

DNA 条形码技术鉴定一种植物样品的研究

许亮^{1,2}, 刘春生², 杨燕云¹, 王冰¹, 康廷国^{1*}

(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^{1,2}, LIU Chun-sheng², YANG Yan-yun¹, WANG Bing¹, KANG Ting-guo^{1*}

(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]

中药鉴定在中药的真实性鉴定、质量控制、临床应用、开发新药等方面发挥着重要的作用,更有着解决实际问题的旺盛生命力。DNA 条形码 (DNA barcoding) 技术^[1]是利用一段标准的 DNA 序列作为标记来实现快速、准确和自动化的物种鉴定。加拿大动物学家 Paul Hebert 首先倡导将条形码编码技术应用到生物物种鉴定中,被称为 DNA 条形码之父^[2-3]。ITS (internal transcribed spacer) 是核糖体 DNA 上的内转录间隔区,总长度为 600 ~ 700 bp,在植物类药材的 DNA 条形码鉴定中广泛应用^[4-5]。本研究就是针对 2012 年某单位提供一植物进行鉴别,样品量较少,已知信息不多,鉴定比较困难。对样品综合采用性状鉴定、显微鉴定、DNA 条形码技术鉴定,确定该样品为伞形科茴香属植物茴香 *Foeniculum vulgare* Mill. 去掉果皮的种子。

1 材料

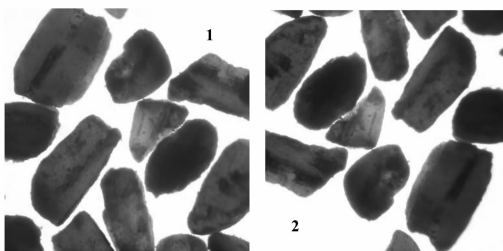
植物样品,不具果皮,粉碎成小块状,有较浓的香味。

奥林帕斯体式生物显微镜、奥林帕斯光学生物显微镜、PCR 仪、液氮、水合氯醛、稀甘油等。

2 方法

综合采用性状鉴定、显微鉴定、DNA 条形码鉴定的方法。

2.1 性状鉴定 经辽宁中医药大学康廷国教授、王荣祥教授鉴定,该样品淡黄色、气芳香特异、为不规则小碎块,无果皮、具有柔和的茴香味,通过咀嚼微甘但无辛味,体式生物显微镜下可见两条明显的沟槽,3 个明显的棱。初步鉴定该样品为伞形科某植物去掉了果皮的种子,见图 1。



1. 透射光源; 2. 斜照光源

图 1 体式生物显微镜下样品

2.2 显微鉴定 该样品经粉碎,过 60 目筛,水合氯醛透化 2 次,稀甘油封片,在光学生物显微镜下观察。具有导管、油滴、胚乳细胞、黄棕色的油管碎片等显微特征,偏光镜下可见草酸钙簇晶。考虑该样品为伞形科植物,与茴香果实有相似的显微特征,见

图 2,3。

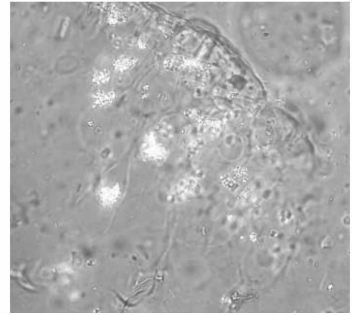


图 2 偏光显微镜下样品草酸钙簇晶

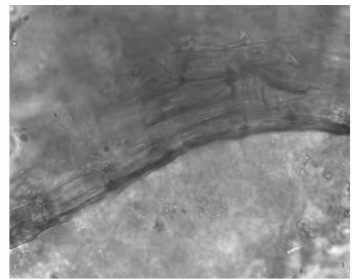


图 3 正常光显微镜下样品油管碎片

2.3 DNA 条形码鉴定

2.3.1 样品 DNA 提取 取约 100 mg 样品放在用酒精烧过的研钵内,加入液氮磨成细粉。用广谱植物基因组 DNA 快速提取试剂盒,按说明书提取 DNA。用 1% 琼脂糖凝胶电泳验证 DNA 的质量。

2.3.2 PCR 扩增 ITS 扩增采取整段扩增的方法,50 μ L 的体系中含 *Taq* 混合酶 25 μ L,通用引物 p1/p4 各 2.5 μ L,DNA 稀释 20 倍者 7 μ L,灭菌蒸馏水 13 μ L。扩增程序为 95 $^{\circ}$ C 预变性 7 min,95 $^{\circ}$ C 2 min,57 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 1 min,循环 36 次,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检查,紫外灯下检识出现多条带,对其进行切胶回收后再电泳检查,条带清晰明亮,可送测序。

2.3.3 样品测序 PCR 产物切胶回收、纯化,经上海生工生物工程有限公司测序部测序。DNA 样品采用单向测序。

2.3.4 数据分析 经过截取后,该样品的 ITS 序列为 TCGAA TCCTG CGATA GCAGA ATGAC CCGCT AACAC GTAAA CACAT CGGGC AAGCG TCAGA GGGCT TCGGT CCCCT GATTG CAAAC CCTTG GTAGG TGTCC CCTCT ATGGT GGCCA CCGGC CTACG AAATC ATCCG GGCGC GGAAT GCGCC AAGGA ACTTG AAATT GAATT GTACG TTCCG

ATCCC GTTAG CGGCC ATCGA ACGTC ATTCC
 AAAAC ACAAC GACTC TCGAC AACGG ATATC
 TCGGC TCTCG CATCG ATGAA GAACG TAGCG
 AAATG CGATA CTTGG TGTGA ATTGC AGAAT
 CCCGT GAACC ATCGA GTCTT TGAAC GCAAG
 TTGCG CCCGA AGCCA ATAGG CCGAG GGCAC
 GTCTG CCTGG GTGTC ACACA TTTGC TTGCC
 CCCAC CACTC ACTCC TTGAT GAGAT GTGCT
 GGTTC TTGGG CGGAA ATTGG CCTCC CGTGC
 CTTGT TGTGC GGCTG GTGCA AAAAC GAGTC
 TCTGG CGGAG GACGT CGTGA CATCG GTGGT
 TGTA AATAC CCTCT TGA CT TACT TGTCG CACGA
 ATCCG CGTCA TCTTA ATGAG CTCTA GGACC
 GTTGG GCGCT ACACA ATCTG TTCGC CCTTA 具有
 600 bp。

2.3.4.1 Blast 比对鉴定法 将测序后所得的正反两条序列用 Conting Express 软件进行拼接,将拼接后的序列在 NCBI 网站进行 Blast 比对,根据相似度确定该样品所属的科属,根据 Genbank 中注册的该属植物的 ITS 序列边界确定样品的 ITS 序列,将未知样品的 ITS 序列再次进行 BLAST 比对,相似度达到 99% 以上的序列为待鉴定样品的可能物种。

经 Blast 比对,与待鉴定样品 ITS 序列相似度达到 99% 以上的共有 1 种植物,即伞形科茴香属植物茴香 *F. vulgare*。

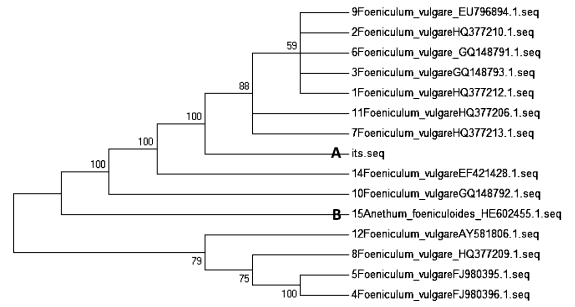
2.3.4.2 特异位点鉴定法 从 Genbank 下载相似度达到 99% 以上物种的 ITS 序列,并用 DNAMAN 进行多序列比对,寻找各物种的特异鉴定位点。根据样品具有各物种特异位点进行鉴定。

取同科其他属植物的 ITS 序列用 DNAMAN 软件进行特异位点的寻找发现样品与茴香具有许多相同的特异位点。因此可以根据特异位点判定未知物为伞形科植物茴香 *F. vulgare*。

2.3.4.3 系统发育鉴定法 利用 Meg 5.0 系统发育软件重建相似度 99% 以上所有物种的 ITS 序列的系统发育树,根据待鉴定样品 ITS 序列在系统发育树中的位置进行鉴定。见图 4。待测样品的 ITS 序列与茴香归为一支,可以判定,样品为伞形科茴香属植物茴香 *F. vulgare*。

3 结论与讨论

中药鉴定在中药应用能够解决实际问题,DNA 条形码技术为中药鉴定提供一种新的方法。DNA 条形码技术直接利用 DNA 序列进行物种的鉴定,基于生物的基因型具有独一无二的可重复性;具有通



A. 待测样品; B. 茴香属植物 *Anethum foeniculoides*

图 4 系统发育树

用性,在不同物种之间具有可比性,在全球物种鉴定中可以形成统一的标准;需一对或几对通用引物。因此,DNA 条形码技术在中药鉴定中必将前景广阔^[6-10]。

[参考文献]

[1] 陈士林,姚辉,宋经元,等. 基于 DNA barcoding(条形码)技术的中药材鉴定[J]. 世界科学技术——中医药现代化,2007,9(3):7.

[2] Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes[J]. Proc R Soc Lond B, 2003a, 270:313.

[3] Hebert PDN, Ratnasingham S, Dewaard J R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit I divergences among closely related species[J]. Proc R Soc Lond B, 2003b, 270(Suppl):S96.

[4] 刘春生,白根本,阎玉凝. 基于核 DNA ITS 序列对细辛药材的基源及分子鉴定[J]. 中国中药杂志,2005,30(5):329.

[5] 陈士林,庞晓慧,罗焜,等. 生物资源的 DNA 条形码技术[J]. 生命科学,2013,25(5):458.

[6] 许亮,谷丽艳,赵丹玉,等. 基于 ITS 序列的植物类中药材鉴定研究及展望[J]. 中华中医药学刊,2010,28(4):737.

[7] 陈念,赖小平. 药用植物 DNA 条形码物种鉴定技术[J]. 中药材,2010,33(4):648.

[8] 许亮,谷丽艳,赵丹玉,等. DNA 条形码(DNA barcoding)用于动物类中药鉴定的应用与展望[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(4):234.

[9] 韩建萍,李美妮,罗焜,等. DNA 条形码鉴定洋金花及其伪品[J]. 药学学报,2011,46(11):134.

[10] 陈士林,庞晓慧,姚辉,等. 中药 DNA 条形码鉴定体系及研究方向[J]. 世界科学技术——中医药现代化,2011,13(5):7.

[责任编辑 邹晓翠]