

DNA 分子标记技术在中药材品质鉴定中的应用进展

郭伟云¹, 牛玉璐², 姚朝阳³

(1. 新乡医学院生命科学技术系, 河南 新乡 453003; 2. 衡水学院生物系, 河北 衡水 053000; 3. 新乡医学院基础医学院, 河南 新乡 453003)

摘要: 目的 了解 DNA 分子标记技术在中药材品质鉴定中的应用进展。方法 检索本领域国内外相关文献资料并进行分析、整理和总结。结果 DNA 分子标记技术在该领域中得到了广泛应用。结论 DNA 分子标记技术可以作为中药材品质鉴定的重要手段。

关键词: 中药材; 品质鉴定; DNA 分子标记技术; 图谱

中图分类号: R282.5 文献标识码: A 文章编号: 1004 - 7239(2006)06 - 0635 - 03

Advances in application of DNA molecular marking technology in Quality Identification of traditional Chinese medicine

GUO Wei-yun¹, NIU Yulu², YAO Zhao-yang³

(1. Department of Life Science and Technology, Xinxiang Medical College, Xinxiang 453003, China; 2. Faculty of Biology, Hengshui College, Hengshui 053000, China; 3. School of Basic Medicine, Xinxiang Medical College, Xinxiang 453003, China)

Abstract: **Objective** To learn about the recent advances in application of DNA molecular marking technology in quality identification of traditional chinese medicine. **Methods** Related domestic and abroad literatures were searched and reviewed in the field. **Results** DNA molecular marking technology was widely applied in the field. **Conclusion** DNA molecular marking technology was a important method in quality identification of traditional chinese medicine.

Key words: chinese medicinal crop ; quality identification ; DNA molecular marking technology ; map

我国中药材资源丰富,药用动植物达 1 万余种^[1],药材来源复杂,品种划分混乱。许多药材外形类似,加工后容易改变形态结构,传统的中药鉴定手段难以准确鉴别。在中药材市场上,以次充好、以假乱真现象严重。保证药材纯正面临着巨大的挑战,中药材品质鉴定已成为中药质量控制的首要环节。近年来,不少新的技术方法被用于这一领域,其中以 DNA 指纹技术、DNA 测序技术为代表的 DNA 分子标记技术以其准确性高、重现性好等特点尤为引人注目。现就其应用状况综述如下。

1 DNA 指纹图谱技术

1.1 限制性片段长度多态性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) 和扩增片段长度多态性 (amplified fragment length polymorphism, AFLP) 技术

RFLP 技术出现较早,在该领域应用也较早。1997 年, Cheng 等^[2]采用 PCR - RFLP 结合 PCR 选择性限制酶谱 (PCR - selective restriction, PCR - SR) 分析白术、茅苍术和关苍术核基因组 rDNA ITS1 (internal transcribed spacer, ITS) 图谱,较易检定三者药材基原。1999 年, Ngan^[3]等采用 PCR - RFLP 方法考察了 5.8S rDNA ITS 区,成功区分出人参属 6 种植物及其 2 种易混伪品。AFLP 技术在这方面也有应用。2000 年,马小军等^[4]对大马牙、二马牙等 5 个人参农家类型的 AFLP 图谱进行研究,发现所有类型均有特异条带可作为鉴别特征。同年,罗志勇等^[5]运用这一技术,成功地构建出高质量的人参、西洋参 AFLP 图谱,发现北美西

洋参引种到吉林的西洋参图谱之间有一定差异,但小于人参与西洋参间的差异,说明引种的西洋参产生了一定的变异,但与人参的种间差异更为显著。RFLP 和 AFLP 适于对新鲜样品进行分析,其可靠性和稳定性较高,是原生物鉴定的理想选择。但其对实验人员和设备要求较高,技术也稍显复杂,使其成本大大增加,因此限制了它们的应用。

1.2 随机扩增多态性 (random amplified polymorphic DNA, RAPD)

1.2.1 药材真伪及代用品鉴别鉴定 2001 年, Lay 等^[6]利用 RAPD 技术检测了 18 个产地的山药样品,用 18 条引物构建了准确区分各样品的 RAPD 图谱,结果其中的 4 条引物能鉴别开所有样品。2002 年,梁之桃等^[7]利用 3 条引物构建了柴胡和同属四种易混品的 RAPD 图谱,成为鉴别这 5 种植物的良好依据,解决了柴胡易混品形态过于近似、传统方法无法区分的难题。2004 年,罗恒等^[8]从 62 条引物中筛选出 4 条引物,用于海风藤与其替代品的鉴别,对于制品和原植物的鉴别都获得了成功。

1.2.2 近缘物种鉴别 金线莲母 (金线莲) 与金线莲公 (无线金线莲) 是否为同一种植物,一直存在争议,2002 年胡珊梅等^[9]运用 RAPD 技术,对同一采集地的具有不同叶面特征的金线莲进行了 DNA 指纹鉴定,结果两者的 RAPD 指纹图谱具有部分共同的谱带,同时又有各自的特征,显然为两个种。2003 年, Zhao 等^[10]利用 RAPD 技术对生产中常用的灵芝属 8 个菌株的亲缘关系进行了分析,8 个菌株被聚为紫芝组、树舌组和灵芝组 3 个组,发现这 8 个种中不仅 3 个组之间的遗传差异较大,而且灵芝组内的松杉灵芝和其他 4 个种的遗传差异也较大,这在一定程度上解释了报道中药用成分不一的问题。

收稿日期: 2006 - 06 - 13

作者简介: 郭伟云 (1978 -), 女, 河南新密市人, 助教, 硕士, 主要从事生物技术的教学与科研工作。

1.2.3 道地性药材鉴别 2001年,Um等^[11]构建了来自中国 and 韩国4产地人参的RAPD图谱,4产地人参相似系数在0.19~0.49之间,较易区别。2003年,党荣理等^[12]对新疆产兰麻黄、中麻黄、膜果麻黄和木贼麻黄的RAPD图谱进行研究,发现不含有效成分的膜果麻黄图谱与前三者相差最大,这说明药效成分与基因图谱之间存在一定相关性,为该类别药材的鉴定提供了分子依据。地黄在全国多个地方引种,2004年,周延清等^[13]在对地黄8个品种2个品系的遗传关系进行研究时发现,由17条引物构建的图谱可以有效鉴别各个样品,其中有2条引物能单独区别10个样品。

RAPD技术对DNA的质量要求较低,允许快速、简单地分离基因组DNA,可操作性很强。该技术也比RFLP和AFLP简便易行,非常适合于近缘种、易混淆品种、珍稀品种及中药出土标本、古化石标本等珍贵样品的鉴定。同时RAPD多态性较强,可以进行相应的遗传关系分析。

2 DNA序列分析技术

2.1 DNA测序技术

2.1.1 药材真伪及代用品鉴别鉴定 1999年,王义权等^[14]测定了中药材乌梢蛇及其混淆品7个种共12件标本、原动物标本10个种各1件的线粒体Cyt-b基因序列,其种内差异仅1.14%,远小于16.85%的种间差异,认为该基因是鉴别蛇类药材原动物的一种理想分子标记。2002年,Tomari等^[15]分析了rps基因rp116~rp114间隔区的核苷酸序列,根据序列能够将正品肉苁蓉与两种混淆品区别开。2004年,金成庸等^[16]对茵陈原植物茵陈蒿的代用品韩茵陈及其同名植物白莲蒿进行鉴定,测定了rDNA ITS序列,序列之间的差异显示韩茵陈和白莲蒿应为两种植物,但三者存在密切的亲缘关系。

2.1.2 近缘物种鉴别 2001年,徐红等^[17]报道了在药品市场上流通量大、常作为黄草药材使用的石斛属植物13种14个类群的rDNA ITS序列分析结果,其中石斛种间ITS1序列的差异百分率平均为20.47%,ITS2序列的差异百分率平均为17.67%,石斛各类群与外类群的差异百分率ITS1序列平均为25.5%,ITS2序列平均为27.37%,这些可作为中药黄草石斛分子鉴定的标记。2004年,Long^[18]测定分析了8种24个麻黄样品的ITS序列,8个种被分成3个群体,分类结果与地理关系相一致,显示了地理差异性,同时他们依此结果设计了一套引物用于不同产地麻黄鉴别。2006年,Guo等^[19]比对了中国麻黄等4种麻黄属植物ITS序列和叶绿体chlB基因序列,依据序列特征对市场上4种药材进行了盲检,建立了鉴定这4种植物的新方法。

2.1.3 道地性药材鉴别 2002年,刘玉萍等^[20]用PCR直接测序法对6个产地广藿香的matK基因和18S rRNA进行了测序研究,结果表明6个样品的mtaK序列存在47个变异位点,18S rRNA存在17个变异位点,并与挥发性油化学成分进行了相关性分析,为广藿香物种鉴定提供了分子证据。2003年,余永邦等^[21]测定了14个产地太子参的ITS1、ITS2序列,其中4个产地的完全一样,其余均存在不同程度的种内变异,可以作为鉴别不同产地太子参的分子依据。

2.2 特异引物PCR 2002年,唐双焱^[22]测定不同产地梅花鹿、马鹿、水鹿、白唇鹿4个种9个个体的线粒体Cyt-b基因片断序列,设计一对高特异性引物,研制成功能有效鉴定鹿鞭的检测试剂盒,为分子鉴定走向产业化打开了局面。2003年,Ding等^[23]设计了铁皮石斛rDNA ITS序列的一对高特异性引物用于分析铁皮石斛及石斛属其它37种植物,发现这38种植物的PCR扩增中只有铁皮石斛有产物生成,并且该引物扩增效率较高。伊贝母是常用中药,另有8种贝母也做药用,2005年,Wang等^[24]基于rDNA ITS序列设计一对引物用于鉴定伊贝母,结果其它8种无扩增产物生成,且实验中PCR循环程序仅需两步。

DNA测序技术考查的对象是DNA片段,该技术对DNA完整性的要求不高,序列测定结果直观可靠,效率高。可以对混和样品进行鉴定,克服了其它方法无法对药品掺假进行鉴定的缺点,能够对复方制剂进行鉴别。但成本高,需要序列数据库的支持。以序列测定为基础的特异引物PCR是一种真正的快速检测方法,有望成为生产第一线的技术手段。

3 评价与展望

中药材90%以上为生物体或其一部分,中药材的鉴定最终是对其生物学本质进行鉴定,寻找有效的鉴定方法是实现中药现代化的迫切任务。DNA分子标记技术以其特异性强、稳定性好,结果直观、可靠,便于进一步分析等优势在该领域取得了可喜的成绩。同时也存在不少问题:方法不够完善,资料不丰富,需专门仪器和专业人员,成本偏高,已涉及的中药品种和研究不够广泛,无法有效推广到生产第一线。克服以上问题是DNA分子标记及时有效应用到生产实践的关键所在。

今后研究的重点应关注以下问题:推动DNA分子标记技术对更多中药品种进行鉴定,比较各种方法的特点和适用范围;将更多的DNA分子标记技术应用到该领域;开发简便易行的新方法;降低成本提高效率。DNA分子标记技术本身在不断的发展,在中药品质鉴定中的应用研究会越来越多。用于中药鉴定系统可靠、成本低廉的DNA分子标记专门技术正在开发之中。相信它将与传统鉴定方法并存发展,共同阐明中药材真伪优劣,科学评价中药材质量,成为中药材鉴定的有力工具,共同推进中药现代化进程。

参考文献:

- [1] 万德光,裴瑾.论中药品种鉴定在中药质量控制中的地位和作用[J].药学实践杂志,2000,18(5):260-262.
- [2] Cheng H, Lai B, Chan S, et al. Molecular differentiation of *Atractylodes* drugs by PCR - restriction fragment length polymorphism and PCR - selective restriction analysis on the 18S - 5.8S rDNA intratranscribed spacer 1 gene [J]. *J Food Drug Anal*, 1997, 5:319-322.
- [3] Ngan F, Shaw P, But P, et al. Molecular authentication of *Panax* species [J]. *Phytochemistry Oxford*, 1999, 50(5):787-791.
- [4] 马小军,汪小全,肖培根,等.人参农家品种的AFLP指纹研究

- [J]. 中国中药杂志, 2000, 25 (12) :707-710.
- [5] 罗志勇, 周 钢, 周肆清, 等. AFLP 法构建人参、西洋参基因 DNA 指纹图谱[J]. 药学学报, 2000, 35(8) : 626-629.
- [6] Lay H, Liu H, Liao M, *et al.* Genetic identification of Chinese drug materials in Yams (*Dioscorea* spp.) by RAPD analysis [J]. *Food Drug Anal.*, 2001, 9(3) : 132-138.
- [7] 梁之桃, 秦民坚, 王峥涛, 柴胡属 5 种植物 RAPD 分析与分类鉴定[J]. 中草药, 2002, 33(12) :1117-1119.
- [8] 罗 恒, 王和勇, 孙 敏. 应用 RAPD 快速鉴别中药材海风藤及其替代品[J]. 中医学报, 2004, 32(5) :33-37.
- [9] 胡珊梅, 张启国, 周涵韬. RAPD 法在金线莲的鉴别研究中的应用[J]. 中草药, 2002, 33(10) :949-950.
- [10] Zhao M, Chen M, Wang N, *et al.* Study on genetic relationship among some commercial strains of *Ganoderma*[J]. *J Nanjing Agricultural University*, 2003, 26(3) :60-63.
- [11] Um J, Chung H, Kim M, *et al.* Molecular authentication of Panax ginseng species by RAPD analysis and PCR - RFLP [J]. *Biol Pharm Bull*, 2001, 24(8) : 872-875.
- [12] 党荣理, 马永红, 吴 霞, 等. 新疆产麻黄的 RAPD 分析[J]. 中草药, 2003, 34(9) :861-863.
- [13] 周延清, 景建洲, 李振勇, 等. 利用 RAPD 和 ISSR 分子标记分析地黄种质遗传多样性[J]. 遗传, 2004, 26 (6) :922-928.
- [14] 王义权, 周开亚, 徐珞珊. 中药材乌梢蛇及其混淆品的 DNA 序列分析鉴别[J]. 药学学报, 1999, 34(1) :67-71.
- [15] Tomari N, Ishizuka I, Moriya A, *et al.* Pharmacognostical studies of *Cistanche Herba* (). Phylogenetic relationship of the *Cistanche* plants based on plastid *rps2* gene and *rp116* - *rp114* intergenic spacer sequences[J]. *Biol Pharm Bull*, 2002, 68 :218-222.
- [16] 金成庸, 陈建伟, 刘忠权, 等. 韩茵陈等 3 种药材基源 rDNA 内转录间隔区的序列分析鉴定[J]. 中西医结合学报, 2004, 2 (1) :58-61.
- [17] 徐 红, 李晓波, 丁小余. 中药黄草石斛 rDNA - ITS 序列分析[J]. 药学学报, 2001, 36(10) :777-783.
- [18] Long C, Kakiuchi N, Takahashi A, *et al.* Phylogenetic analysis of the DNA sequence of the non - coding region of nuclear ribosomal DNA and chloroplast of *Ephedra* plants in China[J]. *Planta Med*, 2004, 70(11) :1080-1084.
- [19] Guo Y, Tsuruga A, Yamaguchi S, *et al.* Sequence Analysis of Chloroplast *chlB* Gene of Medicinal *Ephedra* Species and Its Application to Authentication of *Ephedra* Herb[J]. *Biol Pharm Bull*, 2006, 29(6) :1207-1211.
- [20] 刘玉萍, 罗集鹏, 冯毅凡. 广藿香的基因序列与挥发性油化学型的相关性分析[J]. 药学学报, 2002, 37(4) :304-308.
- [21] 余永邦, 秦民坚, 梁之桃, 等. 不同产区太子参的 rDNA ITS 区序列的比较[J]. 植物资源与环境学报, 2003, 12(4) :1-5.
- [22] 唐双焱, 傅 文, 陈永久. 中药材鹿鞭的分子鉴定研究[J]. 中国中药杂志, 2002, 27(8) :573-575.
- [23] Ding X, Wang Z, Zhou K, *et al.* Allele - specific primers for diagnostic PCR authentication of *Dendrobium officinale* [J]. *Planta Med*, 2003, 69(6) :587-588.
- [24] Wang C, Li P, Ding J, *et al.* Identification of *Fritillaria pallidiflora* Using Diagnostic PCR and PCR - RFLP Based on Nuclear Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer Sequences [J]. *Planta Med*, 2005, 71(4) :384-386.

(本文编辑:刘鹤香 英文编辑:乔汉臣)

欢迎订阅 2007 年《中国组织工程研究与临床康复》 (原《中国临床康复》) 杂志

2007 年《中国组织工程研究与临床康复》杂志组稿重点:

生物材料研究:组织工程支架材料、材料与宿主的关系、材料与组织的相容性、血液 - 材料相互作用评价、组织工程材料学特征。

康复工程研究:医学假体、人工器官、器官移植、骨关节植入物与人的生物相容性、脊柱脊髓植入物与人的生物相容性、血管内介入物与人的生物相容性、医用电子仪器设备、人体组织器官的三维有限元应力分析、人体组织器官的生物力学特征。

组织构建研究:各器官的组织构建、组织工程与干细胞的相容性、组织工程生物活性因子、组织工程分子生物学、组织器官构建相关因素。

种子细胞研究:干细胞生物学特征、干细胞移植实验、干细胞因子、干细胞实验技术方法、干细胞移植治疗非血液系统疾病。

欢迎上述研究的英文稿件和应用中医药方法研究的相关稿件投稿。

本刊出版周期:一般稿件修回后 6 个月出版,“绿色特快通道”承诺修回稿件 3 个月内出版。咨询电邮:szb100@zgckf.com,电话:024-23389106 024-23384352,传真:024-23381085。投稿电邮:kf23385083@sina.com kf22838105@sina.com。国内订阅邮发代号:8-584;本社订阅:辽宁省沈阳 1200 邮政信箱 邮编:110004。更多信息详见 www.zgckf.com。