

分子鉴定技术在中药中的应用

时圣明, 潘明佳, 王 洁, 陈常青*

天津药物研究院, 天津 300193

摘 要: 对近些年来兴起的分子鉴定技术进行了分析总结, 主要包括随机扩增多态性 DNA (RAPD)、扩增性简单序列重复 (ISSR)、限制性内切酶片段长度多态性 (RFLP)、扩增限制性内切酶片段长度多态性 (AFLP)、单核苷酸多态性 (SNP)、DNA 条形码序列分析等技术。从中药材真伪鉴定、中药材正品与替代品鉴定、中药材多基原鉴定和遗传多样性、中药材产地鉴别、中药材年限鉴别 5 个方面对分子鉴定技术在中药中的应用进展进行了归纳总结, 阐述了分子鉴定技术存在的一些问题及其未来的发展方向。

关键词: 分子鉴定技术; 随机扩增多态性 DNA; 扩增性简单序列重复; 限制性内切酶片段长度多态性; 扩增限制性内切酶片段长度多态性; DNA 条形码; 真伪鉴别; 多基原鉴定; 遗传多样性; 产地鉴别; 年限鉴别

中图分类号: R286.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)17-3121-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.17.027

Application of molecular identification techniques in Chinese materia medica

SHI Sheng-ming, PAN Ming-jia, WANG Jie, CHEN Chang-qing

Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Abstract: The burgeoning molecular identification techniques in recent years have been analyzed and summarized in this paper, such as RAPD, ISSR, RFLP, AFLP, SNP, and DNA barcode sequence analysis techniques. The application of the molecular identification techniques has been summarized in the following five aspects: the identification on the authenticity (true or false), genuine products and substitute, multi base source and genetic diversity, producing area, and growing year discrimination of traditional Chinese medicinal materials, We put forward some technical problems in the molecular identification to be solved and expect the development and prospects in the future.

Key words: molecular identification techniques; RAPD; ISSR; RFLP; AFLP; DNA barcode; authenticity identification; multi base source identification; genetic diversity; identification of producing area; growing year discrimination

中药鉴定技术由浅入深可以分为 4 个主要的发展阶段: 感官评价、显微鉴定、理化鉴定、分子鉴定。近些年来, 分子鉴定技术正逐步成为中药鉴定的主要手段^[1]。分子鉴定技术是指通过直接分析遗传物质 DNA 的多态性来推断物种内在的遗传变异而实现药材鉴定的方法。分子鉴定技术主要包括随机引物 PCR (RP-PCR)、随机扩增多态性 DNA (RAPD)、扩增性简单序列重复 (ISSR)、限制性内切酶片段长度多态性 (RFLP)、扩增限制性内切酶片段长度多态性 (AFLP)、单核苷酸多态性 (SNP)、DNA 条形码序列分析。《中国药典》2010 年版已将蕲蛇和乌梢蛇的分子鉴定作为评价指标^[2]。本文对分子鉴定的主要技术

进行了分析与总结, 对其优缺点与主要用途进行了系统归纳, 分别从中药材真伪鉴定、中药材正品与替代品鉴定、中药材多基原鉴定和遗传多样性、中药材产地鉴别、中药材年限鉴别 5 个方面对分子鉴定技术在中药中的应用进行了归纳总结, 阐述了分子鉴定技术存在的一些问题及其未来的发展方向。

1 分子鉴定技术的分类

分子鉴定技术的发展可以分为基于传统的 Southern 杂交技术的分子标记、以 PCR 为基础的分子标记技术、以重复序列为基础的分子标记技术、以 mDNA 为基础的分子标记技术、DNA 序列分析、DNA 条形码技术。主要分子鉴定技术的特点及用途见表 1。

收稿日期: 2016-01-23

基金项目: 国家自然科学基金资助 (2711001002001)

作者简介: 时圣明 (1984—), 男, 硕士, 研究方向为中药资源及化学成分分析。Tel: 15822753146 E-mail: shism@tjipr.com

*通信作者 陈常青, 男, 研究员, 研究方向为中药学。E-mail: Chencq@tjipr.com

表 1 分子鉴定技术主要特点及用途

Table 1 Features and usages of molecular identification techniques

名称	优点	缺点	主要用途
RP-PCR	易操作、高通量、敏感性高、特异性强	定量准确性弱, 无法避免基因组 DNA, 误差较大	遗传多样性分析、中药材快速鉴定
RFLP	标记数目无限, 大部分标记共显性, 任何生育期均可预测, 不受环境影响, 高度变异性	准确性低, 易产生假象	品种鉴定、多样性分析
RAPD	无需专门扩增反应引物, 退火温度低, 需要 DNA 样本少, 简便、易行	稳定性差, 重复性差, 准确性差	多样性分析、基原鉴定、DNA 指纹图谱建立
DNA 扩增指纹技术 (DAF)	引物浓度高, 引物长度更短, 多态性更丰富, 经济、有效	操作较复杂, 费用较高	指纹图谱构建
相关序列扩增多态性 (SRAP)	操作简便, 易于实现自动化	对着丝粒附近及端粒的扩增少	品种鉴定、多样性分析
AFLP	快速、可靠、稳定, 银染代替放射性同位素	费用昂贵, 要求操作技术高	品种鉴定、多样性分析
SSR	数量丰富, 具有较多等位性变异, 共显性标记, 重复性好	需要预先知道重复序列, 开发难度高, 费用高	品种鉴定、多样性分析、指纹图谱构建、遗传育种
ISSR	显性表现, 通用性好, 稳定性高, 无需预先克隆和测序	准确性稍弱	品种鉴定、多样性分析、指纹图谱构建、遗传育种
DNA 条形码技术	不受形态特征和生物个体发育限制, 检测样本范围广, 高效、准确、易于实现自动化和标准化	不是所有药材均具有 DNA 差异烙印	品种鉴定、多样性分析、指纹图谱构建、遗传育种

1.1 基于传统的 Southern 杂交技术的分子标记

主要有 RFLP、单链构象多态性 RFLP (SSCR-RFLP)、变性梯度凝胶电泳-RFLP (DGGE-RFLP)^[1]。

1.2 以 PCR 为基础的分子标记技术

主要包括 RAPD、标记位点测序 (STS)、特征扩增区段测序 (SCAR)、RP-PCR、寡核苷酸引物 PCR (OP-PCR)、单链构象多态性 (SSCR-PCR)、小寡核苷酸 DNA 分析 (SODA)、DNA 扩增产物指纹分析 (DAF)、AFLP, 其中 AFLP 的应用比较广泛。AFLP 是基于 PCR 技术扩增基因组 DNA 限制性片段, 基因组 DNA 先用限制性内切酶切割, 然后将双链接头连接到 DNA 片段的末端, 接头序列和相邻的限制性位点序列, 作为引物结合位点。限制性片段用 2 种酶切割产生, 一种是罕见切割酶, 一种是常用切割酶。它结合了 RFLP 和 PCR 技术特点, 具有 RFLP 技术的可靠性和 PCR 技术的高效性。由于 AFLP 扩增可使某一品种出现特定的 DNA 谱带, 而在另一品种中可能无此谱带产生, 因此, 这种通过引物诱导及 DNA 扩增后得到的 DNA 多态性可作为一种分子标记^[3]。

1.3 以重复序列为基础的分子标记技术

主要有卫星 DNA (重复单位为几百至几千碱基

对)、小卫星 DNA (重复单位为大于 5 bp)、微卫星 DNA (重复单位为 2~5 bp)、串珠式重复序列。其中广泛应用的 ISSR 技术就属于微卫星 DNA 的一种。ISSR 是 Zietkeiwitz 等^[4]于 1994 年发展起来的一种微卫星基础上的分子标记。其基本原理是用锚定的微卫星 DNA 为引物, 即在 SSR 序列的 3' 端或 5' 端加上 2~4 个随机核苷酸, 在 PCR 反应中, 锚定引物可引起特定位点退火, 导致与锚定引物互补的间隔不太大的重复序列间 DNA 片段进行 PCR 扩增。所扩增的 inter SSR 区域的多个条带通过聚丙烯酰胺凝胶电泳得以分辨, 扩增谱带多为显性表现。

1.4 以 mtDNA 为基础的分子标记技术

主要有差异显示、逆转录 PCR (RT-PCR)、差异显示逆转录 PCR (DDRT-PCR)、特征性差异分析 (RDA) 等, 其中 RT-PCR 技术应用比较广泛。RT-PCR 或者称反转录 PCR, 是 PCR 的一种广泛应用的变形。在 RT-PCR 中, 一条 RNA 链被逆转录成为互补 DNA, 再以此为模板通过 PCR 进行 DNA 扩增^[5]。

1.5 DNA 序列分析

主要包括线粒体 DNA 序列分析、叶绿体 DNA 序列分析、核基因序列分析等。

1.6 DNA 条形码技术

DNA 条形码技术是利用标准的一段或几段短的基因组 DNA 片段对生物物种进行快速和准确鉴定的技术^[6]。DNA 条形码技术具有高效、准确、易于实现自动化和标准化的优点,克服了对专家及经验的依赖,可以简易化、准确化地对中药进行分析鉴定。目前采用 DNA 条形码对植物类中药进行分子鉴定,多以 ITS2 序列为主,以 psbA-trnH 序列为辅;动物类中药鉴定多以 COI 序列为主,ITS2 为辅助序列。

2 分子鉴定技术在中药中鉴定的应用

分子鉴定技术在中药中的应用主要表现为真伪鉴定、正品与替代品鉴定、多基原鉴定和遗传多样性、产地鉴别、年限鉴别 5 个方面。

2.1 在中药材真伪鉴定中的应用

采用显微鉴定中药材真伪方法简便,但是对鉴定人的技术水平要求较高,科学依据也不强,化学计量法鉴别中药真伪又比较费时费力。近些年来越来越多的研究者发现,采用分子鉴定技术鉴定中药材真伪方法准确性高,而且比较省时。如蕲蛇^[2]、乌梢蛇^[2]、重楼^[7]、人参^[8]、西洋参^[9]、三七^[10]、紫苏^[11]等都有采用分子鉴定技术进行真伪鉴定的报道。

李雪等^[12]以辽藁本 *Ligusticum jeholense* Nakai et Kitag、新疆藁本 *Conioselinum vaginatum* (Spreng.) Thedllung 及藁本混伪品白芷 *Angelica dahurica* (Fisch. ex Hoofm.) Benth. et Hook. f. ex. Franch. et Savat、石防风 *Peucedanum terebinthaceum* (Fisch.) Fisch. ex Turcz.、当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 为鉴定材料,提取总 DNA,利用 4 对候选序列(Nr ITS、ITS2、acc D 和 trn H-psb A)分别进行 PCR 扩增,产物进行双向测序。得到的序列采用 Codon Code Aligner V2.06 进行拼接,Clustal X2.1 进行多序列比对,MEGA 5.0 计算 K-2-P 距离,构建系统发育树。结果表明,Nr ITS 和 ITS2 序列能够鉴别辽藁本与新疆藁本及其他混伪品。

罗沛宜等^[13]对 25 份当归及其混伪品材料的 trnL-F 和 rpoC1 序列进行扩增、测序。对序列进行比对、分析,计算材料间的遗传距离并构建系统进化树。结果表明,trnL-F 序列在长度变化范围,变异位点和信息位点个数及遗传距离变异幅度上均大于 rpoC1 序列。trnL-F 序列数据显示,当归及其混伪品材料碱基具有显著差别,具有 1 个特异鉴别 SNP 位点和 1 个 A 碱基重复的特异鉴别区域。当归

与混伪品间遗传距离在 0.002~0.231。通过 trnL-F 序列重建的系统发育树能将当归与混伪品有效地区分开。rpoC1 序列比对结果无法找出当归及其混伪品间的差异位点,同时其构建系统进化树也无法区别当归及其混伪品。rpoC1 序列对当归及其混伪品间的鉴别作用不佳,而 trnL-F 序列能成功鉴定当归及其混伪品,可作为当归及混伪品的分子鉴定方法。

张春等^[14]利用 ISSR-PCR 方法对采集和购买的 26 份当归及其混伪品进行基因组多态性分析,从 100 条内部简单重复序列引物中筛选出 10 条多态性好、稳定性高的引物对所有材料进行扩增,共获得 96 条带,扩增片段大小介于 200~2 100 bp,多态性条带 85 条,占总扩增片段的 88.54%。引物 UBC848 能扩增出 1 条当归的特异性条带,引物组合 UBC848 和 UBC834 可以将正品当归与其混伪品材料区分开来。市售 3 个未鉴别品种均为当归伪品。根据内部简单重复序列技术分析找到了当归及其混伪品间的特异鉴别引物,4 条引物能反映不同来源当归间存在遗传多样性。

2.2 在中药材正品与替代品鉴定中的应用

正品是指药典正式收载的药材,替代品是指与正品亲缘关系较近且药效相似而药典没有收录的药材。分子鉴定技术也可将二者区分开来。康信聪^[15]采用 SRAP、ISSR、SCoT 分子标记及 ITS 序列 4 种分子鉴定技术对冬虫夏草及其替代品北冬虫夏草进行鉴定,比较发现 SRAP 标记、ISSR 标记多态性高达 100%,所有菌株都能有效区分,且总体状况一致,可作为北冬虫夏草菌株种内、种间鉴定。而 ITS 序列则不能够有效区分二者。

彭禄等^[16]通过对 17 个种共 26 个独活样本的 ITS 序列进行 PCR 扩增和测序。26 个样本聚集为 5 大类群,综合分析后将 17 种独活归为 4 大类:重齿毛当归 *Angelica pubescens* Mxsim. 的 ITS 序列具有特征碱基片段,可明显区别于其他样本;除牛尾独活类中 3 个样本不能通过 ITS 序列鉴定到种以外,其他样本均可以通过 ITS 序列鉴定到种。ITS 序列可为药用独活的鉴定和分类提供有力证据,四带芹类可以作为独活的首选替代品,牛尾独活类其次,九眼独活为最优之选。

王景等^[17]在利用 SNP 分子标记建立多重 PCR 体系,实现人参品种大马牙的分子鉴定中,只有大马牙产生了 410 bp 的特异性条带。将条带切胶回收并经克隆测序验证,该条带确实由大马牙特异性引

物 Da F 和 Cox1 R 扩增得出。建立的多重 PCR 体系可有效地实现大马牙的快速鉴定, 并有望作为大马牙鉴定和田间纯化的一种有效的技术手段。

2.3 在中药材多基原鉴定和遗传多样性中的应用

采用分子鉴定技术鉴定中药基原的研究比较多, 如采用 ISSR 技术考察黄芩^[18]、贝母^[19]、枇杷^[20]、太子参^[21]等药材的遗传多样性, 采用 RAPD 技术对溪黄草^[22]及基原植物进行分类鉴定。

高晓霞等^[23]以白木香、商品沉香及人工诱导沉香为材料, 对其进行醇溶性浸出物测定、性状及显微鉴别, 提取总 DNA、扩增 rDNA ITS2 片段并直接测定序列, MEGA 5.0 软件计算种内、种间 Kimura 2-parameter (K2P) 遗传距离, 并进行系统发育分析, 构建邻接树和最大简约树。结果表明, 人工沉香、商品沉香醇溶性浸出物量均高于 10%, 性状和显微鉴别均符合《中国药典》2010 年版一部有关规定。沉香种内平均 K2P 遗传距离为 0~0.003, 种间平均 K2P 遗传距离为 0.005~0.023。白木香、人工沉香和商品沉香在系统发育树上聚为一支。在沉香性状、显微和理化鉴别、浸出物量分析的基础上, 基于 ITS2 条形码序列可以准确鉴别沉香基原植物, 为商品沉香的鉴定提供分子生物学依据。

徐红等^[24]对产于我国甘肃省的中药秦艽的 3 种基原植物秦艽、麻花秦艽与小秦艽进行 RAPD 分析, 建立具有鉴别意义的 DNA 指纹图谱。从 80 条 RAPD 引物中筛选出 4 条具有鉴别意义的多态性引物, 在 3 种秦艽中共得到 39 个 DNA 条带, 其中共有条带 2 条, 多态条带 37 条。据此获得了能有效区别 3 种秦艽的多态性 RAPD 指纹谱。

李华等^[25]采用 ISSR 分子标记技术对来自全国 12 个省市不同生态环境的 48 份绞股蓝种质材料进行遗传多样性及亲缘关系分析。结果 100 条 ISSR 引物中共筛选出 15 条扩增条带清晰、稳定性好且多态性明显的引物, 48 份材料 DNA 扩增共获得 214 个位点, 其中多态位点 206 个, 多态性比率 96.26%, 平均每条引物扩增位点为 14.27 个; 平均观察等位基因数、有效等位基因数、Shannon 多样性信息指数和 Nei's 基因多样性指数分别为 1.962 6、1.335 8、0.221 1 和 0.359 8; 种质材料间的遗传相似系数变幅为 0.57~0.96, 平均为 0.72。利用 UPGMA 聚类分析, 以遗传相似系数 0.71 为界, 48 份材料聚为 4 大类。结论绞股蓝种质材料间的遗传多样性较高, 种质间的亲缘关系与其地理分布和生态环境并不完全一致。

王梦亮等^[26]用 CTAB 法提取基因组 DNA, 然后通过筛选得到的 11 个 RAPD 及 11 个 ISSR 引物对不同采集地的 4 种野生红景天进行遗传多样性分析。结果表明, 11 条 RAPD 引物共扩增出 96 条条带, 多态性百分比为 90.62%; 11 条 ISSR 引物共扩增出 102 条条带, 多态性百分比为 100%。ISSR 多态性的检测能力优于 RAPD; 聚类分析结果表明, ISSR、RAPD 和 ISSR 联用法均将 17 个样品聚为 3 大类; RAPD 将样品聚为 4 大类。2 种标记均可用于红景天属植物种间亲缘关系与种内遗传多样性研究; 4 种红景天种内存在一定的遗传差异, 种间基因流较小。

马艳芝等^[27]以取自不同省份的 11 份柴胡干品为材料, 提取其基因组 DNA, 进行 ISSR 分析, 利用 DPS (V7.5) 软件计算遗传距离, 利用 UPGMA 方法进行聚类分析, 构建 11 份柴胡样品的系统进化树。同时, 利用 ITS 引物对柴胡样品进行 PCR 扩增和测序, 利用 DNAMAN 软件分析 11 份柴胡种质的 ITS 序列, 对其遗传相似性进行鉴定。11 份柴胡样品间遗传距离为 0.458 8~0.782 2, 表明这 11 份柴胡样品间遗传基础较狭窄; 聚类结果将 11 份柴胡样品分成 2 大类, 大部分来源相同或相近的柴胡样品聚在一起。ITS 序列分析结果表明, 11 份柴胡样品的 ITS 序列均长 321 bp, 也可以分为 2 类, 部分柴胡样品存在同质异名现象。利用 ITS 技术或将其与 ISSR 标记相结合对柴胡种质资源进行鉴定和分析, 可以提高柴胡种质资源鉴定的准确性和效率。

卢家仕等^[28]采用 ISSR 分子标记技术和非加权平均距离法 (UPGMA) 对 24 份石斛属样品进行遗传多样性和聚类分析。从 100 条 ISSR 引物中共筛选出 6 条多态性稳定、清晰的引物, 24 份石斛样品共扩增出 847 个 DNA 片段, 平均每个引物扩增出 141 个 DNA 片段, 其多态性为 100%。结果表明, 24 份不同产地石斛样品被划分为 6 个类群, 遗传多样性非常丰富。

2.4 在中药材产地鉴别中的应用

中药的产地即中药道地性对中药的质量影响很大, 所以对中药材的产地鉴定尤其重要。近年来, 人们采用分子鉴定技术对中药进行产地鉴定的研究非常多。徐红等^[29]采用 ISSR 技术对不同产地丹参药材进行道地鉴别; 宋雯舒等^[30]采用 DNA 分子标记技术结合 HPLC 法对不同产地金银花进行了鉴定; 孙稚颖等^[31]采用 ISSR-PCR 分子标记技术研究对不同产地的菘蓝进行鉴定。

朱田田等^[32]应用 ISSR 分子标记技术对甘肃省不同产区 41 个居群的栽培当归样本进行分析,利用 Popgene 32 软件分析 Nei's 基因多样性指数等遗传信息参数,应用 Ntsys 软件构建亲缘关系 UPGMA 聚类图。结果表明,8 条引物共检测到 154 个位点,其中多态性位点 119 个,多态位点百分率为 77.27%。栽培当归居群间的多样性指数为 0.222 9, Shannon's 多样性信息指数为 0.337 4, 种群间基因分化系数为 0.683 9, 基因流为 0.231 1, 遗传距离变化范围 0.042 9~0.327 8。这说明,甘肃栽培当归遗传多样性在物种水平上较高;居群间遗传多样性水平明显高于居群内;居群间遗传分化程度大,且基本无基因交流。

魏晓雨等^[33]采用 RAPD 和 ISSR 分子标记技术对我国 10 个产地的西洋参 *Panax quinquefolium* L. 的遗传多样性进行分析,13 条 RAPD 引物共扩增出 97 条清晰条带,多态性条带 81,多态性百分率为 85.51%;12 条 ISSR 引物共扩增出 99 条清晰条带,多态性条带 64,多态性百分率为 64.65%;通过聚类分析,RAPD 及 RAPD+ISSR 综合将样品聚为 4 大类;ISSR 将样品聚为 2 大类。结果表明,RAPD 和 ISSR 标记构建的样品聚类树状图在分类上稍有差异,但总体趋势一致。在 ISSR 上,人参与西洋参被明显区分开来,吉林兴参镇与北岗镇西洋参与人参聚为一大类;在生长环境及种植条件影响下,东北部分产地西洋参与加拿大西洋参相比在遗传多样性上有所改变。

2.5 在中药材年限鉴别中的应用

Dai 等^[34]提取人参细胞中的 DNA,利用端粒长度和端粒酶活性对人参生长年限进行鉴别,通过染色体末端限制片段 (TRFs) 分析人参平均端粒长度发现,自第 2 年起,人参端粒长度随其年限的延长而增长,并在此基础上建立了人参年限与端粒长度相关的数学模型。

吴文如等^[35]采集不同生长年限、不同品种和产地的人参样品,提取 RNA,逆转录为 cDNA。采用巢式 PCR 进行扩增,根据人参达玛烯二醇合成酶基因 cDNA 保守序列设计 1 组引物用于第 1 轮 PCR,2 组 DS 基因上下游分段引物用于第 2 轮 PCR,扩增产物直接测序。57 份人参样本共获得 111 个符合测序要求的 DS 基因上下游分段 PCR 产物,其中测序成功 103 个,序列经 BLAST 判定为人参 DS 基因,经多重比对,发现 6 个样品存在 7 个 SNP 位点。建

立了巢式 PCR-直接测序法发掘人参 DS 基因 cDNA 序列的 SNP,方法具有特异性好、操作简单、结果准确等优点,可用于检测人参样品的 DS 基因是否含有 SNP 及其类型,这可为人参及其相关药材和产品的质量评价新方法研究提供有价值的遗传研究工具和分子标记资源。

杨星宇等^[36]通过对水杉不同年限及不同部位的木材 DNA 提取及片段扩增实验,结果显示改良后的十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 法、SDS 法及高盐低 pH 法均可以用于水杉木材 DNA 的提取,经过纯化后的木材 DNA 可以进行片段扩增。在提取木材 DNA 过程中,边材比心材更适合,所提取的 DNA 数量和质量更有保障;实验显示水杉木材 DNA 分子大多为 23 kb。运用 DNA 条形码筛选分析、序列特征分析、遗传距离秩和检验、barcoding gap 检验,进行木材 DNA 分子系列物种鉴定,结果表明序列 ITS2、trnL-F 比较适合其 DNA 条形码技术要求,可以作为水杉木材鉴定序列。

3 分子鉴定技术在中药中应用的问题与前景

3.1 分子鉴定技术在中药中应用的问题

近些年来,中药分子鉴定技术被广泛应用,得到了快速的发展。但发展同时,也遇到了一些需要解决的问题。肖小河等^[37]在关于道地药材分子鉴定时指出,目前 DNA 分子遗传标记技术在道地药材鉴定中受到 2 个方面的局限:一是来自技术本身的,如目标基因的真实性与 DNA 同源性,DNA 分子标记结果的重现性和稳定性;二是来自研究对象的,不是所有的道地药材形成都会留下 DNA 差异“烙印”,同时这种 DNA 差异也不见得与道地性的形成有直接或间接的相关。随着分子系统学研究的深入和 DNA 条形码技术的广泛应用,第一个问题已经得到了解决,陈士林团队^[38]发现的 ITS2 序列能真实反映所鉴定中药的遗传本质,并且具有良好的稳定性和重现性。但是,第 2 个问题仍然困扰着中药的分子鉴定。Meyer 等^[39]认为,准确的物种分子鉴定,是利用已知物种的分子序列与未知样品序列进行比较从而判断其归属的过程,这就要求首先构建一个充分体现种内变异和种间分化的完整的参考序列数据库,用以进行系统进化分析和准确的物种界定。

3.2 分子鉴定技术在中药中应用的前景

黄璐琦^[40]将分子生物学与中药资源研究有机结合,应用 Cytb 序列对蕲蛇和乌梢蛇进行 PCR 扩增鉴别,有效地将二者区分,此方法已经被《中国

药典》2010 年版收录。陈士林等^[38]研究 ITS2 序列已经被广泛应用于中药鉴定研究中,大量的 ISSR、RAPD、AFLP 技术在中药材遗传多样性方面也已经成熟,这说明中药的分子鉴定时代的到来。虽然目前分子鉴定技术还属于起步和发展阶段,但随着科学的进步和广大研究者的不断努力,相信分子鉴定技术将成为中药材鉴定的主流技术,为中国中医药走向世界提供有力的支持与保障。

参考文献

- [1] 黄璐琦,刘昌孝.分析生药学[M].北京:科学出版社,2015.
- [2] 中国药典[S].一部.2010.
- [3] Zabeau M, VOS P. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting: European Patent, 92402629.7 [P]. 1993.
- [4] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification [J]. *Genomics*, 1994, 20(2): 176-183.
- [5] Montgomery R A, Dallman M J. Semi-quantitative polymerase chain reaction analysis of cytokine and cytokine receptor gene expression during thymic onyogeny [J]. *Cytokine*, 1997, 9(10): 717-726.
- [6] 陈士林,庞晓慧,罗 琨,等.生物资源的 DNA 条形码技术 [J]. *生命科学*, 2013, 25(5): 458-466.
- [7] 朱英杰,陈士林,姚 辉,等.重楼属药用植物 DNA 条形码鉴定研究 [J]. *药学报*, 2010, 45(3): 376-382.
- [8] 孙 涛,滕少娜,孔德英,等. DNA 条形码技术应用于人参鉴定 [J]. *中国生物工程杂志*, 2013, 33(4): 143-148.
- [9] 王 昆.西洋参根 cDNA 文库构建及鉴定 [D].长春:东北师范大学,2006.
- [10] 廖保生,王丽丽,王晓玥,等.基于分子身份证的三七药材快速鉴定方法 [J]. *中国药学杂志*, 2015, 50(22): 1954-1959.
- [11] 夏至,李贺敏,张红瑞,等.紫苏及其变种的分子鉴定和亲缘关系研究 [J]. *中草药*, 2013, 44(8): 1027-1032.
- [12] 李 雪.辽蒿本 DNA 条形码鉴定及规范化种植技术研究 [J].北京:中国农业大学,2015.
- [13] 罗沛宜,罗 茂,朱 烨,等.基于叶绿体 trnL-F 和 rpoC1 序列对当归及其混伪品的分子鉴定研究 [J]. 2015, 50(10): 840-845.
- [14] 张 春,朱 烨,何 颖,等.基于内部简单重复系列 (ISSR) 分析的当归分子鉴定 [J]. *中国药学杂志*, 2014, 49(10): 812-816.
- [15] 康信聪.北冬虫夏草菌株鉴定与遗传多样性的分子标记研究 [D].长沙:湖南农业大学,2011.
- [16] 彭 禄,余 岩,王志新,等.基于 ITS 序列对独活 17 个种的分子鉴定 [J]. *中草药*, 2013, 44(12): 1648-1653.
- [17] 王 景,张甜甜,李 萌,等.利用 SNP 分子标记对人参品种大马牙的特异鉴定研究 [J]. *中药材*, 2015, 38(11): 2298-2300.
- [18] 文苗苗,李桂双,张龙进,等.黄芩种质资源 ISSR 遗传多样性的分析及评价 [J]. *植物研究*, 2012, 32(1): 32-37.
- [19] 李 敏,黄龙妹,赵 欣,等.浙贝母特异性 PCR 鉴定方法研究 [J]. *中草药*, 2014, 45(12): 1754-1757.
- [20] 王永清,付燕,杨 芩,等.枇杷属植物遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. *林业科学*, 2010, 46(4): 49-57.
- [21] 肖承鸿,周 涛,江维克,等.栽培太子参的遗传多样性与质量分析 [J]. *中草药*, 2014, 45(9): 1319-1325.
- [22] 莫小路,曾庆钱,黄珊珊,等.应用 RAPD 技术对溪黄草基原植物分类鉴定 [J]. *中药材*, 2012, 35(9): 1388-1391.
- [23] 高晓霞,刘少烽,陈晓东,等.基于 ITS2 条形码序列鉴定商品沉香基源植物 [J]. *时珍国医国药*, 2015, 26(8): 1932-1935.
- [24] 徐 红,王峥涛,胡之璧.甘肃产秦艽的 DNA 指纹图谱鉴别 [J]. *国外医药·植物药分册*, 2008, 23(3): 93-95.
- [25] 李 华,史美荣,肖娅萍.绞股蓝种质资源遗传多样性及亲缘关系的 ISSR 分析 [J]. *中草药*, 2015, 46(11): 1666-1672.
- [26] 王梦亮,任晓琳,崔晋龙,等.野生红景天的 RAPD 和 ISSR 遗传多样性分析 [J]. *中草药*, 2016, 47(3): 469-473.
- [27] 马艳芝,客绍英.不同柴胡种质资源的 ISSR 和 ITS 序列分析 [J]. *西北农林科技大学学报*, 2015, 43(1): 193-200.
- [28] 卢家仕,卜朝阳,吕维莉,等.不同产地石斛属种质资源的 ISSR 遗传多样性分析 [J]. *中草药*, 2013, 44(1): 96-100.
- [29] 徐 红,王燕燕,魏丹红,等.不同产地丹参药材的 ISSR 分析与鉴别 [J]. *中国新药与临床药理*, 2007, 18(6): 454-457.
- [30] 宋雯舒,张 晨,甘 亮,等. HPLC 含量测定和 DNA 分子标记技术对不同产地金银花的鉴定 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(17): 59-62.
- [31] 孙稚颖,姚 辉.不同产地菘蓝 ISSR 分析与鉴定 [J]. *中草药*, 2014, 45(22): 3323-3326.
- [32] 朱田田,晋 玲,张裴斯,等.基于 ISSR 的甘肃不同产区栽培当归遗传多样性研究 [J]. *中草药*, 2015, 46(23): 3549-3557.
- [33] 魏晓雨,田义新,赵智灵,等.不同产地西洋参种质遗传多样性的 RAPD 和 ISSR 分析 [J]. *中草药*, 2014, 45(21): 3153-3158.
- [34] Dai Z B, Wang B B, Liu Y, *et al.* Producing aglycons of ginsenosides in bakers' yeast [J]. *Sci Rep*, 2015. doi: 10.1038/srep03698.
- [35] 吴文如,刘 良,黄宝明,等.采用巢式 PCR-直接测序法分析人参达玛烯二醇合成酶基因单核苷酸多态性 [J]. *中草药*, 2015, 46(14): 2127-2133.
- [36] 杨星宇,杨路路,余志伟,等.水杉木材 DNA 提取及条形码分子鉴定 [J]. *湖北大学学报*, 2011, 33(4): 397-403.
- [37] 肖小河,陈士林,黄璐琦,等.中国道地药材研究 20 年概论 [J]. *中国中药杂志*, 2009, 34(5): 519-526.
- [38] 陈士林,姚 辉,韩建萍,等.中药 DNA 条形码分子鉴定 [M].北京:人民卫生出版社,2012.
- [39] Meyer C P, Paulay G. DNA barcoding: Error rates based on comprehensive sampling [J]. *PLoS Biol*, 2005, 3(12): 2229-2238.
- [40] 黄璐琦.分子生药学[M].北京:北京大学医学出版社,2000.