定^[16, 17], 在动物类中药材的研究主要集中在水蛭^[18]、地龙^[19]、鹿茸^[20]、蕲蛇^[21]等较易获得 DNA 的动物药材中。Zhang 等^[22]通过实验和 GenBank 下载获得《中国药典》45 种动物药材的 51 种原动物 *COI* 序列, 为基于 *COI* 条形码鉴定《中国药典》中动物药材提供参考。Yan 等^[23]运用 DNA 条形码技术对传统角类药材进行了鉴定研究, 并对保护濒危动物及其代替品的寻找提供了参考方法, 但该研究序列扩增为新设计的特异引物, 其应用具有一定的局限性。Jia 等^[24]利用 DNA 条形码技术对市售鹿茸粉的基原物种进行鉴定, 证实了 DNA 条形码技术可准确、有效鉴别市售鹿茸粉饮片。本研究基于 *COI* 作为 DNA 条形码序列, 对市售水牛角进行基原鉴定, 证明 DNA 条形码技术可准确、有效鉴别市售水牛角药材。DNA 条形码技术为《中国

药典》关于水牛角的鉴定方法提供了有效的辅助手段, 可作为水牛角真伪鉴定的新方法, 同时也为中药材 DNA 条形码鉴定系统数据库提供了补充, 对保障传统角类药材的临床用药安全具有重要意义。

References

- [1] Chinese Pharmacopoeia Committee. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典一部) [S]. Part 1. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 83.
- [2] Anon. The profiles of scientific research on Bubali cornu [J]. Guizhou Med J (贵州医药), 1977, 3: 41–42.
- [3] Chinese Pharmacopoeia Committee. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典一部) [S]. Part 1. Beijing: People's Medical Publishing House, 1977: 746, 762.
- [4] Hebert PDN, Ratnasingham S, De Waard JR. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species [J]. P Roy Soc Biol Sci, 2003, 270 (Suppl 1): S96–S99.
- [5] Chinese Pharmacopoeia Committee. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. The third supplement edition. Beijing: China Medical Science Press, 2014: 92.
- [6] Chinese Pharmacopoeia Committee. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典四部) [S]. Part 4. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 383–385.
- [7] Chen SL, Pang XH, Song JY, et al. A renaissance in herbal medicine identification: from morphology to DNA [J]. Biotechnol Adv, 2014, 32: 1237–1244.
- [8] Chen SL, Yao H, Han JP, et al. Principles for molecular identification of traditional Chinese materia medica using DNA barcoding [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2013, 38: 141–147.
- [9] Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 [J]. Mol Biol Evol, 2013, 30: 2725–2729.
- [10] Editorial Committee of Chinese Materia. Chinses Materia Medica (中华本草) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1999, 27: 677–678.
- [11] Wang MG, Li XR, Zhang XG, et al. Separation of the effective components from Tibetan Yak Horn and its antipyretic and analgesic activity [J]. Acta Chin Med Pharmacol (中医学报), 2015, 43: 49–52.
- [12] Shen MQ, Ye QZ, Ding YF, et al. Study on Cornu *Bos grunniens* from Tibet substituting Cornu Rhinoceri [J]. J Chin Med Mater (中药材), 2008, 31: 813–815.
- [13] Wang F, Duan JA, Qian DW, et al. Searching for substitutes for cornu rhinoceri asiatici and cornu saigae tataricae and evaluation (I) [J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med (南京中医药大学学报), 2005, 21: 163–165.
- [14] Wang F, Duan JA, Qian DW, et al. Searching for substitutes for cornu rhinoceri asiatici and cornu saigae tataricae and evaluation (II) [J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med (南京中医药大学学报), 2007, 23: 36–39.
- [15] Shi L, Duan JA, Wang F, et al. Tranquilizing effect of fine powder of six kinds of horns including grunting ox horn [J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med (南京中医药大学学报), 2009, 25: 364–366.
- [16] Feng SS, Zheng SH, Li YK, et al. Identification of Radix et Rhizoma Clematidis and its adulterants using DNA barcoding [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2014, 49: 260–266.
- [17] Xin TY, Zhao S, Song JY. Identification of commercial Lycii Cortex and its adulterants using ITS2 sequence as DNA barcode [J]. Chin Pharm J (中国药学杂志), 2014, 49: 260–266.
- [18] Liu XF, Liu CS, Yang YJ, et al. DNA barcodes of Shuizhi (*Hirudo*) and its adulterants studied based on *COI* gene [J]. J Beijing Univ Tradit Chin Med (北京中医药大学学报), 2013, 36: 63–66.
- [19] Wei JH, Li W, Wu WR, et al. Identification of *Pheretima aspergillum* by *COI* and 16S rRNA with DNA molecular marker methods [J]. China Pharm (中国药房), 2012, 23: 3274–3278.
- [20] Zhang R, Liu CS, Huang LQ, et al. Study on the identification of Cornu Cervi pantotrichum with DNA barcoding [J]. Chin Pharm J (中国药学杂志), 2011, 46: 263–266.
- [21] Sun C, Song Q, Shao PZ, et al. Study and discussion on molecular identification of *Agkistrodon acutus* medicinal slices in Chinese pharmacopoeia [J]. World Sci Technol-Mod Tradit Chin Med (世界科学技术—中医药现代化), 2016, 18: 196–201.
- [22] Zhang H, Yao H, Cui LN, et al. Application of *COI*-based DNA barcoding for identifying animal medical materials in the Chinese pharmacopoeia [J]. World Sci Technol-Mod Tradit Chin Med (世界科学技术—中医药现代化), 2013, 15: 371–380.
- [23] Yan D, Luo JY, Han YM, et al. Forensic DNA barcoding and bio-response studies of animal horn products used in traditional medicine [J]. PLoS One, 2013, 8: e55854.
- [24] Jia J, Shi LC, Xu ZC, et al. Identification of antler powder components based on DNA barcoding technology [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2015, 50: 1356–1361.