

· 专论 ·

中药 DNA

陈士林^{1,2*}, 姚辉¹, 韩建萍¹, 辛天怡¹, 庞晓慧¹, 石林春¹,
罗焜¹, 宋经元¹, 侯典云¹, 石上梅³, 钱忠直³

(1. 中国医学科学院 北京协和医学院 药用植物研究所 濒危药材, 北京 100193;
2. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700; 3. 国家药典委员会, 北京 100061)

[摘要] 中药 DNA 条形码技术, 国家药典委员会通《中国药典》中
人中药 DNA 条形码技术, 通过大 中药 DNA 条形码技术, ITS2
, *psbA-trnH* 中药 DNA 条形码技术, COI、ITS2 中药 DNA 条形码技术。文
中药 DNA 条形码技术, 中药 DNA 条形码技术。

[关键词] 中国药典; 中药; DNA; 条形码技术; 中药 DNA 条形码技术;

学 传 中 术, 传 有 DNA
化 中药, 部 (A)、(G)、(C)、(T)4
药 迁, 药, 此 DNA
此外, 药 短 难 满足市场需求, 民间常
他 似 取 而, 中药 DNA
杂 传、 中药 ITS2
化 中药 有 限, 中药 ITS2
证 中药、有、有 有 *psbA-trnH* 中药 COI
中药 DNA 有、有、有 有 ITS2 中药
DNA 人、国 药 有 中药 DNA
会 通 《中国药典》 中 人 中药 DNA
通 大 中药 ITS2 *psbA-trnH*
DNA 药 DNA COI
、ITS2 药 DNA
中药 DNA
中药
药 技术。

1 中药 DNA
1.1 DNA 中 公、学 技
短 DNA

[编号] 20130105018
[目] 国 科学 (81130069); 国 技术
(863) (2012AA021602); 部 学
(IRT1150)
[信] * , Tel: (010)57833199, Fax: (010)57833028,
E-mail: slchen@implad.ac.cn

醇,可以抑制 化反 化。PVP(乙)
是酚 ,能 多酚 一 不 质,有效
除多酚, DNA 提取过程中多酚 ; 时 能 多
糖结 ,有效 除多糖。 此 PVP β - 乙醇 使
,能够有效地 DNA 提取过程中多酚 多糖 。
EDTA(乙二 乙) Mg^{2+} 或 Mn^{2+} ,抑制 DNase(DNA
) ;CTAB(三甲 化)是一 离 表面
剂,可 解 , DNA 复 高 液,
液 浓度 一 程度, 液中沉淀, 离心 可
CTAB DNA 复 质、多糖 质。三羟甲
甲 (Tris-HCl) (pH 8.0) 提供一 环 ,
DNA 破
、 、皮 通常 组织中多酚、多
糖 高, 时多酚 化 , 纯化过程中
难 除,使 DNA 有一 色, PCR 反 ,所以
提取 药 DNA 时一 要注意多糖、多酚
除。提取 药 DNA 时 时间一 为 90 min,
质地 药 ,可以采 长
时间,如 56 $^{\circ}C$ 过 ,使得 DNA 充 释放 液
中。此外, 药 由 质,需 多样
品 能提取 足 DNA,可 大 离心 (5 mL 或 15
mL) 提。皮 中药 组织中 壁组织 等,加液
不 粉,需适当增加样品 , 增加 β -
乙醇 PVP 使。
、花、草 该 药 采 试剂盒一 能 提
取 DNA, 保存时间 、花、草 药 可适当增
加 时间, 时适当 度,如 56 $^{\circ}C$ 过 等。
果实、 果实 中药 中多 油脂,
时 化, 着 壁上,损失 大,提取时需增
加样品 。 外, 可 提, 除脂
酚 化。
动 药 常 SDS(二 硫) 理 试
剂盒 提取 DNA。SDS 是一 离 表面 剂, 55 ~ 65
 $^{\circ}C$ 下能 解 ,释放 核。肌 动 药 如海
、 、 等,需进行 外 处理,并 需要充 碎;
有脂 多 动 内

others(nr etc.) 库, BLAST。BLAST 结果 相 最高(max ident) , 为 询 最 近 。

1.3 DNA 库 建

建立 DNA 库 , 主 品, 典 方 , 样 本 , 不 样本 20 以 。 具 ITS2 *psbA-trnH* COI 等 DNA , 该 DNA 异大 。 实验获得 GenBank DNA 须 过核 方 录入 DNA 库, 库进 。

1.4 方 验证

1.4.1 素 察 察 DNA 素, DNA (样品 、 、)、PCR (、) (察不), 证实验方 。

1.4.2 察 主要 为 复 察、 察 现 察。

复 , 3 品, 3 品进 6 验 结果进 评 。实验结果 本 致。

, 察实验 (不 人员、不 仪 、不 作 实验) 结果 , 实验 不 操作人员 结果进 察。

现 , 实验结果 3 家以 实验 现, 相 样品 不 实验 获得 DNA 相 。

1.4.3 方 察 DNA 20 以 进 , , 异大 , 证该 方 。

1.4.4 验证 以 家 为 象, 该方 获得 DNA , 相 DNA 进 , 等 , 证结果 。

1.5 注 项

实验 具 实验 本 。

为 , 实验 须 实验 具进 高 灭 , 并 75% 醇 表面。 本 , 果 存 , 进 实验。 果 , , *psbA-trnH* (不 该), 不 ITS2 。 为进 步 实验结果不 , 者 GenBank 库 为 。

DNA 不 位, 不 制 品 。 DNA DNA 进 , 该方 。

, 不 位。 不 样品 存 异 , 异 。 不 , 不 异 (遗) 品 具 明 。

2 DNA 起草说明 DNA 大 实验样本 , 实验 样本 。

2 373 样品 进 了 DNA DNA ITS/ITS2 *psbA-trnH* PCR 增, 381 样品(26 47 58), 草 1 679 样品(142 482 912), 花 70 样品(10 16 22), 52 样品(16 20 24), 果实 90 样品(16 20 33), 18 样品(8 11 11), 皮 20 样品(6 6 6), 63 样品(3 3 4) 。

DNA DNA , 为 。 DNA 主要 核 、DNA 、PCR 增、泳、 、 结果 等步 。 DNA 起草说明具 。

2.1 DNA 核

2.1.1 ITS2 *psbA-trnH* DNA 要 DNA 。 , 者主要 绿 核 多 [1-9]。2009 , 作 550 907 样品 7 (*rbcL*, *matK*, *rpoC1*, *ropB*, *psbA-trnH*, *psbK-psbI*, *atpF-atpH*) 进 了 , 建 *rbcL* + *matK* 作为

科 141 1 757 物 的

2.4 确 可靠 DNA 据

DNA 据 可靠 是中药 DNA 关。目 据 ,如 GenBank,EMBL 等,由 者进 立提 ,缺 相互之间 验证, 据质 差不 ,中药 DNA 序 据 系统 表 不足。

为保证中药 DNA 据 可靠 , 需要 上保证 可靠 ,然 采 严 序 机制确保获得序 样品 一 ,最

- sHpeSjt dso A 9y j uE uE 8s 3u- j o A 9y 8i 3u- j o @9y j j @j uE 8i 3u- j o @9- MMSj uE 8a 3u- j o - A 9y j - j u
- [7] Presting G G. Identification of conserved regions in the plastid genome; implications for DNA barcoding and biological function [J]. Can J Bot, 2006, 84: 1434.
 - [8] Kress W J, Erickson D L. A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region[J]. PLoS ONE, 2007, 2: e508.
 - [9] Chase M W, Cowan R S, Hollingsworth P M, et al. A proposal for a standardised protocol to barcode all land plants[J]. Taxon, 2007, 56: 295.
 - [10] CBOL Plant Working Group. A DNA barcode for land plants[J]. Proc Nat Acad Sci USA, 2009, 106: 12794.
 - [11] Thomas C. Plant bar code soon to become reality[J]. Science, 2009, 325: 526.
 - [12] Chen S L, Yao H, Han J P, et al. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species [J]. PLoS ONE, 2010, 5: e8613.
 - [13] Yao H, Song J Y, Liu C, et al. Use of ITS2 region as the universal DNA barcode for plants and animals[J]. PLoS ONE, 2010, 5 (10): e13102.
 - [14] China Plant BOL Group. Comparative analysis of a large dataset indicates that ITS should be incorporated into the core barcode for seed plants[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108: 19641.
 - [15] 陈士林, 庞晓慧, 姚辉, 等. 中药 DNA 条形码方向[J]. 世界科学技术——中医药现代化, 2011, 13 (5): 747.
 - [16] Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes[J]. Proc R Soc Lond B, 2003, 270: 313.
 - [17] Hebert P D N, Ratnasingham S, Dewaard J R. Barcoding animal life: cytochrome *c* oxidase subunit I divergences among closely related species[J]. Proc R Soc Lond B (Suppl), 2003, 270: S96.
 - [18] Hebert P D N, Stoeckle M, Zemlak T, et al. Identification of birds through DNA barcodes[J]. PLoS Biol, 2004, 2: 1657.
 - [19] 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]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101: 14812.
 - [20] Smith M A, Fisher B L, Hebert P D N. DNA barcoding for effective biodiversity assessment of a hyperdiverse arthropod group: the ants of Madagascar[J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 2005, 360: 1825.
 - [21] Hajibabaei M, Janzen D H, Burns J M, et al. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera[J]. Proc Natl Acad Sci USA 2006, 103: 968.
 - [22] Yoo H S, Eah J Y, Kim J S, et al. DNA barcoding Korean birds [J]. Mol Cells, 2006, 22: 323.
 - [23] Elias M, Hill R I, Willmott K R, et al. Limited performance of DNA barcoding in a diverse community of tropical butterflies[J]. Proc Biol Sci, 2007, 274: 2881.
 - [24] Kerr K C R, Stoeckle M Y, Dove C J, et al. Comprehensive DNA barcode coverage of north American birds[J]. Mol Ecol Notes, 2007, 7: 535.
 - [25] Tavares E S, Baker A J. Single mitochondrial gene barcodes reliably identify sister-species in diverse clades of birds[J]. BMC Evol Biol, 2008, 8: 81.
 - [26] Ward R D, Zemlak T S, Innes B H, et al. DNA barcoding Australia's fish species[J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2005, 360: 1847.
 - [27] Savolainen V, Cowan R S, Vogler A P, et al. Towards writing the encyclopedia of life: an introduction to DNA barcoding[J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2005, 360: 1805.
 - [28] Ben-David T, Melamed S, Gerson U, et al. ITS2 sequences as barcodes for identifying and analyzing spider mites (Acari: Tetranychidae) [J]. Exp Appl Acarol, 2007, 41: 169.
 - [29] Li Y W, Zhou X, Feng G, et al. COI and ITS2 sequences delimit species, reveal cryptic taxa and host specificity of fig-associated *Sycophila* (Hymenoptera, Eurytomidae) [J]. Mol Ecol Resour, 2010, 10: 31.
 - [30] Prasad P K, Tandon V, Biswal D K, et al. Phylogenetic reconstruction using secondary structures and sequence motifs of ITS2 rDNA of *Paragonimus westermani* (Kerbert, 1878) Braun, 1899 (Digenea: Paragonimidae) and related species[J]. BMC Genomics, 2009, 10(Suppl 3): S25-Q.
 - [31] Rojo S, Stahls G, Perez-Banon C, et al. Testing molecular barcodes: invariant mitochondrial DNA sequences vs the larval and adult morphology of West Palaearctic *Pandasyopthalmus* species (Dio99Sj @j M y j o A y - @M Sno Sy - A j nuE 8 3u- t

ba-trnH intergenic region[J]. *Planta Med* 2009 75 667.

40 Han J P Song J Y Liu C et al. Identification of *Cistanche* species [Orobanchaceae] based on sequences of the plastid *psbA-trnH* intergenic region[J]. *Acta Pharm Sin* 2010 45 126.

41 Sun Z Y Gao T Yao H et al. Identification of *Lonicera japonica* and its related species using the DNA barcoding method[J]. *Planta Med* 2011 77 301.

42 Ma X Y Xie C X Liu C et al. Species identification of medicinal pteridophytes by a DNA barcode marker the chloroplast *psbA-trnH* intergenic region[J]. *Biol Pharm Bull* 2010 33 1919.

43 Song J Y Yao H Li Y et al. Authentication of the family Polygonaceae in Chinese pharmacopoeia by DNA barcoding technique[J]. *J Ethnopharmacol* 2009 124 434.

44 辛天怡 姚辉 罗焜 . 羌 ITS/ITS2 稳 准确 [J]. 2012 47 8 1098.

45 罗焜 马培 姚辉 . 多 秦艽 ITS2 [J]. 2012 47 12 1710.

46 Song J Y Shi L C Li D Z et al. Extensive pyrosequencing reveals frequent intra-genomic variations of internal transcribed spacer regions of nuclear ribosomal DNA[J]. *PLoS ONE* 2012 7 e43971.

47 韩建萍 宋经 刘昶 . 绿 *psbA-trnH* 间 序 肉苁蓉 [J]. 2010 45 1 126.

48 宋经 姚辉 . DNA 策略 关键 [J]. 天然 2009 7 5 322.

49 76 姚辉 宋经 . DNA barcoding [J]. 世界 2007 9 3 7.

50 Pang X Liu C Shi L et al. Utility of the *trnH-psbA* intergenic spacer region and its combinations as plant DNA barcodes a meta-analysis [J]. *PLoS ONE* 2012 7 11 e48833.

51 Chiou S J Yen J H Fang C L et al. Authentication of medicinal herbs using PCR-amplified ITS2 with specific primers[J]. *Planta Med* 2007 73 1421.

52 罗焜 马培 姚辉 . DNA DNA 提取方 [J]. 世界 2012 14 2 1433.

53 曹琳 刘忠权 郝明 . 不 DNA 提取方 [J]. 现 2004 21 6 465.

54 Folmer O Black M Hoeh W et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I from diverse metazoan vertebrates[J]. *Mol Mar Biol Biotechnol* 1994 3 294.

55 Hajibabaei M Janzen D H Burns J M et al. DNA barcodes D c

Principles for molecular identification of traditional Chinese materia medica using DNA barcoding

CHEN Shi-lin^{1, 2*}, YAO Hui¹, HAN Jian-ping¹, XIN Tian-yi¹, PANG Xiao-hui¹,

SHI Lin-chun¹, LUO Kun¹, SONG Jing-yuan¹, HOU Dian-yun¹, SHI Shang-mei³, QIAN Zhong-zhi³

(1. *The National Engineering Laboratory for Breeding of Endangered Medicinal Materials, Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China;*

2. *Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;*

3. *Chinese Pharmacopoeia Commission, Beijing 100061, China*)

[**Abstract**] Since the research of molecular identification of Chinese Materia Medica (CMM) using DNA barcode is rapidly developing and popularizing, the principle of this method is approved to be listed in the Supplement of the Pharmacopoeia of the People's Republic of China. Based on the study on comprehensive samples, the DNA barcoding systems have been established to identify CMM, i. e. ITS2 as a core barcode and *psbA-trnH* as a complementary locus for identification of planta medica, and COI as a core barcode and ITS2 as a complementary locus for identification of animal medica. This article introduced the principle of molecular identification of CMM using DNA barcoding and its drafting instructions. Furthermore, its application perspective was discussed.

[**Key words**] Chinese pharmacopoeia; traditional Chinese materia medica; DNA barcoding; molecular identification; principle

doi:10.4282/cjcmm20130201

[责任编辑 曹阳阳]