· 综述 ·

DNA 条形码等分子鉴定技术与动植物类中药材的鉴定

张国林*, 邢以文, 薛满

苏州市药品检验检测研究中心, 江苏 苏州 215000

[摘要] 中药材鉴定是控制中药质量、确保用药安全与效果的首要环节。DNA 分子鉴定是从基因层面上进行中药材鉴别的手段, 准确率高。DNA 分子鉴定包括电泳技术、免疫技术、随机扩增多态性 DNA (RAPD)、限制性内切酶片段长度多态性 (RFLP)、扩增片段长度多态性 (AFLP)、简单重复序列 (ISSR) 及 DNA 条形码等, 以 DNA 条形码应用最为广泛。DNA 条形码是基因组中相对较短的、可用于物种鉴定的特异性基因片段。植物类中药材的条形码多选用核基因和叶绿体基因 DNA 片段, 如叶绿体 *psbA-trnH* 基因、内转录间隔区 (ITS)、叶绿体核酮糖-1, 5-二磷酸羧化酶大亚基 (*rbcL*) 和 RNA 转录体 II 型内含子剪切酶基因 (*matK*) 等; 动物类中药材的条形码多来自核基因和线粒体基因 DNA, 主要有线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 1 (*COI*)、核糖体 RNA (rRNA) 和线粒体细胞色素 b 基因 (*CytB*) 等。综述动植物类中药材 DNA 分子标记与鉴定技术应用进展, 并探讨 DNA 条形码在药用动植物类中药材鉴定中存在的局限性及发展前景, 为中药质量控制提供参考。

[关键词] 条形码; 核基因; 叶绿体基因; 线粒体基因; 微条形码; 复合条形码

[中图分类号] R282.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2021)02-0381-08

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20200216001

Application of DNA Barcoding and Other Molecular Techniques in Identification of Animal and Plant Traditional Chinese Medicine

ZHANG Guo-lin*, XING Yi-wen, XUE Man

Suzhou Institute for Drug Control, Suzhou 215000, China

[Abstract] The identification of traditional Chinese medicine (TCM) is the first step for quality control of traditional Chinese medicine. DNA molecular identification, is a method to identify TCM from the gene level by directly analyzing the genetic material polymorphism. It has high accuracy and is not easy affected by the development stage, tissue position, sample shape and external environmental factors. DNA molecular identification includes electrophoresis, immunoassay, random amplified polymorphic DNA (RAPD), restriction endonuclease fragment length polymorphism (RFLP), amplified fragment length polymorphism (AFLP), simple repeat sequence (ISSR) and DNA barcode, among which DNA barcode is most widely adopted. DNA barcoding is a relatively short specific gene segment in genome, which can be used for species identification. In the barcode of plant traditional Chinese medicine, nuclear gene and chloroplast gene DNA fragments are mostly selected, such as chloroplast *psbA-trnH* gene, internal transcribing spacer (ITS), chloroplast riboketose-1, 5-diphosphate carboxylase large subunit (*rbcL*) and RNA transcriber type II intron shear enzyme gene (*matK*). In animal traditional Chinese medicine, the bar code mostly comes from nuclear gene and mitochondrial gene DNA, mainly including mitochondrial DNA Cytochrome C oxidase subunit 1 (*COI*), ribosomal RNA (rRNA) and mitochondrial cytochrome b gene (*CytB*). DNA barcoding identification technology is one of the fastest developing methods in DNA molecular identification technology, which plays an increasingly important role in the identification of animal and plant TCM. In this paper, the application of DNA molecular marker and identification technology in animal and plant traditional Chinese medicine is reviewed.

[Keywords] barcoding; nuclear gene; chloroplast gene; mitochondrial gene; micro-barcoding; compound barcoding

* [通信作者] 张国林, 副主任药师, 研究方向: 药品检验及质量控制; Tel: (0512)66090229, E-mail: zhangguolin2006@163.com

由于中药材种类繁多、来源复杂及市场利益的驱使,中药材品种混淆、掺伪现象时有发生。因此,控制中药材质量对中医药的发展和人民用药安全具有重要价值。中药材鉴定是中药质量控制的首要环节。传统的中药材鉴定主要基于来源、性状(形状、大小、颜色、表面特征、质地、断面特征、气味、水试和火试等)、显微和理化分析4种手段。传统鉴定手段在中药材鉴定中发挥了重要的作用,但这些方法容易受到药材产地环境、生物学遗传因素、加工和炮制方法等的影响,而导致重复性和稳定性较差。DNA分子标记技术在中药鉴定领域的应用使得从基因层面上进行中药材鉴定成为现实,且具有准确率高,不易受发育阶段、组织部位和样品形态及外界环境因素影响等优点。本文综述中药材DNA分子标记与鉴定技术研究进展,并分析DNA条形码在药用动植物类中药材鉴定中的应用,为中药材质量控制研究和应用提供参考。

1 电泳技术和免疫技术与中药材鉴定

动植物中药材中含有大量的多肽和蛋白质、酶、生物碱及有机酸等。电泳鉴别的原理是由于上述成分的电荷数和相对分子质量不同而在电场中表现为不同的电泳方向、速度。同工酶聚丙烯酰胺凝胶电泳已成为中药材鉴定和亲缘关系分析的常用手段。在对海蛇晒干制品进行酯酶同工酶染色分析时证实,6种海蛇干品的中段腹部肌肉组织处理后进行非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,发现采用酯酶同工酶方法可以有效地鉴定不同种类的海蛇干品^[1]。驴皮、鹿角和龟甲等基原动物药用部位含有丰富的蛋白质,经加工后蛋白质会呈现弥散分布,但3种胶类中药的蛋白相对分子质量不同,而采用十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳及双向凝胶电泳(2-DE)蛋白谱分析可以有效鉴别3种胶类成分^[2]。

免疫鉴定法主要通过以中药材中特有的蛋白质为抗原制备特异性的抗体,并通过抗原-抗体的免疫反应来进行中药材鉴定。免疫技术目前多用于动物类中药材,尤其是亲缘关系比较近的中药材的鉴定^[3-4]。但近些年来关于免疫技术与中药材鉴定的研究报道较少。

2 随机扩增多态性DNA(RAPD)、限制性内切酶片段长度多态性(RFLP)和扩增片段长度多态性(AFLP)与中药材鉴定

RAPD是以人工合成的随机多态核苷酸序列为

引物,以基因组DNA为模板,通过DNA聚合酶进行扩增,实现对整个未知序列的基因组的多态性的分析。RAPD在中药材的鉴定方面得到越来越广泛的应用^[5]。徐苏丽^[6]以S3和S12 2种引物采用RAPD标记法对中药多花黄精和长梗黄精进行分析,发现聚合酶链式反应(PCR)扩增产生的多态性谱带能有效对2种中药材进行鉴定。同时,李敏等^[7]通过回收RAPD扩增筛选到的川麦冬分子标记CM503基因建立了川冬的PCR鉴定方法。另外,RAPD技术在蛇类中药饮片分子鉴定方面也有广泛的应用,对乌梢蛇、赤链蛇、金环蛇、赤练游蛇、灰鼠蛇、金钱白花蛇及其混伪品能进行有效鉴定^[8]。

RFLP是通过限制性内切酶酶切后的产物进行电泳分离,分析限制性片段长度的差异性,进而分析物种间基因型的差异性,达到鉴定鉴别的目的^[9]。RFLP是应用最广泛的中药材鉴定的分子生物学方法之一。朱晓燕等^[10]采用PCR-RFLP法对白茅根样品的植物通用DNA条形码内转录间隔区(ITS)1、ITS2、*psbA-trnH*、*rbcL*和*matK*的序列进行比较,发现ITS1和ITS2序列可作为不同性状白茅根鉴别的DNA条形码,且ITS2序列上Hpy CH4Ⅲ限制性内切酶识别位点可作为不同性状白茅根的PCR-RFLP鉴别位点。已有的证据显示,西洋参与人参DNA的ITS具有不同的限制性内切酶位点,西洋参ITS经Hinf I酶切后产生80、42 bp 2条片段,而人参经酶切后仍为单一片段,提示RFLP可用于西洋参与人参的鉴定^[11]。对聚合酶链式反应扩增后产物采用Alu I酶限制性酶切,正品紫草能被限制性内切酶酶切为2条条带而非《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)2015年版品不能被酶切,提示PCR-RFLP可鉴别紫草正品与非《中国药典》2015年版品,且研究发现,市场流通大量紫草非《中国药典》2015年版收载的新疆紫草*Arnebia euchroma* (Royle) Johnst. 和内蒙紫草*A. guttata* Bunge^[12]。

AFLP是通过扩增双酶切后的基因组DNA片段,并根据扩增片段的长度多态性进行鉴定的方法。AFLP分析对石斛、党参等种质资源遗传多样性研究和党参原产地分析及引种指导方面具有重要的价值。采用AFLP法对50份云南优异的红花种质资源材料进行多态性分析时证实,云南红花群体遗传分化和遗传多样性较为复杂,遗传变异主要在群体间发生,AFLP标记技术能有效地揭示红花种质资源的遗传多样性^[13]。采用AFLP分子标记与高效液相色谱法

(HPLC)指纹图谱技术分析多个种群和居群的党参的遗传多样性,可有效指导原产地分析和引种策略^[14]。同时,简单重复序列(ISSR)结合 AFLP 标记技术能有效地对不同石斛种质资源进行鉴别,反映种质资源间的亲缘关系,提示两者结合可用于石斛资源的遗传多样性研究^[15]。另外,利用 AFLP 标记对贵州及周边的薏苡种质进行遗传多样性和聚类分析发现,6对 AFLP 引物扩增出830条清晰条带,而多态性条带达742条,提示薏苡种质交流频繁,遗传基础狭窄,遗传多样性低^[16]。

3 ISSR 与中药材鉴定

ISSR 也称为微卫星序列标记,同一物种不同位点或同一位点不同等位基因间由于突变会存在较大的差异性,可用于中药材鉴定。牛樟树腐朽内壁寄生的牛樟芝是珍贵的药用真菌。采用 ISSR 和相关序列扩增多态性(SRAP)分子标记技术对福建省引种的牛樟种质分析发现,10个 ISSR 引物组合共扩增出237个条带,其中多态性条带占比88.6%,即 ISSR 结合 SRAP 分子标记技术可用于牛樟种质的鉴别^[17]。目标起始密码子多态性(SCoT)标记结合 ISSR 标记能稳定、快速、准确地进行射干和川射干药材的分子鉴定,而 ISSR 标记可对射干及其混伪品进行分子鉴定^[18]。在分析 ISSR 分子鉴定技术鉴别茶枝柑及其近缘种的研究中也证实,在多条 ISSR 通用引物中筛选出的10条适合茶枝柑及近缘种的引物,可用于茶枝柑及近缘种的遗传多态性分析,即 ISSR 也可作为茶枝柑及其近缘种的分子鉴别手段^[19]。另外,采用11条多态性引物进行 ISSR 分析能有效对多花黄精与长梗黄精进行鉴别和遗传多样性分析^[19]。

4 DNA 条形码在动植物类中药材鉴定中的应用

4.1 DNA 条形码及其用于中药鉴定的流程

DNA 条形码是由加拿大科学家 Paul Hebert 最早提出的,指一段相对保守的较短的序列片段。DNA 条形码既有种属的保守性,又有近缘物种的特异性,且不会受物种不同时期生长状态的影响^[20-21]。除了核基因条形码序列外,动物线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基1(COI)、细胞色素 b 基因(CytB)序列条形码^[22-23]、植物类中药材线粒体 *psbA-trnH* 序列条形码^[24]在中药材鉴定中有着广泛的应用。

DNA 条形码用于中药鉴定的主要流程为材料预

处理(防止中药材降解或有毒物质产生)→DNA 提取→特异性片段的扩增→扩增产物的序列分析→序列与药材 DNA 条形码数据库(MMDBD)、中国医学科学院药用植物研究所中药 DNA 条形码数据库等标准数据库比对确认最接近物种→构建系统发育树。

4.2 DNA 条形码与植物类中药材的鉴定

4.2.1 叶绿体 *psbA-trnH* 序列与植物类药材的鉴定 *psbA* 基因编码光合系统 II 反应中心的 D1 蛋白,*trnH* 基因编码 tRNA 组氨酸。*psbA-trnH* 序列位于 *psbA* 基因与 *trnH* 之间,是被子植物叶绿体基因组中变异位点最多的序列之一^[24-25]。*psbA-trnH* 序列具有较好的植物种间鉴别作用。利用 *psbA-trnH* 条形码结合 *trnL-F* 条形码2个 DNA 序列数据实现了黑胡麻和多叶胡麻的鉴别^[26]。万如等^[27]采用 *psbA-trnH* 基因作为条形码对21份枸杞属植物材料进行鉴定,通过构建的系统发育树将航天诱变种与普通栽培种分成了两大分支。何首乌具有明显的遗传变异特性,张宏意等^[28]发现,*psbA-trnH* 序列分析可从分子水平上对德庆道地种源何首乌和其他种源何首乌进行有效鉴定和区分。研究也证实,*psbA-trnH* 序列作为 DNA 条形码能区分较近亲缘关系的穿龙薯蓣与毛胶薯蓣,也能鉴别穿龙薯蓣和其他薯蓣属植物^[29]。*psbA-trnH* 条形码序列与其他序列组合能增强部分植物类药材鉴定的时效性和准确性^[30-31]。将 *psbA-trnH* + *matK* + *trnL* 序列组合作为 DNA 条形码可对野菊和药用菊快速有效地鉴定^[32]。太子参丰抗1号和黔太子参1号的 *psbA-trnH* 序列相似度为98.5%,而采用以 *psbA-trnH* 序列为主、ITS2 序列为辅的 DNA 条形码技术可有效对2种人工选育太子参品种进行鉴别^[33]。同时,以核基因 ITS 序列为主、*psbA-trnH* 序列为辅可以准确分析巴戟天地理分布与遗传结构的相关性^[34]。

4.2.2 ITS 序列与植物类药材的鉴定 ITS 序列为 rRNA 内部转录间隔区序列,属于核基因序列,具有进化的保守型和种属的特异性。ITS 序列除了用于微生物的鉴定分型外^[35],也可用于中药材的鉴定^[36-37]。在利用 ITS2 条形码鉴定北沙参样品时证实,12份样品中有北沙参10份,川明参和祁木香各1份,即 ITS2 条形码可用于北沙参鉴定的 DNA 条形码^[38]。除了种属的鉴定外,还可以利用 ITS 条形码序列进行特色植物资源的调查^[39]。透骨草具有活血止痛、祛风除湿的药理活性,是中医外科的常用药。由于透骨草基原复杂、同名异物较为普遍,故对其

从分子水平上进行鉴定有利于质量控制和临床应用。经 PCR 扩增和产物双向测序 ITS2 条形码能准确、高效地鉴定东北透骨草及其混伪品^[40]。虽然一种药用植物可采用多种 DNA 条形码进行鉴定,但不同条形码在鉴定能力方面存在较大的差异性。海南大戟科植物具有清热解毒、清淤散结的药理活性,采用 ITS、*psbA-trnH*、*rbcL* 及 *matK* 等序列条形码都可对海南大戟科植物进行鉴定,但 ITS2 序列条形码变异系数和信息位点系数最大,对大戟科植物的鉴别能力最强^[41]。唇形科药用植物具有清热解毒、活血抗菌、抗癌消炎的药理活性,但该科植物形态变异大,单纯依靠经典的鉴定方法存在较大的局限性。证据显示,*matK* 序列条形码对唇形科植物的识别率高,而 ITS2 序列条形码对唇形科植物的鉴定能力强,通过 ITS 序列和 *matK* 序列相结合可以对唇形科植物快速、准确鉴别,并能有效阐明物种间的亲缘关系^[42]。在评价 ITS2 序列对川贝母及其近缘物种亲缘关系时证实,ITS2 序列能够将贝母区分为以平贝母和伊犁贝母为代表的北方贝母群和以浙贝母、川贝母为代表的南方贝母群^[43]。ITS 条形码与其他条形码的组合应用可以提高植物类中药材鉴定、鉴别的准确性。在比较多种 DNA 条形码鉴别沉香属物种效果时证实,不同条形码的鉴定效果强弱依次为 *matK* > ITS2 > *rbcL* > *trnH-psbA*,而为准确鉴别沉香属不同物种可采用 *matK* + ITS2 + *rbcL* 序列的组合^[44]。

4.2.3 *rbcL* 条形码与植物类中药材鉴定 核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶大亚基属于叶绿体基因序列,具有丰富的序列变异信息,能够作为中药材鉴定的 DNA 条形码^[45-46]。*rbcL* 作为陆地植物通用的 DNA 条形码,单独或与其他多基因片段组合可用于植物种群的鉴定、分类和遗传多样性研究^[47]。叶绿体基因 *rbcL* 在不同种间和产地的浙贝母中序列高度保守^[48]。阳春砂为“四大南药”之一砂仁的主流品种,对湿浊中阻、呕吐泄泻效果好,但由于自然结实率低导致市场上出现较多的混淆品。阳春砂与其混淆品长柄豆蔻、白豆蔻、九翅豆蔻和云南豆蔻的 *rbcL* 条形码序列存在 10 处碱基的差异,通过分析 *rbcL* 条形码序列可有效区分阳春砂及其混淆品种^[49]。*rbcL* 条形码也可与其他条形码结合使用,进一步提高鉴定的准确度和效率,尤其是对于种内变异明显的品种。关苍术种内变异较大导致单一 ITS 条形码无法进行有效鉴定,而 *atpB* 序列和 *rbcL* 序列的组合可以有效解决种内变异的问题^[50]。组合了

rbcL 序列、ITS 序列和 *trnS-G* 序列的 DNA 条形码能对西藏地区红景天属的长鞭红景天、大花红景天和圣地红景天有效鉴定^[51]。另外, *rbcL* 序列对贵州苗药头花蓼^[52] 和山慈菇^[53] 鉴定和遗传研究均有重要的参考价值。

4.2.4 *matK* 条形码与植物类中药材鉴定 *matK* 序列是叶绿体 *trnK* 基因内含子的一个开放阅读框,具有进化速率快、序列变化大的特点,能够在种属水平上提供较多的进化和系统发育信息,适于中药材类的分子鉴定。野菊和药用菊的干燥头状花序均可用药,但功效有所不同:野菊用于解毒消痈,药用菊对清热疏风效果好。陈芙蓉等^[32] 将 *matK* 序列条形码联合 *psbA-trnH* 和 *trnL* 序列组合作为 DNA 条形码,实现了分子水平上对野菊和药用菊的准确鉴别。姜科植物具有益脾胃、理元气的药理活性,且不同姜科种间 *matK* 序列均存在明显差异,利用 *matK* 序列条形码可对姜科植物进行有效地分类鉴定^[54]。基于 *matK* 序列条形码构建的 NJ 聚类树能对白头翁及其常见伪品有效鉴定^[55],且 *matK* 条形码结合 ITS1 和 ITS2 基因条形码序列能够实现丽江糙苏和黑花糙苏及假秦艽在分子水平上的鉴别^[55]。高良姜为“十大广药”之一,具有理气止痛、温中散寒的功效,但长期以来山姜、华山姜等多被混淆为高良姜流通和使用。通过建立 *matK* 基因条形码的分子鉴定手段能够有效区分高良姜与同属的混伪品^[55]。积雪草能清热利湿、解毒消肿,与其混伪品过路黄、连钱草等的 *matK* 基因序列存在近百个单核苷酸多态性 (SNP) 位点,通过 *matK* 序列条形码可准确、高效鉴定积雪草及其混淆品^[56]。鸡血藤与混伪品及鸡血藤样品内的 *matK* 基因序列存在较大的 A ~ G 碱基差异性,而基于 *matK* 基因序列条形码建立的聚类树能准确地鉴别鸡血藤及其混伪品^[57]。

4.3 DNA 条形码与动物类中药材的鉴定

动物药应用有着悠久的历史,《神农本草经》中收录了牛黄、龙骨、麝香、龟甲等 67 类动物药,《中国药典》2015 年版中收录了水牛角、水蛭、乌梢蛇、石决明和瓦楞子等多种动物类中药材。传统的动物类中药材的鉴定方法包括感官、性状和显微鉴别。随着分子生物学技术的发展,采用基于 DNA 条形码序列的动物药的分子鉴定应用越来越广泛。目前用于动物药分子鉴定的 DNA 条形码主要有 *COI*、ITS、*CytB* 和 rRNA 等。

4.3.1 COI条形码与动物药鉴定 COI基因属于线粒体DNA序列。COI基因进化速率快,在多种动物中存在明显的序列变异性,可用于亲缘物种鉴定,其作为DNA条形码鉴定动物药已被《中国药典》2015年版所收录^[58]。基于性状鉴别和COI、16S rRNA和ATP6等DNA条形码联用可对鲍氏海马进行分子鉴定,保障海马药材的质量^[59]。海马药材的药源紧张,导致市场上海马药材的掺伪现象严重,而三斑海马的种间变异明显大于种类变异,通过分析COI、16S rRNA及ATP6条形码序列可有效区分三斑海马和伪品海马,进而规范海马药材的质量和市场流通^[60]。哈蟆油为珍稀名贵中药材,但也存在混伪品多、鉴定困难等技术难题,而通过建立COI基因条形码可准确鉴定蛤蟆油,且能区分正品蛤蟆油与青蛙油、牛蛙油等混伪品^[61]。熊胆粉具有清热、平肝、明目的药理学活性,对目赤肿痛和咽喉肿痛等效果显著,但目前熊胆粉的混伪品现象较为严重。许亚春等^[62]对收集到的熊胆粉采取基于COI基因条形码分析鉴定后发现,黑熊和棕熊的熊胆粉各聚为一支,与混伪品明显不同。水牛角具有清热、凉血、定惊和解毒的功效,在《中国药典》2015年版中收录的含有水牛角或水牛角浓缩粉的中成药达44种。但目前,药品市场上存在以牦牛角和其他牲畜角冒充水牛角销售的现象。采用COI序列的DNA条形码技术对155份市售宣称水牛角的样品分析发现,牦牛角为水牛角主要的伪品来源,采用COI序列条形码可鉴定水牛角及其易混伪品^[63]。应用COI序列条形码对不同地区的蟾皮药材、基原动物和混伪品鉴定,发现蟾皮药材和混伪品属于不同分支,即COI序列条形码能够准确鉴别中药材蟾皮^[64]。

4.3.2 CytB条形码与动物药鉴定 CytB属于线粒体基因,编码以铁卟啉为辅基的色蛋白,进化速度适中,是种内和种间遗传分析的重要标记物。根据动物线粒体CytB基因的差异性位点设计的CytB条形码可用于动物制品及药材的鉴定。李盈诺等^[65]给CytB条形码开发了一种多重PCR体系,可快速、灵敏、高通量地对掺假的动物来源成分进行鉴定。林蛙油具有补肾益精、养阴润肺的功效,属名贵中药材,但市场上存在牛蛙油、青蛙油等假冒林蛙油的现象。通过PCR扩增CytB基因并进行测序,证实CytB序列条形码可作为林蛙油类药材鉴定的分子标记^[66]。CytB条形码鉴别蛇胆汁及其伪品的效果明显优于COI条形码和16S rRNA条形码,且重复性和

准确度高,利于蛇胆汁的质量控制^[67]。根据梅花鹿、马鹿与猪、牛、羊和鸭等的CytB基因序列的差异性建立的PCR-RFLP方法可鉴别鹿血及相关伪品^[68]。CytB序列条形码均能对穿山甲正、伪品进行鉴定和聚类分析,有效提高穿山甲中药材质量控制的水平^[69]。CytB条形码可鉴别出燕窝的种及亚种,快速、准确鉴别出燕窝基原,对混伪品进行准确区分^[70]。线粒体CytB基因条形码也可对地鳖虫(地鳖、冀地鳖)及其混伪品炮制药材进行分子水平的鉴定和区分^[71]。

4.3.3 rRNA条形码与动物药鉴定 rRNA为细胞内含量最高的RNA,主要作用为在mRNA指导下将氨基酸合成蛋白质。较多的证据显示,rRNA序列条形码可用于动物类药材的鉴定。参照12S rRNA基因序列设计扩增引物能特异性扩增乌贼DNA序列,该序列条形码结合现有的DNA条形码提高了乌贼鉴定的准确度^[72]。基于COI和28S rRNA可进行牡蛎种类多样性及其分布特征的研究。采用2种条形码结合分析发现,纳入研究的232个牡蛎样品可分为3属、10种^[73]。结合分析COI、16S rRNA和12S rRNA 3种微型条形码可鉴别中华穿山甲与其易混物种,提示基于16S rRNA的微型条形码技术可有效鉴别中华穿山甲及其混伪品^[74]。部分动物类中药材可通过多种条形码进行鉴定和鉴别,但不同条形码鉴别的准确性和灵敏性存在差异。分析不同的DNA条形码鉴别帘蛤目贝类发现,不同的条形码都能在一定程度上完成鉴定,但COI条形码能够鉴定57.1%物种,18S rRNA能鉴定16.7%的物种而16S rRNA能够鉴定60.9%的物种^[75]。对比COI、16S rRNA和CR 3种DNA种线粒体基因条形码发现至少16S rRNA基因应可作为脊椎动物标准条码标记^[76]。

5 DNA条形码鉴定中药材存在的问题及应用前景

5.1 DNA扩增条件的探索

DNA条形码鉴定中药材首要步骤为DNA的提取及扩增。DNA提取的质量直接决定后期分析的准确性。但对于使用部位为骨骼类、贝壳类、角甲类和皮膜类及分泌物等的中药材,通常存在DNA含量低或降解严重的情况。针对此类中药材,采用DNA条形码鉴定时应探索提高DNA提取效率的方法,防止假阴性结果的出现。

5.2 微条形码的应用

微条形码是利用标准条形码的一部分基因序列

进行物种鉴定的 DNA 序列。对于 DNA 降解严重的中药材或者保存年代久远的样本,宜探索 DNA 微条形码鉴定手段,以避免 DNA 降解而无法扩增造成的假阴性。微条形码序列短、引物通用性强,能够快速、简便地对物种进行鉴定。与传统 DNA 条形码相比,微条形码更容易从发生降解的样本中获得。

5.3 复合条形码(宏条形码)

复合条形码是利用高通量测序技术对环境样本中的所有基因涉及到的条形码序列同时分析、鉴定多个物种的手段。复合条形码极大地扩展了物种多样性的研究范围,对鉴别中药方剂中多种动物药和植物药成分具有积极的价值。

5.4 DNA 条形码数据库及多种条形码的组合应用

条形码数据库是动植物类中药材鉴定的重要依据。目前,国内外已经构建了 DNA 条形码的关键性数据库,如 MMDBD 和中国医学科学院药用植物研究所建立的中药 DNA 条形码数据库,且目前,《中国药典》2015 年版和欧美主流药典收录的大多数药材均已完成 DNA 条形码鉴定研究:基于 ITS2 + *psbA-trnH 2* 个位点的结合,初步建立了中药 DNA 条形码编码系统。该中药 DNA 条形码编码系统共有 78 847 个序列,隶属于 23 262 个种,其中 95% 以上为中国、日本、韩国、印度、美国及欧洲等国家药典中的药材^[77]。但应当指出的是,中药材通常有不同来源、加工手段和储存条件,采用单一的条形码鉴定手段通常无法实现有效的鉴定。同时,中药材中容易带有细菌、真菌和寄生虫等,容易在 DNA 提取和 PCR 扩增过程中造成污染,最终影响鉴定的准确性。而组合多种条形码进行中药材的鉴定可以有效提高鉴定的准确性。动植物的基原鉴定是中药标准制定的重要参考,也是保证临床用药安全的前提和基础。DNA 条形码技术能够从分子水平上对道地药材及其混伪品进行有效鉴定,且具有较高的准确性和时效性。在以后的工作中应进一步扩大 DNA 条形码的覆盖范围,并增强微条形码和多种条形码组合的应用范围,更好地推进为中药材鉴定和产业化发展。

参考文献

[1] 廖理曦,曾克武,屠鹏飞.基于酯酶同工酶染色法的中药海蛇干品鉴定研究[J].时珍国医国药,2016,27(6):1399-1402.

[2] 郑洁.胶类中药蛋白质的分析及鉴定研究[D].镇江:江苏大学,2017.

[3] 吴伯英.生物鉴定法在中药鉴定中的应用及前景[J].中药与临床,2012,3(5):47-48.

[4] 孙得森,王欣然,王京昆.中药材鉴定方法概述[J].中南药学,2017,15(4):487-491.

[5] 时圣明,潘明佳,王洁,等.分子鉴定技术在中药中的应用[J].中草药,2016,47(17):3121-3126.

[6] 徐苏丽.利用 RAPD 标记法鉴定新安地区多花黄精及长梗黄精的分析与研究[J].普洱学院学报,2019,35(3):10-11.

[7] 李敏,茅学群,黄龙妹,等.川麦冬聚合酶链式反应鉴定方法的研究[J].中国药学杂志,2017,52(11):936-940.

[8] 许翊,陆妍,武海萍,等.蛇类中药饮片分子鉴别方法的研究进展[J].中国中药杂志,2017,42(15):2930-2933.

[9] 闫海霞,谭成,杜小伟,等.分子生物学方法鉴别川贝母及饮片的技术要点探析[J].中国当代医药,2017,24(6):92-95.

[10] 朱晓燕,黄韵璇,黄昌杰,等.两种白茅根聚合酶链式反应法-限制性片段长度多态性分析鉴别方法的研究[J].中国药学杂志,2019,54(18):1486-1490.

[11] 王雪松,周雨晴,李丹,等.基于 PCR-RFLP 的西洋参和人参指纹特征鉴定[J].北华大学学报(自然科学版),2018,19(1):49-52.

[12] 李谦,刘杰,过立农,等.基于 ITS2 序列的紫草 PCR-RFLP 鉴别研究[J].药物分析杂志,2016,36(9):1611-1617.

[13] 胡尊红,王沛琦,杨谨,等.利用 AFLP 标记分析云南红花优异种质资源的遗传多样性[J].山西农业科学,2019,47(10):1756-1761.

[14] 谷聪,曹玲亚,苏强,等.党参原产地及其迁地引种后 AFLP 与 HPLC 指纹图谱分析[J].中药材,2016,39(8):1716-1722.

[15] 宋爽,周洋帆,刘正杰,等.利用 ISSR 和 AFLP 标记分析石斛种质资源的遗传多样性[J].云南农业大学学报(自然科学版),2016,31(4):688-695.

[16] 李秀诗,周祥,李志芳,等.基于 AFLP 标记的贵州及其邻省薏苡种质资源遗传多样性分析[J].南方农业学报,2019,50(9):1931-1936.

[17] 王巧,周艳平,郑惠成,等.利用 SRAP 与 ISSR 分子标记鉴别牛樟种质[J].亚热带农业研究,2019,15(3):145-151.

[18] 郑茜,杨倩,陈永钧,等.基于 ISSR 及 SCOT 分子标记对射干、川射干药材的分子鉴别[J].中国药学杂志,2018,53(13):1063-1069.

[19] 席秀丽,黄海波,楼步青,等.广陈皮 DNA 提取优化及茶枝柑的 ISSR 分子鉴别[J].江苏农业科学,2017,45

- (13):27-31.
- [20] KHAN S A, BAESHEN M N, RAMADAN H A, et al. ITS2: An ideal DNA barcode for the arid medicinal plant *rhazya stricta* [J]. *Pharmaceut Med*, 2019, 33(1): 53-61.
- [21] SHI R, HU Z, LU H, et al. Hierarchical nanostructuring array enhances mid-hybridization for accurate herbal identification via ITS2 DNA barcode [J]. *Anal Chem*, 2020, 92(2): 2136-2144.
- [22] RUBIOLA S, CHIESA F, ZANET S, et al. Molecular identification of *sarcocystis* spp. in cattle: Partial sequencing of cytochrome c oxidase subunit 1 (*COI*) [J]. *Ital J Food Saf*, 2018, 7(4): 7725.
- [23] DINH T D, NGATIA J N, CUI L Y, et al. Influence of pairwise genetic distance computation and reference sample size on the reliability of species identification using *CytB* and *CO I* gene fragments in a group of native passerines [J]. *Forensic Sci Int Genet*, 2019, 40(11): 85-95.
- [24] INTHARUKSA A, SASAKI Y, ANDO H, et al. The combination of ITS2 and *psbA-trnH* region is powerful DNA barcode markers for authentication of medicinal terminalia plants from thailand [J]. *J Nat Med*, 2020, 74(1): 282-293.
- [25] FENG S, JIAO K, ZHU Y, et al. Molecular identification of species of *Physalis* (solanaceae) using a candidate DNA barcode: The chloroplast *psbA-trnH* intergenic region [J]. *Genome*, 2018, 61(1): 15-20.
- [26] ZHAO T, WANG Z T, BRANFORD-WHITE C J, et al. Classification and differentiation of the genus *Peganum* indigenous to china based on chloroplast *trnL-F* and *psbA-trnH* sequences and seed coat morphology [J]. *Plant Biol*, 2011, 13(6): 940-947.
- [27] 万如, 王亚军, 安巍, 等. 基于 *psbA-trnH* 序列条形码鉴定 21 份枸杞属植物 [J]. *江苏农业科学*. 2019, 47(1): 56-59.
- [28] 张宏意, 袁林林, 饶秋红, 等. 不同产地何首乌叶绿体 *psbA-trnH* 基因序列分析 [J]. *中草药*. 2018, 49(5): 1146-1149.
- [29] 赵容, 邵飞, 尹海波, 等. 基于 *psbA-trnH* 序列对穿龙薯蓣及同属物种的鉴别研究 [J]. *中国中药杂志*. 2018, 43(5): 938-944.
- [30] 李园园, 蔡莉, 杨继勇, 等. 基于 ITS2 和 *psbA-trnH* 序列的金钗石斛 DNA 条形码鉴定研究 [J]. *基因组学与应用生物学*. 2018, 37(8): 3516-3524.
- [31] 吕泽良, 张永刚, 韩梅, 等. 不同产地黄芩 ITS2 和 *psbA-trnH* 条形码序列分析 [J]. *吉林农业大学学报*. 2017, 39(1): 42-48.
- [32] 陈芙蓉, 汪涛, 郭巧生, 等. 基于 DNA 条形码 *psbA-trnH*, *matK*, *trnL* 对不同地理居群野菊和药用菊的鉴定研究 [J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(4): 660-665.
- [33] 赵海, 李园园, 刘红昌, 等. 基于 ITS2 和 *psbA-trnH* 序列的黔太子参品种 DNA 条形码鉴定研究 [J]. *中药材*. 2018, 41(4): 855-858.
- [34] 许子欣, 冉志芳, 杨小彤, 等. 基于 *psbA-trnH* 和 *rDNA* ITS 序列的不同地理居群巴戟天聚类分析 [J]. *南方农业学报*, 2018, 49(12): 2364-2370.
- [35] 张国林, 苏远科, 沈海英, 等. 16S rRNA/ITS 基因序列分析与微生物分类鉴定及其在药品微生物质量控制中的应用 [J]. *中国现代应用药学*. 2017, 34(10): 1489-1495.
- [36] 陈静仪, 张靖, 张丹纯, 等. 21 种广东省珍稀保护药用植物的 DNA 条形码分析 [J]. *中药新药与临床药理*. 2019, 30(8): 979-984.
- [37] 陈梦, 朱玲燕, 黄真, 等. 三斑海马及其混伪品的 DNA 条形码分子鉴定研究 [J]. *中草药*, 2019, 50(22): 5554-5562.
- [38] 韩晓伟, 曹楸伟, 严玉平, 等. 基于 ITS2 的北沙参药材及其伪品的分子鉴定 [J]. *江苏农业科学*, 2019, 47(17): 71-75.
- [39] 罗凌龙, 张弛, 邓博, 等. 基于 DNA 条形码技术的俄罗斯特色药用植物资源调查 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(2): 175-180.
- [40] 马丽杰, 吴云, 谷巍, 等. 基于 ITS2 序列的东北透骨草及其混伪品 DNA 分子鉴定 [J]. *中草药*, 2019, 50(23): 5830-5837.
- [41] 徐腊红, 陆籽豪, 唐历波, 等. 几条热点 DNA 条形码序列对海南大戟科植物鉴定能力比较 [J]. *广东农业科学*, 2019, 46(9): 27-33.
- [42] 郑辉, 李秋娥, 陈安琪, 等. 峨眉山区唇形科药用植物 ITS2 和 *matK* 条形码序列鉴定 [J]. *中草药*, 2019, 50(22): 5563-5570.
- [43] 郑辉, 邓楷煜, 陈安琪, 等. 基于 DNA 条形码的川贝母及其近缘种的分子鉴定与亲缘关系研究 [J]. *药学学报*, 2019, 54(12): 2326-2334.
- [44] 康勇, 刘杨, 杨云, 等. 应用于多个沉香属物种鉴定的 DNA 条形码序列筛选 [J]. *中国药学杂志*, 2019, 54(23): 1926-1932.
- [45] PARVEEN I, SINGH H K, MALIK S, et al. Evaluating five different loci (*rbcl*, *rpoB*, *rpoC1*, *matK*, and ITS) for DNA barcoding of indian orchids [J]. *Genome*, 2017, 60(8): 665-671.
- [46] BELL K L, LOEFFLER V M, BROSI B J. An *rbcl* reference library to aid in the identification of plant species mixtures by DNA metabarcoding [J]. *Appl Plant Sci*,

- 2017,5(3):223-229.
- [47] JIN W T, SCHUITEMAN A, CHASE M W, et al. Phylogenetics of subtribe orchidinae s. L. (orchidaceae; orchidoideae) based on seven markers (plastid *matK*, *psaB*, *rbcL*, *trnL-F*, *trnH-psbA*, and nuclear *nritS*, *Xdh*): Implications for generic delimitation[J]. BMC Plant Biol, 2017,17(1):222-228.
- [48] 林娜,蓝艳,张晓芹. 基于叶绿体 *rbcL* 基因对不同产区浙贝母的 PCR 扩增体系及序列差异研究[J]. 山东中医药大学学报,2019,43(4):412-416.
- [49] 魏洁书,杨锦芬,詹若挺. 基于 *rbcL* 基因的阳春砂及其 5 种同属混淆品的鉴别[J]. 时珍国医国药,2018,29(10):2409-2411.
- [50] 杨娜,王鹤,孙明阳,等. 基于 ITS 和 *aptB-rbcL* 序列对关苍术 (*Atractylodes japonica*) 种内变异的分析[J]. 分子植物育种,2020,1(1):1-14.
- [51] 张力鹏,滕彦娇,宋文芹,等. 西藏地区红景天属植物 ITS,*rbcL*,*trns-G* 序列多态性分析[J]. 南开大学学报(自然科学版),2019,52(5):93-101.
- [52] 牛宪立,魏妮娜,梅露露,等. 贵州苗药头花蓼的 *rbcL* 序列分析[J]. 贵州农业科学,2018,46(4):111-113.
- [53] 牛宪立,魏妮娜,邵敏,等. 贵州苗药山慈菇 *rbcL* 序列分析[J]. 分子植物育种,2019,17(14):4717-4721.
- [54] 张桂芳,钟志敏,黄松,等. 姜科植物 *matK* 条形码鉴定及聚类分析[J]. 时珍国医国药,2018,29(1):99-102.
- [55] 赵月梅,陈硕. 基于 *matK* 序列对白头翁及其伪品的鉴别[J]. 陕西农业科学,2017,63(1):51-54.
- [56] 魏艺聪,陈建雄,黄泽豪,等. 基于 *matK* 序列的积雪草与其易混品的分子鉴定方法分析[J]. 世界中医药,2016,11(5):900-902.
- [57] 黄琼林,马新业,詹若挺,等. 鸡血藤及其混伪品 *matK* 基因分析和分子鉴定[J]. 北方园艺,2015(17):94-98.
- [58] 杨帆,周丽珊,何铭琪,等. DNA 条形码技术在动物类中药鉴定中的运用研究进展[J]. 时珍国医国药,2018,29(8):1968-1970.
- [59] 孙思雅,来梦茹,方昀,等. 基于性状鉴别与 DNA 条形码联用的鲍氏海马生药学研究[J]. 中国药学杂志,2019,54(24):2047-2054.
- [60] 陈梦,朱玲燕,黄真,等. 三斑海马及其混伪品的 DNA 条形码分子鉴定研究[J]. 中草药,2019,50(22):5554-5562.
- [61] 石林春,刘金欣,唐先明,等. 哈蟆油基原考证及 DNA 条形码物种鉴定研究[J]. 中国科学:生命科学,2019,49(8):1032-1040.
- [62] 许亚春,熊超,姜春丽,等. DNA 条形码技术在动物类药材熊胆粉及其混伪品鉴定中的应用[J]. 中国中药杂志,2018,43(4):645-650.
- [63] 刘旭朝,周丽思,刘金欣,等. 基于 *COI* 序列的水牛角及其易混伪品 DNA 条形码鉴定研究[J]. 药学学报,2017,52(3):494-499.
- [64] 樊佳佳,宋明,宋驰,等. 中药材蟾皮及其混伪品的 DNA 条形码鉴定研究[J]. 中国药学杂志,2015,50(15):1292-1296.
- [65] 李盈诺,王艳双,苑广信,等. 多重位点特异性 PCR 快速检测牛肉中常见掺假动物源性成分[J]. 食品工业科技,2019,40(24):82-87.
- [66] 董瑶,钱元梅,宋曼,等. 利用线粒体 DNA 上的 *CytB* 鉴定林蛙及林蛙油[J]. 吉林化工学院学报,2019,36(1):52-57.
- [67] 吴桂凡,张文娟,程显隆,等. 特异性 PCR 方法鉴别蛇胆汁及其伪品[J]. 中国中药杂志,2018,43(10):2053-2056.
- [68] 王凤霞,陈媛媛,任贵奇,等. 鹿血的 PCR-RFLP 鉴定研究[J]. 中草药,2018,49(8):1914-1918.
- [69] 尹艳,刘逊,王兵,等. 中药穿山甲的 DNA 分子鉴定研究[J]. 中国中药杂志,2017,42(11):2078-2084.
- [70] 王凤云,韩亮,赖小平. 32 种不同产地与品种商品燕窝的 DNA 基源鉴定[J]. 世界科学技术—中医药现代化,2015,17(9):1876-1882.
- [71] 李娜,岳蓓蓓,张家贺,等. 基于 *CytB* 基因对药用昆虫地鳖虫炮制品的分子鉴别研究[J]. 中国药房,2015,26(31):4354-4356.
- [72] 王萍亚,金雨婷,黄朱梁,等. 乌贼 DNA 条形码的筛选与验证[J]. 食品安全质量检测学报,2019,10(17):5809-5815.
- [73] 王航俊,吕宝强,黄丹,等. 基于 DNA 条形码研究浙江沿海牡蛎的种类多样性及其分布特征[J]. 应用海洋学报,2019,38(3):365-372.
- [74] 陈宏,王红雨,何铭琪,等. 炮山甲及其混伪品的 DNA 微型条形码鉴定研究[J]. 中药材,2019(10):2268-2273.
- [75] 吴彪,赵庆,刘寒苗,等. 不同 DNA 条形码基因在帘蛤目贝类分类鉴定中的比较分析[J]. 中国水产科学,2018,25(4):880-890.
- [76] 邓立彬,汤晓丽,邵建明,等. 江西 7 种蛇类基于 16S rRNA 基因的 DNA 条形码构建[J]. 南昌大学学报(理科版),2011,35(1):95-102.
- [77] CHEN S, PANG X, SONG J, et al. A renaissance in herbal medicine identification: From morphology to DNA [J]. Biotechnol Adv,2014,32(7):1237-1244.

(收稿日期: 2020-02-16 编辑: 王笑辉)