

· 资源与鉴定 ·

## 六神曲中真菌的分离与鉴定

王秋红, 苏阳, 王荔慧, 王长福, 付新, 吴伦, 匡海学\*  
(黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150040)

**[摘要]** 目的:对传统工艺发酵六神曲中真菌进行分离与鉴定研究。方法:采用平板划线法和菌丝顶端纯化法从传统发酵六神曲分离真菌,使用生物显微镜进行显微形态学鉴定,DNA测序进行分子生物学鉴定。结果:从传统发酵六神曲分离并确定3株真菌分别为曲霉属真菌黄曲霉菌,青霉属真菌产黄青霉菌以及枝孢属真菌枝孢霉菌。黄曲霉菌和产黄青霉菌发酵六神曲气味纯香,表面遍布白衣略有黄衣出现与传统发酵相似;枝孢霉菌发酵六神曲产生霉腐气味,曲块表面暗灰褐色与传统发酵差别大,推测枝孢霉菌为六神曲发酵中产生的杂菌。结论:从传统方法发酵的六神曲分离得到3株真菌,经形态学鉴定及分子生物学鉴定,确定3株真菌分别为曲霉属真菌黄曲霉菌,青霉属真菌产黄青霉菌以及枝孢属真菌枝孢霉菌,为六神曲有效菌群的筛选提供了重要的物质基础研究。

**[关键词]** 六神曲; 真菌; 分离; 鉴定

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)07-0122-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfx.2014070122

## Study on Isolation and Identification of Fungi in Medicated Leaven

WANG Qiu-hong, SU Yang, WANG Li-hui, WANG Chang-fu, FU Xin, WU Lun, KUANG Hai-xue\*  
(Heilongjiang University of Chinese Medicine, Hairbin 150040, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the isolation and identification of Fungi in Medicated Leaven. **Method:** Using streak plate method and the hyphal tip purification methods to isolate fungi from Medicated Leaven, and using biological microscope microscopic method to identify morphology study, along with DNA sequencing for molecular identification. **Result:** There strains were identified three strains of fungi were *Aspergillus flavus*, *Penicillium chrysogenum* and *Cladosporium fungus* by morphology and molecular biology identification. The *Aspergillus* and *P. chrysogenum* fermentation of medicated leaven, it smells and trait similarity and traditional fermentation. *C. fungus* fermentation of medicated leaven produce rotting smell, its characters is also great different from traditional fermented difference. **Conclusion:** The results provide material basement for further studies related to Medicated Leaven.

**[Key words]** Medicated Leaven Massa; Fungi; isolation; identification

六神曲(Medicated Leaven Massa)又名神曲、六曲,最早收载于《药性论》,是由青蒿、苍耳草、辣蓼自然汁拌以苦杏仁粉、赤小豆粉、麦麸及面粉,按比例混合发酵而成<sup>[1]</sup>,是传统发酵曲剂中应用最广泛的一种。目前已发现六神曲中存在的真菌有酵母菌<sup>[2]</sup>、青

霉属的分枝青霉、曲霉属的烟曲霉和巢曲霉及毛霉属的总状毛霉,细菌有革兰阳性芽孢杆菌、革兰阴性杆菌<sup>[3-4]</sup>。六神曲作为最常用的消食类药物之一,但是药效物质基础尚不明确,并且有文献报道六神曲中含有致癌性的黄曲霉毒素,严重影响药物的使用安全。因此,本文在中医药理论的指导下,从传统方法发酵的六神曲分离得到3株真菌,为六神曲有效菌群的筛选提供了重要的物质基础研究。

### 1 材料

**1.1 植物来源** 苦杏仁、赤小豆购于黑龙江省哈尔滨市三棵树药材市场,为蔷薇科植物东北杏 *Prunus mandshurica* Koehne. 和豆科植物赤小豆 *Vigna umbellata* Ohwi et Ohashi. 的干燥成熟种子,麦麸(黑

**[收稿日期]** 20130907(006)

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(81073049)

**[第一作者]** 王秋红,博士,教授,博士生导师,从事中药药性理论研究及中药炮制研究, Tel: 0451-87266856, E-mail: qhwang668@sina.com

**[通讯作者]** \*匡海学,教授,博士生导师,从事中药药性理论研究及中药药效物质基础研究, E-mail: hxkuang@hotmail.com

龙江中医药大学动物实验中心)、面粉(山东临沂面粉股份有限公司),青蒿、苍耳及辣蓼鲜品采自黑龙江省哈尔滨市松北平原,经黑龙江中医药大学药学教研室王振月教授鉴定,确定青蒿为菊科植物 *Artemisia annua* L. 和 *Xanthium sibiricum* Patr. 的地上部分,辣蓼为蓼科植物 *Polygonum flaccidum* Meissn. 的地上部分,市售炒六神曲(陕西宝鸡向源中药饮片有限责任公司)。

## 1.2 培养基

**1.2.1 马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA 固体培养基)**<sup>[5]</sup> 将马铃薯去皮 200 g·L<sup>-1</sup> 切块,葡萄糖 25 g·L<sup>-1</sup>,蒸馏水 1 L,固体培养基加 2% 琼脂,双抗培养基加入 150 mg·L<sup>-1</sup> 青霉素钾和 150 mg·L<sup>-1</sup> 硫酸链霉素。

**1.2.2 沙保弱培养基(SDA 培养基)**<sup>[6]</sup> 蛋白胨 10 g,葡萄糖 40 g,营养琼脂 14 g,加入 1 L 蒸馏水混匀后分装在 3 个 500 mL 锥形瓶中,密封 103.4 kPa、121 °C 高压蒸气灭菌 20 min,于洁净工作台中心趁热倾倒入平板。

**1.2.3 查氏培养基(CZA 培养基)**<sup>[7]</sup> NaNO<sub>3</sub> 3.0 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g, KCl 0.5 g, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01 g, 葡萄糖 30 g, 营养琼脂 15 g, 加入 1 000 mL 蒸馏水混匀后分装在 3 个 0.5 L 锥形瓶中,密封 103.4 kPa, 121 °C 高压蒸气灭菌 20 min,于洁净工作台中心趁热倾倒入平板。

## 1.3 试剂与仪器

**1.3.1 试剂** 葡萄糖(天津市致远化学试剂有限公司),三氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇(天津市富宇精细化工有限公司),甲醇(德国默克公司),屈臣氏水纯净水。化学试剂均为分析纯。营养琼脂、蛋白胨、琼脂糖(北京奥博星生物技术有限责任公司),黄曲霉毒素 B1(AFB1)ELISA 检测试剂盒(北京华安麦科生物技术有限公司),Tris 饱和酚、溴酚蓝上样缓冲液、DNA Marker(天根生化科技北京有限公司),乙二胺四乙酸二钠/EDTA-2Na(EDTA Disodium Salt)、溴化乙锭/EB(Ethidium bromide)、十二烷基磺酸钠/SDS(Sodium dodecyl sulfate)(美国 Amresco 公司),三羟甲基氨基甲烷缓冲物/Tris Amino(Tris hydroxymethylAminomethane White)(美国 DOW 公司),Taq(Thermus aquaticus) DNA 聚合酶、10 × PCRBuffer、脱氧核糖核苷三磷酸/dNTP(deoxyribonucleoside triphosphate)混合物(Newbio 公司),真菌通用引物 ITS4(Internal Transcribed Spacer 4)、ITS5(Internal Transcribed Spacer 5)(上海捷瑞生物

工程有限公司)。

**1.3.2 仪器** 洁净工作台、振荡搅拌箱、恒温恒湿培养箱、手提式压力蒸气灭菌器(昆山市超声仪器有限公司),EYELA 定温干燥箱(上海爱朗仪器有限公司),冷藏冷冻箱(伊莱克斯中意长沙电冰箱有限公司),系列生物显微镜、宽胜摄像头(汕头市潮南区宽胜电器厂),微量移液器(芬兰 Finnpiette 公司),酶标仪、高速冷冻离心机(美国 Perkin Elmer 公司),Mastercycler ep gradient PCR 扩增仪(德国 Eppendorf 公司)。

## 2 方法

**2.1 六神曲中真菌的分离** 取停止发酵 24 h 内新鲜的六神曲表面及中心曲块分别接种于 PDA 固体培养基中心,倒放在 28 °C 相对湿度 70% ~ 75% 的恒温箱中培养观察,待长出菌落后,分别挑取各菌落边缘的菌丝采用平板划线法接种于新培养基中进行分离培养,再采用菌丝顶端纯化法逐步纯化<sup>[8]</sup>,分离得到 3 种真菌,分别编号 SQ1, SQ2, SQ3,转入 PDA 斜面,置于 4 °C 保存。

## 2.2 六神曲中真菌的鉴定

### 2.2.1 显微形态学鉴定

**2.2.1.1 菌落形态观察** 用接种针取少量孢子,分别接种于 PDA 培养基、沙保弱培养基以及察氏培养基平板中心,28 °C 恒温培养,观察菌体在培养基中菌落形态与生长情况。

**2.2.1.2 显微结构观察** 将需鉴定真菌接种于盖玻片与培养基交界处,使菌丝生长过程中能够附着到盖玻片上,置于 28 °C 恒温培养箱中培养,从次日起每天用无菌镊子拔取盖玻片,经乳酸-棉兰染液染色后,置于显微镜下观察真菌结构。

### 2.2.2 分子鉴定

**2.2.2.1 真菌基因组 rDNA 的提取**<sup>[9]</sup> 称取液氮研磨后的菌体,置于离心管中,加入 DNA 提取缓冲液,混匀,于 37 °C 水浴 30 min,取出后 12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min。将上清液移入新的离心管中,加入等体积酚-三氯甲烷溶液,离心;将上层液移入新的离心管中,加入等体积三氯甲烷,离心;将上层液移入新的离心管中,加入 2 倍体积冰乙醇, -20 °C 过夜;取过夜的 DNA 提取液,离心,去掉上清液,加入 500 μL 70% 乙醇,清洗沉淀 2 次,离心;去掉上清液,挥干溶剂,加入 50 μL 1 × TE 溶解沉淀,即为 DNA 模板;将 DNA 模板置于 -20 °C 保存备用。

**2.2.2.2 真菌基因组 rDNA 电泳检测**<sup>[10]</sup> 以 1 × TAE 作为电泳缓冲液,0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测

真菌基因组 rDNA 模板,加样量为 5 μL,电场强度为 5 V·cm<sup>-1</sup>,电泳时间 1 h,紫外灯下检测真菌基因组 DNA 提取结果。

**2.2.2.3 真菌基因组 DNA 序列扩增<sup>[11]</sup>** 采用真菌鉴定通用引物 ITS4 与 ITS5,对六神曲中分离的真菌基因组 DNA 序列扩增。

**2.2.2.4 真菌基因组 DNA PCR 扩增产物的序列测定与数据处理**将 PCR 扩增出来的目的基因片断测序,所测得序列提交至 NCBI,与 Gene Bank 数据库中已知基因序列进行 Blast 对比,选取相似性 > 99%,且种属地位明确的序列,应用 Clustal X1.83 进行多序列对比,同时使用软件 MEGA5.0 构建系统进化树。

### 3 结果与分析

#### 3.1 真菌鉴定

**3.1.1 形态学鉴定** SQ1:菌落圆形,淡绿色,渐变成黄绿色,边缘整齐,菌丝体表生长,较短。分生孢子梗直立,顶端球形膨大,分生孢子串生于小梗顶端,辐射状排列,单个孢子球形,符合曲霉属真菌特定,初步鉴定为曲霉属真菌<sup>[12]</sup>(图1)。



图1 SQ1的菌落形态和微观结构

SQ2:菌落青绿色,分生孢子梗自菌丝直立单个生出,不成束,顶端生排列成扫帚状的间枝,分生孢子串呈不分枝的链状,单个孢子球形,符合青霉属真菌特定,初步鉴定为青霉属真菌<sup>[13]</sup>(图2)。

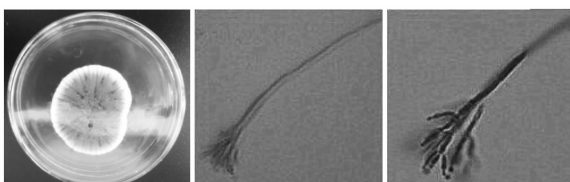


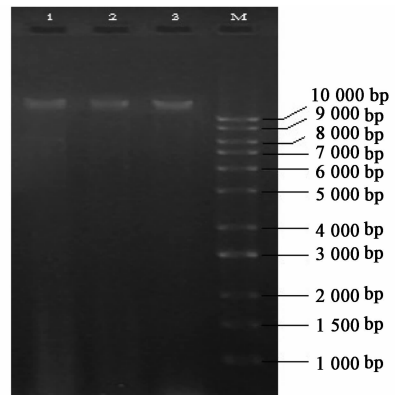
图2 SQ2的菌落形态和微观结构

SQ3:在 PDA 培养基上生长缓慢,菌落小并且形状不规则,暗灰色,绒毡状,向培养基内生长,菌落表面呈山脊状形态。显微镜下观察分生孢子暗色,单细胞,卵圆形,分枝向顶呈链状,符合枝孢属真菌形态特征,初步鉴定为枝孢属真菌<sup>[14]</sup>(图3)。



图3 SQ3的菌落形态和微观结构

均有一条清晰条带,并且没有拖尾现象,证明提取得到的基因组 DNA 完整,满足进行 PCR 扩增条件。

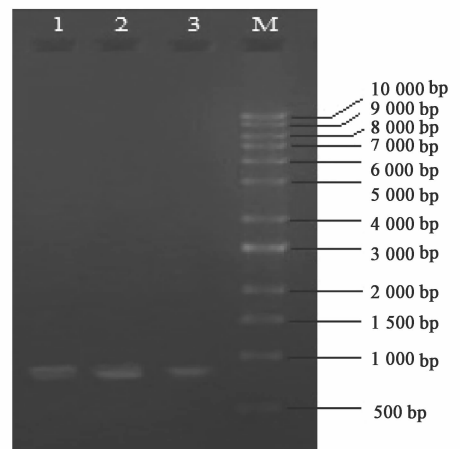


SQ1;2. SQ2;3. SQ3;M. DNA Marker

图4 真菌基因组 DNA 模板电泳结果

**3.1.2.2 真菌基因组 DNA PCR 扩增结果** 由图5可以看出,六神曲中所分离真菌 ITS 序列的 PCR 扩增产物在约 700 bp 左右有清晰条带,其中真菌 SQ1 的 PCR 产物电泳条带有两条属正常现象,对测序结果不产生影响。3 种真菌相对分子质量大小范围与文献所述一致,并无其他杂质存在,证明所得 PCR 产物为预期产物。

**3.1.2.3 真菌基因组 DNA 序列测定** 3 种真菌与从 Genbank 获得的相似序列经过 MEGA5.0 软件进行比对分析后,构建 N-J 系统进化树。SQ1 有鉴定意义的序列是 HM572296.1, HQ844698.1, JX157822.1,



SQ1;2. SQ2;3. SQ3;M. DNA Marker

图5 ITS 序列放大电泳结果

其中与 JX157822.1 同源性最高 (Blast 的 Max ident 为 100%), 为黄曲霉菌 (图 6, 7)。

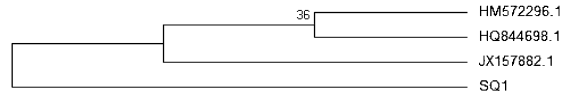


图 6 SQ1 真菌系统树构建

LOCUS	JX157882	599 bp	DNA	linear	PLN 22-AUG-2012
DEFINITION	Aspergillus flavus 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence.				
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
985 bits(533)	0.0	533/533(100%)	0/533(0%)	Plus/Minus	
Query	9	TACTGATCCGAGGTCACCTGGAAAAGATTGATTTCGCTTCGGCAAGCGCCGGCCGGCCCT			68
Sbjct	596	TACTGATCCGAGGTCACCTGGAAAAGATTGATTTCGCTTCGGCAAGCGCCGGCCGGCCCT			537
Query	69	ACAGAGCGGGTGACAAAAGCCCATACGCTCGAGGATCGGACCGGTGCCGCCGCTGCCTT			128
Sbjct	536	ACAGAGCGGGTGACAAAAGCCCATACGCTCGAGGATCGGACCGGTGCCGCCGCTGCCTT			477
Query	129	TGGGGCCCGTccccccGGAGAGGGGACGACGACCCAAACACACAAGCGTCTTGAATGGG			188
Sbjct	476	TGGGGCCCGTCCCCCGGAGAGGGGACGACGACCCAAACACACAAGCGTCTTGAATGGG			417
Query	189	CAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATACCGGGGGCGCAATGTGCGTCA			248
Sbjct	416	CAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATACCGGGGGCGCAATGTGCGTCA			357
Query	249	AAGACTCGATGATTACGGAAATTCGCAATTCACACTAGTTATCGCAATTCGCTGCCTC			308
Sbjct	356	AAGACTCGATGATTACGGAAATTCGCAATTCACACTAGTTATCGCAATTCGCTGCCTC			297
Query	309	TTCATCGATGCCGGAACCAAGATCCATTGTTGAAAGTTTTAACTGATTGCGATACAAAT			368
Sbjct	296	TTCATCGATGCCGGAACCAAGATCCATTGTTGAAAGTTTTAACTGATTGCGATACAAAT			237
Query	369	CAACTCAGACTTCACTAGATCAGACAGAGTTCGTGGTGTCTCCGGGGGGCGGGCCCGG			428
Sbjct	236	CAACTCAGACTTCACTAGATCAGACAGAGTTCGTGGTGTCTCCGGGGGGCGGGCCCGG			177
Query	429	GGCTGAGAGCCCCCGGCGCCATGAATGGCGGGCCCGCCGAGCACTAAGGTCAGATAA			488
Sbjct	176	GGCTGAGAGCCCCCGGCGCCATGAATGGCGGGCCCGCCGAGCACTAAGGTCAGATAA			117
Query	489	ACACGGTGGGAGGTTGGGCTCGCTAGGAACCTTACACTCGGTAATGATCCTT			541
Sbjct	116	ACACGGTGGGAGGTTGGGCTCGCTAGGAACCTTACACTCGGTAATGATCCTT			64

图 7 SQ1 和 JX157822.1 真菌序列比较

SQ2 有鉴定意义的序列是 FJ176474.1, JF440603.1, AM948960.1, JF834167.1, 其中与 JF834167.1 同源性最高 (Blast 的 Max ident 为 100%), 为产黄青霉菌 (图 8, 9)。



图 8 SQ2 真菌系统树构建

LOCUS	JF834167	733 bp	DNA	linear	PLN 12-JUN-2011
DEFINITION	Penicillium chrysogenum strain HGQ6 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence.				
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
987 bits(534)	0.0	534/534(100%)	0/534(0%)	Plus/Minus	
Query	20	AGGTCACCTGGATAAAAATTTGGGTTGATCGGCAAGCGCCGGCCGGCCCTACAGAGCGGG			79
Sbjct	710	AGGTCACCTGGATAAAAATTTGGGTTGATCGGCAAGCGCCGGCCGGCCCTACAGAGCGGG			651
Query	80	TGACAAAGCCCATACGCTCGAGGACCGGACCGCGGTGCCCGCTGCTTTCGGCCCGGT			139
Sbjct	650	TGACAAAGCCCATACGCTCGAGGACCGGACCGCGGTGCCCGCTGCTTTCGGCCCGGT			591
Query	140	CCCCGGGATCGGAGGACGGGCCCCAACACACAAGCCGTGCTTGAGGGCAGAAATGACGC			199
Sbjct	590	CCCCGGGATCGGAGGACGGGCCCCAACACACAAGCCGTGCTTGAGGGCAGAAATGACGC			531
Query	200	TCGGACAGGCATGCCCCCGGAATACCGGGGGCCCAATGTGCGTTCAAAAGACTCGATGA			259
Sbjct	530	TCGGACAGGCATGCCCCCGGAATACCGGGGGCCCAATGTGCGTTCAAAAGACTCGATGA			471
Query	260	TTCCTGAAATTTGCAATTCACATTACGTATCGCATTTCGCTCGGTTCTTTCATCGATGCCG			319
Sbjct	470	TTCCTGAAATTTGCAATTCACATTACGTATCGCATTTCGCTCGGTTCTTTCATCGATGCCG			411
Query	320	GAACCAAGAGATCGGTTGTTGAAAGTTTTAAATAAATTTATATTTTCACTCAGACTACAAT			379
Sbjct	410	GAACCAAGAGATCGGTTGTTGAAAGTTTTAAATAAATTTATATTTTCACTCAGACTACAAT			351
Query	380	CTTCAGACAGAGTTCGAGGGTGTCTTcggcggggcggggccccggggcgtaagccccccg			439
Sbjct	350	CTTCAGACAGAGTTCGAGGGTGTCTTcggcggggcggggccccggggcgtaagccccccg			291
Query	440	ggggccaagttaagggcgggccccgggaaagcaacaaggttaaaataaacacggggtgggaggtt			499
Sbjct	290	gcgggcagtttaagggcgggccccgggaaagcaacaaggttaaaataaacacggggtgggaggtt			231
Query	500	GGACCCAGAGGGCCCTCACTCGGTAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAA			553
Sbjct	230	GGACCCAGAGGGCCCTCACTCGGTAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAA			177

图 9 SQ2 和 JF834167.1 真菌序列比较

SQ3 有鉴定意义的序列是 EU272491.1, JX173100.1, FJ176478.1, 其中与 FJ176478.1 同源性最高(Blast 的 Max ident 为 100%), 为枝孢霉菌(图 10, 11)。

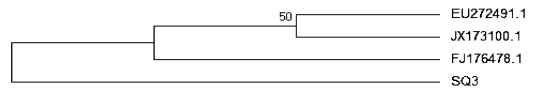


图 10 SQ3 真菌系统树构建

LOCUS FJ176478 574 bp DNA linear PLN 16-JUN-2009  
DEFINITION Cladosporium sp. MX6 18S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
931 bits(504)	0.0	504/504(100%)	0/504(0%)	Plus/Minus
Query 25	CACCTTAGAAATGGGGTTGTTTTACGGCGTAGCCTCCCGAACACCCCTTTAGCGAATAGTT			84
Sbjct 519	CACCTTAGAAATGGGGTTGTTTTACGGCGTAGCCTCCCGAACACCCCTTTAGCGAATAGTT			460
Query 85	TCCACAACGCTTAGGGGACAGAAGACCCAGCCGGTCGATTTGAGGCACGCGGCGGACCGC			144
Sbjct 459	TCCACAACGCTTAGGGGACAGAAGACCCAGCCGGTCGATTTGAGGCACGCGGCGGACCGC			400
Query 145	GATGCCCAATACCAAGCGAGGCTTGAGTGGTGAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCCCC			204
Sbjct 399	GATGCCCAATACCAAGCGAGGCTTGAGTGGTGAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCCCC			340
Query 205	GGAATACCGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTGATGATTAAGTAACTGAAATCTGCAATT			264
Sbjct 339	GGAATACCGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTGATGATTAAGTAACTGAAATCTGCAATT			280
Query 265	CACATTACTTATCGCATTTGCTGCTTCTTCATCGATGCCAGAACCAGAGATCCGTTG			324
Sbjct 279	CACATTACTTATCGCATTTGCTGCTTCTTCATCGATGCCAGAACCAGAGATCCGTTG			220
Query 325	TTAAAAGTTTTAATTTAATTAAGTTTACTCAGACTGCAAGTTACGCAAGAGTTTGA			384
Sbjct 219	TTAAAAGTTTTAATTTAATTAAGTTTACTCAGACTGCAAGTTACGCAAGAGTTTGA			160
Query 385	AGTGTCCACCCGGAGCCCCCGCCGGAAGGCAGGGTCGCCCGGAGGCAACAGAGTCGGAC			444
Sbjct 159	AGTGTCCACCCGGAGCCCCCGCCGGAAGGCAGGGTCGCCCGGAGGCAACAGAGTCGGAC			100
Query 445	AACAAAGGGTTATGAACATCCCGTGGTTAGACCCGGGTCACCTTGTAAATGATCCCTCCGC			504
Sbjct 99	AACAAAGGGTTATGAACATCCCGTGGTTAGACCCGGGTCACCTTGTAAATGATCCCTCCGC			40
Query 505	AGGTTACCTACGGAGACCTTGTT 528			
Sbjct 39	AGGTTACCTACGGAGACCTTGTT 16			

图 11 SQ2 和 JF176478.1 真菌序列比较

#### 4 结论与讨论

本实验从传统方法发酵的六神曲分离得到 3 株真菌,经形态学鉴定及分子生物学鉴定,确定 3 株真菌分别为曲霉属真菌黄曲霉菌,青霉属真菌产黄青霉菌以及枝孢属真菌枝孢霉菌。分别以黄曲霉菌、产黄青霉菌和枝孢霉菌单一菌株发酵六神曲,其中黄曲霉菌和产黄青霉菌发酵六神曲发酵状态良好;经枝孢霉菌发酵六神曲产生霉腐气味,曲块表面暗灰褐色,推测枝孢霉菌为六神曲发酵的杂菌。考察黄曲霉菌及产黄青霉菌发酵六神曲提取物对肠道致病菌抑制作用,发现黄曲霉菌及产黄青霉菌六神曲提取物对肠道致病菌抑制作用显著。为更好的提高六神曲的质量,并使其应用更加安全可靠,因此,有必要对六神曲的发酵工艺做更深层次的探讨和研究。

#### [参考文献]

[1] 中华人民共和国卫生部药品标准. 中药成方制[S]. 1998;19.  
[2] 张丽霞,高文远,王海洋. 六神曲中酵母菌的鉴定

[J]. 中国中药杂志,2012, 37(13):1928.  
[3] 胡静,杨旭东,夏清平,等. 中药“神曲”中微生物的研究[J]. 牡丹江医学院学报,2004, 25(2):19.  
[4] 高慧,贾天柱. 单一菌种发酵神曲的质量研究比较[J]. 中国中药杂志,2008, 33(20):2323.  
[5] 莫小林,伍小燕,韦振源,等. 10 种中药制剂微生物限度检查方法学的验证[J]. 中国实验方剂学杂志,2012, 18(13):56.  
[6] 张海骏,包京娜,杨世海,等. 王不留行毛状根的诱导及培养[J]. 中国实验方剂学杂志,2013, 19(6):141.  
[7] 李建国,刘湘花,汤红琴,等. 抗癆颗粒对耐多药结核分枝杆菌蛋白质组学的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012, 18(15):205.  
[8] 周德庆,张文治,强义国. 生物学教学[M]. 北京:中国学术期刊电子出版社,1981:1.  
[9] 刘少华,陆金萍,朱瑞良,等. 一种快速简便的植物病原真菌基因组 DNA 提取方法[J]. 植物病理学报,2005,35(4):362.  
[10] 李燕俊,刘秀梅. 脉冲场凝胶电泳技术及其在致病细菌研究中的应用[J]. 国外医学:卫生学分册,2005, 32(5):305.

# DNA 条形码技术鉴定一种植物样品的研究

许亮<sup>1,2</sup>, 刘春生<sup>2</sup>, 杨燕云<sup>1</sup>, 王冰<sup>1</sup>, 康廷国<sup>1\*</sup>

(1. 辽宁中医药大学, 辽宁 大连 116600; 2. 北京中医药大学, 北京 100029)

**[摘要]** **目的:**对一种未知的破碎的植物样品进行品种鉴定。**方法:**综合采用性状鉴定、显微鉴定、DNA 条形码鉴定等方法, DNA 条形码鉴定经过 DNA 提取、PCR 扩增、测序, 对 ITS 序列数据经 Blast 比对法、特异位点法、系统发育法三种方法进行分析。**结果:**该未知样品为伞形科植物茴香 *Foeniculum vulgare* Mill. 去掉果皮的种子。**结论:**中药鉴定技术能够解决实际工作中的未知样品品种鉴定问题, DNA 条形码技术为中药鉴定提供一种新的方法, 在未知样品的鉴定中发挥重要的参考作用。

**[关键词]** DNA 条形码; 中药鉴定; 植物样品

**[中图分类号]** R282 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)07-0127-03

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfix.2014070127

## Study on Identification of an Unknown Sample with DNA Barcoding

XU Liang<sup>1,2</sup>, LIU Chun-sheng<sup>2</sup>, YANG Yan-yun<sup>1</sup>, WANG Bing<sup>1</sup>, KANG Ting-guo<sup>1\*</sup>

(1. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China;

2. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To identify an unknown broken plant sample. **Method:** In this work, the method included macroscopical identification, microscopic identification, DNA barcoding identification was used. Using the DNA barcoding identification technology, DNA extraction, PCR amplification and sequencing, ITS sequence data were analyzed by three methods about the Blast comparison method, specific point method, system development method. **Result:** The unknown sample is the seeds of family umbrelliferae plant *Foeniculum vulgare* Mill. **Conclusion:** Traditional Chinese medicine authentication technology can solve the species identification problem of unknown sample in the actual work. DNA barcoding technology provide a new method for TCM authentication and play an important role of the identification of unknown sample.

**[Key words]** DNA barcoding; traditional Chinese medicine authentication; plant sample

**[收稿日期]** 20130428(006)

**[基金项目]** 辽宁省科技厅项目(20111133); 辽宁中医药大学杰出青年基金项目(20121228)

**[第一作者]** 许亮, 副教授, 博士, 从事药用植物资源研究及开发, Tel: 0411-87586004, E-mail: 861364054@qq.com

**[通讯作者]** \* 康廷国, 教授, 从事中药鉴定研究, E-mail: lnzyxuling@eyou.com

[11] 张新高, 侯杰, 陈武, 等. 华南虎绦虫 ITS 及 5.8S rDNA 序列扩增与序列分析[J]. 河南农业科学, 2011, 40(8): 205.

[12] 李莹, 李进军, 王轲, 等. 海洋曲霉属真菌菌株 F5 抑菌活性代谢产物的分离与鉴定[J]. 中国抗生素杂志, 2013, 38(3): 191.

[13] 赵瑞, 李进军, 彭海燕, 等. 海洋青霉属真菌菌株

XGH2321 抑菌活性代谢产物的分离与鉴定[J]. 中国抗生素杂志, 2012, 37(4): 261.

[14] 翟凤艳, 刘英杰, 李玉. 枝孢属、钉孢属及柱隔孢属真菌内蒙新记录种[J]. 西北农业学报, 2011, 20(4): 1.

[责任编辑 邹晓翠]