

中药材种子 DNA 条形码鉴定研究进展

赵 晴¹, 谢红波¹, 赵红玲¹, 赵春颖¹, 谢利德¹, 石林春^{2,3*}, 刘金欣^{1,2*}

1. 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

2. 中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193

3. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700

摘 要: 种子是中药产业的源头, 中药材种子的准确鉴定不仅关系到中药材的真伪, 更关系到中药的安全性和有效性。由于多数中药材种子体积较小、内含物丰富、形态特征易受种子成熟度和环境条件的影响, 难以通过传统方法进行有效鉴定。DNA 条形码技术利用一段标准的 DNA 序列从基因层面对物种进行鉴定, 不受环境等外部因素影响, 具有通用、快速、准确等特点, 逐渐成为中药材种子鉴定的研究热点。简述了 DNA 条形码技术在中药材种子鉴定中的研究现状, 分析了中药材种子 DNA 条形码鉴定的技术要点, 总结了不同类型中药材种子进行 DNA 条形码鉴定的原则, 并提出了利用宏条形码技术鉴定市售混合中药材种子的研究方法, 为中药材种子鉴定提供新的研究思路。

关键词: 中药材; 种子; DNA 条形码; 宏条形码; 分子鉴定

中图分类号: R282.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)14-3471-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.14.030

Advances in identification of traditional Chinese medicinal materials seeds using DNA barcoding technology

ZHAO Qing¹, XIE Hong-bo¹, ZHAO Hong-ling¹, ZHAO Chun-ying¹, XIE Li-de¹, SHI Lin-chun^{2,3}, LIU Jin-xin^{1,2}

1. Hebei Key Laboratory of Study and Exploitation of Chinese Medicine, Chengde Medical University, Chengde 067000, China

2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

3. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

Abstract: Seeds are the source of the Chinese medicine industry. The accurate identification of seeds is not only related to the genuineness of Chinese medicinal materials, but also related to the safety and effectiveness of traditional Chinese medicine. Since a large proportion of Chinese medicinal material seeds are small in size, rich in inclusions, and their morphological characters are easy to be changed by the grade of maturity and environmental conditions, it is difficult to identify seeds through traditional methods. DNA barcoding is a novel genetic method designed for accurate species identification using a standard DNA locus, and it has gradually become a research hotspot for the seed authentication of Chinese medicinal materials. In this paper, we briefly summarized the recent research developments of the DNA barcoding identification for Chinese medicinal material seeds, demonstrate the technical characteristics of using DNA barcoding to authenticate the seeds of Chinese medicinal materials, and pointed out that different protocols should be employed according to the types of seeds. We further proposed a research method for the identification of commercially available Chinese medicinal materials seed mixtures using the DNA metabarcoding, which provides new ideas for the identification of Chinese medicinal material seeds.

Key words: traditional Chinese medicinal materials; seeds; DNA barcoding; DNA metabarcoding; molecular identification

收稿日期: 2018-12-24

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81641136); 国家自然科学基金项目 (81703659); 河北省教育厅青年拔尖人才项目 (BJ201602); 河北省自然科学基金项目 (H2017406031); 河北省三三三人才项目 (A2017002090); 河北省科学技术研究与发展计划 (16232503D); 河北省高校重点学科建设项目 (冀教高 [2013] 4 号); 河北省教育厅在读研究生创新能力培养资助项目 (CXZZSS2019132)

作者简介: 赵 晴, 在读硕士, 从事中药资源相关研究。E-mail: zhaoping_95@163.com

***通信作者** 石林春, 博士, 副研究员, 从事中药资源相关研究。Tel: (010)57833206 E-mail: linchun_shi@163.com

刘金欣, 博士, 副教授, 从事中药资源相关研究。Tel: (0314)2291908 E-mail: liujx_23@163.com

近年来,随着《中医药发展战略规划纲要(2016—2030 年)》《中华人民共和国中医药法》等法规的颁布实施,我国加大了对中医药产业的扶持力度。中药材是中医药传承和发展的物质基础,但野生资源破坏严重^[1],当前主要依赖人工种植供应。同时全国也在大力推进中药材种植产业扶贫政策,中药材的种植规模不断扩大。中药材种子作为中药材种植的源头,存在种源混乱、种质混杂等现象,质量参差不齐,鉴定错误的种子不仅会带来严重的经济损失,也会给临床用药带来极大的安全隐患。

传统中药鉴定方法如基原鉴定、性状鉴定、显微鉴定、理化鉴定,其研究对象主要为基原植物、药材、饮片和中成药,缺乏对中药材种子的系统研究。此外,种子作为药用植物的繁殖器官,多数质量较轻、结构简单、内含物丰富,其形态特征易受种子成熟度和外部环境的影响,难以通过传统方法进行鉴定。DNA 条形码利用一段标准的 DNA 序列从基因层面对物种进行鉴定^[2-3],不受植物生长环境、发育阶段、样品形态和组织部位的限制,弥补了传统中药鉴定方法对于中药材种子鉴定的空缺,逐渐成为中药材种子鉴定的研究热点^[4]。

1 传统方法在中药材种子鉴定中的局限性

传统的中药鉴定方法如基原鉴定、性状鉴定和显微鉴定多利用中药的外观性状和显微特征进行鉴定。与传统中药学鉴定对象不同,中药材种子的形态特征、外观形状和显微特征易受环境和种子成熟度等因素影响,相同物种的种子往往存在形态差异^[5]。理化鉴定多利用药材内含物的理化性质差异进行鉴定,而中药材种子是活的繁殖器官,其内含物会随着种子的成熟、储藏时间以及萌发而消耗,内含物的理化性质也会发生改变。由于中药材种子的特殊性,传统中药鉴定方法仅可以对种子类中药材和部分中药材种子进行鉴定。

2 DNA 条形码技术在中药材种子鉴定中的应用

DNA 条形码技术利用基因组中一段标准的、相对较短的 DNA 片段进行物种鉴定^[6]。2010 年,陈士林等提出 ITS2 为药用植物的通用条形码,相关研究表明 ITS2 序列能够很好地鉴定伞形科^[7]、芸香科^[8]、蔷薇科^[9]、豆科^[10]、菊科^[11]等多个科属的药用植物。在此基础上,陈士林等^[12]建立了以 ITS2 为核心、*psbA-trnH* 为补充序列的药用植物 DNA 条形码鉴定体系,广泛运用于中药鉴定的各个

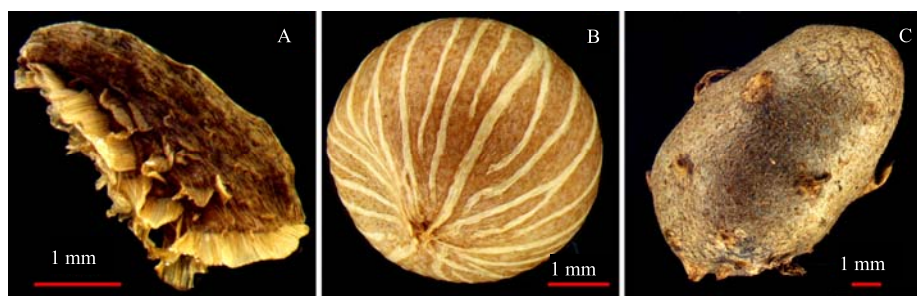
领域,并纳入《中国药典》2015 年版四部^[13],推动了中药鉴定学的“文艺复兴”^[4]。相较于传统方法,DNA 条形码技术以物种的遗传信息为鉴定依据,不受植物生长环境、发育阶段、样品形态和组织部位的限制,具有通用性、客观性、准确性等特点。

2.1 中药材种子 DNA 条形码鉴定的研究现状

2014 年,研究人员采用 DNA 条形码技术分别对种子类药材天仙子和车前子进行鉴定,但其目的是鉴定种子类药材及其混伪品,并非鉴定生产用途的种子^[14-15]。2016 年,刘金欣等^[16]收集 19 份中药材桔梗种子样品,基于 ITS2 序列对桔梗种子进行物种鉴定,结果表明 ITS2 序列可以准确鉴定桔梗种子。泽泻与东方泽泻形态极为相似,传统鉴定方法难以分辨,张娜娜等^[17]基于 ITS2 序列对 56 份泽泻种子的样品进行鉴定,结果表明有 20 份样品为泽泻,36 份样品为东方泽泻。2018 年,石林春等^[18]收集 51 份知母种子样品,对其 ITS2 和 *psbA-trnH* 序列进行测序,基于 BLAST 法、遗传距离法和邻接(NJ)系统发育树法进行物种鉴定,结果显示 51 份样品皆为正品。刘金欣等^[19]通过构建黄芩 ITS2 条形码数据库,利用 DNA 条形码技术对 62 份市售黄芩种子样品进行鉴定,结果发现黄芩、甘肃黄芩和粘毛黄芩在 NJ 系统发育树上分别聚为独立的支,可以相互区分。60 份市售黄芩种子样品为正品,2 份存在真菌污染。此外,还有学者对种子或果实类中药材王不留行^[20]、补骨脂^[21]以及中药材种子北沙参^[22]、羌活^[23]、重楼^[24]、丹参^[25]、人参^[26]等运用 DNA 条形码技术进行了鉴定,都取得了成功。

2.2 不同类型中药材种子 DNA 条形码鉴定的原则

本课题组当前已收集 200 余种中药材种子样品,发现中药材种子的大小存在较大差异(图 1)。实验发现,微小中药材种子,若只取单粒种子进行实验,得到的 DNA 浓度极低,无法满足后续 PCR 扩增要求;体积较大的种子内含物中含有大量淀粉、蛋白质、脂肪,提取的 DNA 杂质多,质量较差;此外,另有部分异花授粉药用植物的种子,受精卵和受精极核可能存在不同的基因型,遗传物质复杂,影响 ITS2 序列的测序质量。因此,不同类型的中药材种子需要采用不同的 DNA 条形码实验流程(图 2)。例如,对于个体较大的种子或部分异花授粉药用植物的种子,由于种皮由珠被发育而来,种皮细胞中的 DNA 与母株相同,取中药材种子的种皮部位提取 DNA 可以避免异花传粉受精导致的杂交和



A-草乌 B-矮地茶 C-山药
A-*Aconiti Kusnezoffii Radix* B-*Ardisiae Japonicae Herba* C-*Dioscoreae Rhizoma*

图 1 不同大小的中药材种子示例

Fig. 1 Different sizes of traditional Chinese medicinal materials seeds

因种子内含物丰富导致提取的 DNA 杂质过多问题。对于个体较小的中药材种子，取种子发芽后的组织进行实验，可以解决因为种子体积过小导致的 DNA 浓度低、质量差这一问题。

3 中药材种子宏条形码鉴定方法

3.1 宏条形码技术的研究进展

传统的 DNA 条形码技术主要用于单个样品的物种鉴定，随着下一代测序技术的发展，2012 年，Taberlet 等^[27]提出了宏条形码技术的构想，即首先提取混合样品的 DNA，扩增 DNA 条形码序列，然后使用下一代测序平台进行高通量测序，最后基于 DNA 条形码的研究策略进行混合样品的高通量鉴定。当前，宏条形码技术已经广泛运用于微生物群落、动植物多样性和中成药处方成分鉴定等的研究^[28-32]。Xin 等^[33]采用宏条形码和单分子实时测序(single molecule real time sequencing, SMRT)测序相结合的方法，对中成药九味羌活丸进行了鉴定，结果表明，该方法可重复、可靠、灵敏地检测九味羌活丸中原药材的基原。王丽丽^[34]提取了人参健脾丸、人参归脾丸、蛇胆川贝胶囊、启脾丸 4 种含有名贵中药材的中成药 DNA，对 ITS2 序列进行了 PCR 扩增，并利用高通量测序技术对 PCR 产物进行了测序，结果表明 4 种中成药中均含有正品中药材的近缘种。Xin 等^[35]利用宏条形码技术对市售龙胆泻肝丸进行了鉴定，发现其中含有木通的混伪品，而化学鉴定方法不能对二者进行区分。石林春等^[36]建立了如意金黄散原料药的数据库，并用宏条形码技术对如意金黄散中的原料药材进行鉴定，结果表明，该技术可检测到除厚朴外的全部处方成分，其中苍术药材掺杂了混伪品朝鲜苍术，天南星药材掺杂了混伪品虎掌南星，提示如意金黄散临床使用的有效性和安全性存在潜在风险。Valentini 等^[30]收集了 53 种两栖类和 86 种

鱼类使用特异性引物对其进行了宏条形码测序，实验结果表明，这两对引物成功地扩增样本中所有两栖类和鱼类的 DNA，在淡水鱼种类中，81%鉴定到了种，14%鉴定到了属，5%鉴定到了科；在海洋鱼类中，有 68%鉴定到种，32%鉴定到科。Arulandhu 等^[37]建立了包含 12 个条形码序列的多重宏条形码技术，该技术可以识别出自制混合样品和市售中成药中大多数植物和动物种类，包括含量为 1%的原料。

上述研究表明，宏条形码技术可以准确鉴定混合样品中的物种，进行多样性分析，这也使大量种子的物种构成和纯度分析成为可能，为中药材种子质量评价提供新的技术手段。

3.2 中药材种子宏条形码鉴定流程

基于宏条形码技术的研究策略，结合中药材种子自身的特点，本课题组提出中药材种子的宏条形码鉴定流程，即按照“五点取样法”获得每份种子的代表性样品，进行混合种子的总 DNA 提取，DNA 提取可重复数次以保证提取到所有种子的 DNA；为每份样品设计特异性序列标签(MID)并连接到引物的 5'端以实现大量样品的同时检测，分别进行 3 次独立的 PCR 扩增，合并 3 次扩增产物，使用琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物，使用纯化试剂盒进行 PCR 产物纯化；Qubit 精确测定浓度后，等量混合所有样品，使用下一代测序平台进行建库测序；利用质量控制软件进行测序质量检测，并去除低质量序列，根据 MID 区分并提取不同样品的序列，使用 BLAST 方法或其他方法与 DNA 条形码数据库进行比对，对每份种子样品的物种构成进行分析，最终建立基于宏条形码技术的中药材种子群体鉴定方法(图 2)。

4 结语

当前，中药材种子市场比较混乱，其混乱的原

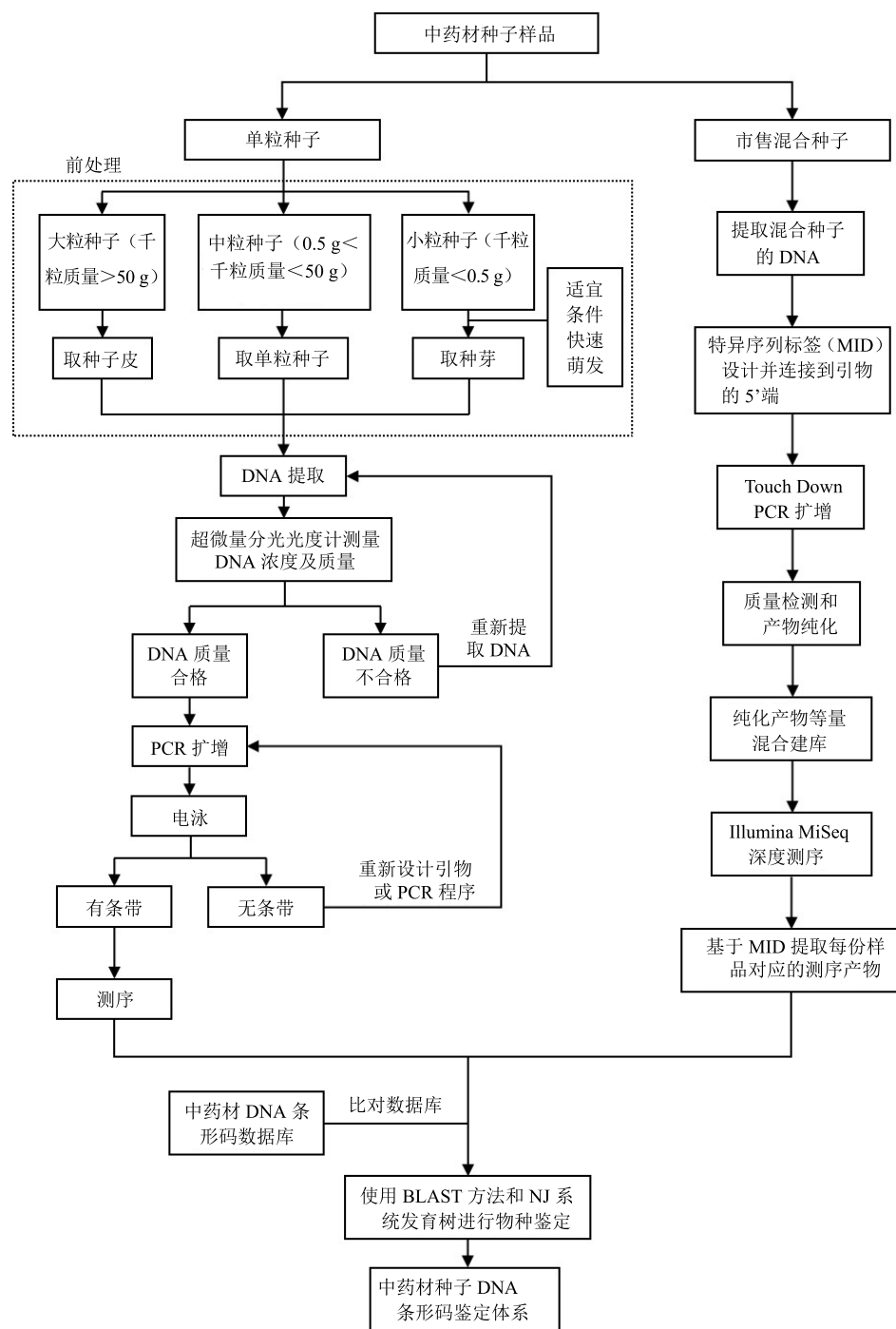


图 2 不同类型中药材种子鉴定的流程

Fig. 2 Flow chart of traditional Chinese medicinal materials seeds identification

因^[38]主要有：①中药材品种繁多，各地用药习惯不统一，同物异名、同名异物药材十分常见。例如，益母草在江苏某地区称为天芝麻，浙江称三角胡麻，青海称千层塔等；《中国药典》规定狼毒为大戟科植物月腺大戟或狼毒大戟的干燥根，与瑞香科狼毒属植物狼毒同名，两者皆有剧毒性，极易混淆。②缺乏专业的中药材种子市场，中药材种子从业人员专业

素质参差不齐。③行业管理和质量监督力量薄弱，中药材种子依照农作物种子管理，多数中药材种子缺乏国家质量标准。④缺乏系统的中药材种子鉴定方法。

由于中药材种子自身的特点，利用传统方法鉴定中药材种子具有一定局限性，DNA 条形码鉴定技术为中药材种子鉴定提供了新的手段，具有诸多优

点。DNA 条形码技术依靠生物的遗传信息进行鉴定,可以避免由于中药材种子外观性状和内含物的变化给鉴定结果带来的失误^[5-6]。同时,DNA 条形码技术易于构建统一的 DNA 条形码序列数据库,不受环境的影响和经验的限制^[39-40]。基于 DNA 水平的分子鉴定技术有望实现种子鉴定的标准化和自动化,促进中药材种子产业的程序化和规范化,将在中药材栽培前物种确定、种质资源库建设、中药材种子流通管理等领域发挥作用^[41]。

传统的 DNA 条形码技术只能对单一物种进行鉴定,对于大量种子的群体鉴定和纯度分析存在困难。随着高通量测序技术的发展,使快速大量地获取样品遗传信息成为可能。宏条形码技术结合了 DNA 条形码技术和高通量测序技术的各自优点,可以对混合样本中所有物种的 DNA 片段进行同时检测,可以应用于在市售中药材种子的群体鉴定中。可以预见,这项技术将会给中药材种子鉴定技术的发展带来新的契机,将大大推进我国中药材种子鉴定规范化建设进程。

参考文献

- [1] 桑滨生.《中医药发展战略规划纲要(2016—2030年)》解读[J].世界科学技术—中医药现代化,2016,18(7):1088-1092.
- [2] Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes [J]. *Proceed Royal Soc London Series B: Biol Sci*, 2003, 270(1512): 313-321.
- [3] Hebert P D N, Penton E H, Burns J M, et al. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator* [J]. *Proceed Nat Acad Sci*, 2004, 101(41): 14812-14817.
- [4] 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.
- [5] 肖娟.不同生境白筋种子形态、品质特征和种子萌发特性的研究[J].中药材,2014,37(5):731-736.
- [6] Chen S, Yao H, Han J, et al. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species [J]. *PLoS One*, 2010, 5(1): e8613.
- [7] Liu J, Shi L, Han J, et al. Identification of species in the angiosperm family Apiaceae using DNA barcodes [J]. *Mol Ecol Res*, 2014, 14(6): 1231-1238.
- [8] 罗煜,陈士林,陈科力,等.基于芸香科的植物通用DNA条形码研究[J].中国科学:生命科学,2010,40(4):342-351.
- [9] Pang X H, Song J, Zhu Y, et al. Applying plant DNA barcodes for rosaceae species identification [J]. *Cladistics*, 2011, 27(2): 165-170.
- [10] Gao T, Yao H, Song J, et al. Identification of medicinal plants in the family Fabaceae using a potential DNA barcode ITS2 [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 130(1): 116-121.
- [11] Gao T, Yao H, Song J, et al. Evaluating the feasibility of using candidate DNA barcodes in discriminating species of the large Asteraceae family [J]. *BMC Evol Biol*, 2010, 10: 324.
- [12] 陈士林,姚辉,韩建萍,等.中药材DNA条形码分子鉴定指导原则[J].中国中药杂志,2013,38(2):141-148.
- [13] 中国药典[S].一部.2015.
- [14] 涂媛,熊超,师玉华,等.细小种子类毒性药材天仙子的DNA条形码鉴定[J].世界科学技术—中医药现代化,2014,16(11):2337-2342.
- [15] 宋明,张雅琴,林韵涵,等.基于ITS2和psbA-trnH序列对细小种子类药材车前子的鉴定比较[J].中国中药杂志,2014,39(12):2227-2232.
- [16] 刘金欣,潘敏,张改霞,等.基于ITS2序列的中药材桔梗种子DNA条形码鉴定[J].世界科学技术—中医药现代化,2016,18(2):174-178.
- [17] 张娜娜,辛天怡,金钺,等.基于中药材DNA条形码系统的泽泻种子鉴别研究[J].世界科学技术—中医药现代化,2016,18(1):18-23.
- [18] 石林春,金钺,赵春颖,等.基于DNA条形码技术的知母种子基原鉴定[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(12):21-27.
- [19] 刘金欣,魏妙洁,李耿,等.黄芩ITS2条形码数据库构建及其种子的DNA条形码鉴定方法建立[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(9):37-45.
- [20] 马双姣,周建国,金钺,等.王不留行种子的ITS2序列分子鉴定研究[J].世界科学技术—中医药现代化,2016,18(1):29-34.
- [21] 周建国,马双姣,黄玉龙,等.种子类药材补骨脂及其混伪品的ITS2条形码序列鉴定[J].世界中医药,2016,11(5):786-790.
- [22] 张改霞,金钺,贾静,等.中药材北沙参种子DNA条形码鉴定研究[J].世界科学技术—中医药现代化,2016,18(2):179-183.
- [23] 张改霞,金钺,贾静,等.药用植物羌活种子DNA条形码鉴定研究[J].中国中药杂志,2016,41(3):390-395.
- [24] 方海兰,夏从龙,段宝忠,等.基于DNA条形码的中药材种子种苗鉴定研究——以重楼为例[J].中药材,2016,39(5):986-990.
- [25] 张改霞.几种传统大宗中药材种子DNA条形码鉴定

- [D]. 济南: 山东中医药大学, 2016.
- [26] 林凤越, 曹 辉, 任欢欢, 等. 基于 ITS2 序列的人参及同属易混品西洋参种子的分子鉴定 [J]. 中草药, 2019, 50(9): 2188-2193.
- [27] Taberlet P, Coissac E, Pompanon F, *et al.* Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding [J]. *Mol Ecol*, 2012, 21(8): 2045-2050.
- [28] Schmidt P A, Bálint M, Greshake B, *et al.* Illumina metabarcoding of a soil fungal community [J]. *Soil Biol Biochem*, 2013, 65: 128-132.
- [29] Yang C, Ji Y, Wang X, *et al.* Testing three pipelines for 18S rDNA-based metabarcoding of soil faunal diversity [J]. *Sci China Life Sci*, 2013, 56(1): 73-81.
- [30] Valentini A, Taberlet P, Miaud C, *et al.* Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding [J]. *Mol Ecol*, 2016, 25(4): 929-942.
- [31] Deiner K, Bik H M, Mächler E, *et al.* Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities [J]. *Mol Ecol*, 2017, 26(21): 5872-5895.
- [32] Jia J, Xu Z, Xin T, *et al.* Quality Control of the traditional patent medicine Yimu Wan based on SMRT sequencing and DNA barcoding [J]. *Front Plant Sci*, 2017, 31(8): 926.
- [33] Xin T, Xu Z, Jia J, *et al.* Biomonitoring for traditional herbal medicinal products using DNA metabarcoding and single molecule, real-time sequencing [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2018, 8(3): 488-497.
- [34] 王丽丽. DNA 条形码鉴定中药材和中成药的应用研究 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2016.
- [35] Xin T, Su C, Lin Y, *et al.* Precise species detection of traditional Chinese patent medicine by shotgun metagenomic sequencing [J]. *Phytomedicine*, 2018, 47: 40-47.
- [36] 石林春, 刘金欣, 魏妙洁, 等. 基于 DNA metabarcoding 技术的如意金黄散处方成分鉴定研究 [J]. 中国科学: 生命科学, 2018, 48(4): 490-497.
- [37] Arulandhu A J, Staats M, Hagelaar R, *et al.* Development and validation of a multi-locus DNA metabarcoding method to identify endangered species in complex samples [J]. *Giga Sci*, 2017, 6(10): 1-18.
- [38] 阙 灵, 杨 光, 缪剑华, 等. 中药资源迁地保护的现状及展望 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(20): 3703-3708.
- [39] 陈士林. 中药 DNA 条形码分子鉴定 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012.
- [40] 陈士林. 中国药典中药材 DNA 条形码标准序列 [M]. 北京: 科学出版社, 2015.
- [41] 辛天怡, 李西文, 姚 辉, 等. 中药材二维 DNA 条形码流通监管体系研究 [J]. 中国科学: 生命科学, 2015, 45(7): 695-702.