

中药材 DNA 条形码分子鉴定法指导原则

本法用于中药材(包括药材及部分饮片)及基原物种的鉴定。

DNA 条形码分子鉴定法是利用基因组中一段公认的、相对较短的 DNA 序列来进行物种鉴定的一种分子生物学技术,是传统形态鉴别方法的有效补充。由于不同物种的 DNA 序列是由腺嘌呤(A)、鸟嘌呤(G)、胞嘧啶(C)、胸腺嘧啶(T)四种碱基以不同顺序排列组成,因此对某一特定 DNA 片段序列进行分析即能够区分不同物种。

中药材 DNA 条形码分子鉴定通常是以核糖体 DNA 第二内部转录间隔区(ITS2)^①为主体条形码序列鉴定中药材的方法体系,其中植物类中药材选用 ITS2/ITS 为主体序列,以叶绿体 psbA-trnH^②为辅助序列,动物类中药材采用细胞色素 C 氧化酶亚基 I(COI)^③为主体序列,ITS2 为辅助序列。

一、仪器的一般要求

所用仪器有电子天平、离心机、聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)仪、电泳仪和测序仪。

DNA 序列测定用测序仪,是一台具有自动灌胶、自动进样、自动数据收集分析等全自动电脑控制的测定 DNA 片段中碱基顺序或大小,以及定量用精密仪器。测序方法主要采用双脱氧链终止法,又称 Sanger 法。4 种双脱氧核苷酸(ddNTP)的碱基分别用不同的荧光进行标记,在通过毛细管时,不同长度的 DNA 片段上的 4 种荧光基团被激光激发,发出不同颜色的荧光,被电荷耦合元件图像传感器(charge-coupled device, CCD)检测系统识别,并直接翻译成 DNA 序列,获得供试品的峰图文件和序列文件。

二、测定步骤

本法主要包括供试品处理、DNA 提取、DNA 条形码序列 PCR 扩增、电泳检测和序列测定、序列拼接及结果判定,主要步骤如下。

1. 供试品处理

按药材和饮片取样法(通则 0211)取样。为防止外源微生物污染,药材和饮片一般使用 75%乙醇擦拭表面后晾干,或采取其他有效去除微生物污染的方法。称取 10~100mg 备用。供试品具体取样部位根据不同药材特性作出相应规定。

2. DNA 提取

DNA 的提取包括使用研钵或研磨仪破碎细胞,粉碎成细粉,用试剂盒法进行 DNA 的分离和纯化等步骤,目前常用试剂盒包括植物基因组 DNA 提取试剂盒和动物组织/细胞基因组 DNA 提取试剂盒,实验选用的试剂盒须能够提取到满足后续实验要求的模板 DNA。

由于植物类中药材种类繁多,可根据所鉴定的中药材的具体情况对提取方法加以改进。例如:植物细胞内含有大量多糖、多酚等次生代谢产物,这些物质在提取 DNA 的过程中与 DNA 共沉淀,形成黏稠的胶状物,难以溶解或氧化产生褐变,严重影响 DNA 提取的产量与质量,以及后续的 PCR 扩增实验。但如在提取 DNA 过程中加入抗氧化剂β-巯基乙醇,则可抑制氧化反应,避免其褐化。再如:PVP(聚乙烯吡咯烷酮)是酚的络合物,能与多酚形成一种不溶的络合物,有效去除多酚,减少 DNA 提取过程中酚的污染;同时它也能和多糖结合,有效去除多糖。因此若将 PVP 和β-巯基乙醇配合使用,能够有效地防止 DNA 提取过程中多酚及多糖的污染。此外,乙二胺四乙酸(EDTA)能螯合 Mg^{2+} 或 Mn^{2+} ,从而抑

制 DNA 酶 (DNase) 活性, 防止 DNA 被其降解; 在天然状态下, DNA 与蛋白质以 DNA 蛋白质复合物 (DNP) 的形式存在, 十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 是一种阳离子去污剂, 可溶解细胞膜, 并与 DNA 形成复合物, 使细胞中的 DNP 释放出来, 该复合物在高盐溶液 ($>0.7\text{mol/L NaCl}$ 中能充分溶解, 存在于液相中, 通过有机溶剂抽提, 去除蛋白质、多糖、酚类等杂质后加入乙醇沉淀即可使 DNA 分离出来。三羟甲基氨基甲烷 (Tris-HCl) (pH8.0) 溶液可提供一个缓冲环境, 防止 DNA 被降解。

根、根茎、茎木类、皮类 通常根和根茎组织中多酚、多糖含量高, 在研磨时多酚极易氧化成醌类, 使 DNA 带有一定颜色, 在纯化过程中很难去除, 影响后续的 PCR 反应, 所以在提取根及根茎类药材 DNA 时一定要注意多糖、多酚的去除。提取此类药材 DNA 时水浴时间一般为 90 分钟, 对于质地坚硬的根、根茎类和茎木类药材, 可以延长水浴时间并降低水浴温度, 如 56°C 水浴 8~12 小时, 使得 DNA 充分释放到缓冲溶液中。此外, 根茎类药材由于富含纤维和淀粉等贮藏物质, 需加大样品量才能提取到足量 DNA, 可用大体积离心管 (5ml 或 15ml) 抽提。皮类中药材组织中富含薄壁组织和纤维等, 加液氮不易研磨成细粉, 需适当增加样品量, 同时应增加 β -巯基乙醇和 PVP 的使用量。

叶、花、全草类 该类药材采用试剂盒法一般都能成功提取其 DNA, 对于保存时间较久的叶、花、全草类药材可适当增加水浴时间, 同时适当降低水浴温度, 如 56°C 水浴 8~12 小时。

果实、种子类 果实及种子类中药材中多富含油脂, 研磨时易被氧化, 且易黏着在研钵壁上, 损失较大, 提取时需增加样品量。另外, 对研磨后的材料可用丙酮浸提, 去除脂溶性酚类化合物。

动物药材 肌肉类动物药材如海龙、蛇类、蛤蚧等, 需使用 75%乙醇擦拭表面消除外源性污染, 待乙醇挥发后进行充分磨碎。含有脂类较多的动物内脏器官如蛤蟆油, 首先用不含蛋白酶 K 和十二烷基硫酸钠 (SDS) 的缓冲液浸泡药材, SDS 是一种阴离子表面活性剂, 在 $55\sim 65^{\circ}\text{C}$ 条件下能裂解细胞, 释放出核酸; 然后在试剂盒消化缓冲液中增加 SDS 含量, 有利于脱去脂类。角甲类药材如龟甲、鳖甲和鹿茸等, 由于 DNA 含量较低, 样品量要适当增大, 也可用大体积离心管抽提。壳类药材如石决明、瓦楞子、蛤壳等, 由于存在共生或寄生生物, 提取前需进行去除。

3. PCR 扩增

植物类中药材及其基原物种扩增 ITS2 或 psbA-trnH 序列, 动物类中药材及其基原物种扩增 COI 序列, 通用引物及扩增条件如下, 特殊规定见各药材项下。

ITS2 序列扩增正向引物 ITS2F: $5'\text{-ATGCGATACTTGGTGTGAAT-3'}$; 反向引物 ITS3R: $5'\text{-GACGCTTCTCCAGACTACAAT-3'}$ 。psbA-trnH 序列扩增正向引物 psbAF: $5'\text{-GTTATGCATGAACGTAATGCTC-3'}$; 反向引物 trnHR: $5'\text{-CGCGCATGGTGGATTCAACAATCC-3'}$ 。COI 序列扩增正向引物 HCO2198: $5'\text{-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'}$; 反向引物 LCO1490: $5'\text{-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'}$ 。

PCR 反应体系以 25 μ l 为参照, 包括: 1 $\times$ PCR 缓冲液(不含 MgCl₂), 2.0mmol/L MgCl₂, 0.2mmol/L dNTPs, 0.1 μ mol/L 引物对, 模板 DNA, 1.0U Taq DNA 聚合酶, 加灭菌双蒸水至 25 μ l。设置未加模板 DNA 的 PCR 反应为阴性对照。

ITS2 序列扩增程序: 94 $^{\circ}$ C 5 分钟; 94 $^{\circ}$ C 30 秒, 56 $^{\circ}$ C 30 秒, 72 $^{\circ}$ C 45 秒, 35~40 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 分钟。psbA-trnH 序列扩增程序: 94 $^{\circ}$ C 5 分钟; 94 $^{\circ}$ C 1 分钟, 55 $^{\circ}$ C 1 分钟, 72 $^{\circ}$ C 1.5 分钟, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 7 分钟。COI 序列扩增程序: 94 $^{\circ}$ C 1 分钟; 94 $^{\circ}$ C 1 分钟, 45 $^{\circ}$ C 1.5 分钟, 72 $^{\circ}$ C 1.5 分钟, 5 个循环; 94 $^{\circ}$ C 1 分钟, 50 $^{\circ}$ C 1.5 分钟, 72 $^{\circ}$ C 1 分钟, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 分钟。

4. PCR 产物检测

采取琼脂糖凝胶电泳方法检测 PCR 产物。电泳后, PCR 产物应在相应的 DNA 条形码序列长度位置(具体见各药材项下)出现一条目的条带, 阴性对照应无条带。

5. 测序

切取目的条带所在位置并在紫外灯下迅速凝胶, 采用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒进行纯化。使用 DNA 测序仪对目的条带进行双向测序, PCR 扩增引物作为测序引物, 测序原理同 Sanger 测序法。有目的条带的样品在测序仪上进行双向测序。

6. 中药材 DNA 条形码序列获得

(1) 序列拼接 对双向测序峰图应用有序列拼接功能的专业软件进行序列拼接, 去除引物区。

(2) 序列质量与方向 为确保 DNA 条形码序列的可靠性, 需去除测序结果两端信号弱或重叠峰区域, 序列方向应与 PCR 扩增正向引物方向一致, 获得相应的 DNA 序列。

7. 结果判定

将获得的序列与国家药品管理部门认可的中药材 DNA 条形码标准序列比对。

三、方法学验证

应符合《中国药典》四部“指导原则 9101”相关要求。

1. 影响因素考察

考察 DNA 条形码分子鉴定法的影响因素, 包括 DNA 提取(样品量、水浴温度和水浴时间)、PCR 条件(变性时间、退火温度与时间及延伸时间)和产物纯化(考察不同纯化试剂盒), 保证实验方法的准确性。

2. 方法适用性考察

采用 DNA 条形码分子鉴定法对 20 批次以上药材或基原物种进行测定, 积累数据, 确定种内序列变异大小, 保证该测定方法的适用性。

3. 基原物种对比验证

以分类学家确认的基原物种叶片为对象, 采用该方法获得 DNA 条形码数据, 与相应药材产生的 DNA 条形码数据进行对比, 避免内生真菌等污染, 保证结果准确性。

四、注意事项

(1) 实验场所应具备分子生物学实验室的基本条件。

(2) 本法暂不适用于混合物与炮制品的鉴定及硫磺熏蒸等造成不适用的情况。

(3)为防止外源微生物污染,实验前须将实验用具进行高压灭菌,并用 75%乙醇擦拭药材表面。有些药材本身含有内生真菌,如果内生真菌存在于药材的外围组织,则选用内部组织进行实验。如果真菌遍布整个药材,植物类药材需选用 *psbA-trnH* 条形码(真菌内不含有该基因片段),不能选用 ITS2 序列。为进一步确保实验结果不被真菌污染,实验者可在 GenBank 数据库应用 BLAST 方法对所获 ITS2 序列进行检验,以确保序列鉴定准确。

(4)本法用于鉴定药材的基原物种,不能确定药用部位。

(5)必要时结合其他鉴别方法综合判断。

(6)种内阈值的确定。同一物种的不同样品间存在一定的变异范围,即种内变异阈值。不同物种,不同条形码序列均会影响种内变异范围。各基原物种的种内变异范围(种内遗传距离阈值)应在药材品种项下具体明确。

①ITS2: ITS(internal transcribed spacer of nuclear ribosomal DNA)为内部转录间隔区,是核糖体 RNA(rRNA)基因非转录区的一部分。ITS 位于 18S rRNA 基因和 28S rRNA 基因之间,中部被 5.8S rRNA 基因一分为二,即 ITS1(the first internal transcribed spacer)区和 ITS2(the second internal transcribed spacer)区。5.8S、18S 和 28S 进化速率较慢,常用于探讨科级和科级以上等级的系统发育问题。而间隔区 ITS(包括 ITS1 和 ITS2)进化速率较快,一般用于研究属间、种间甚至居群间等较低分类等级的系统关系。

②*psbA-trnH*:*psbA-trnH* 基因间区是位于叶绿体基因力基因和基因之间的一段非编码区,该区进化速率较快,常用于植物属间、种间的系统发育研究。

③COI: COI 为线粒体基因组的蛋白质编码基因,全称为细胞色素 C 氧化酶亚基 I(cytochrome C oxidase subunit I),由于该基因进化速率较快,常用于分析亲缘关系密切的种、亚种及地理种群之间的系统关系。