

# 基于 DNA 条形码-产地-形态联用的药材溯源新方法研究——以黑果枸杞 1 种伪品为例

顾选<sup>1</sup>, 张晓芹<sup>1</sup>, 宋晓娜<sup>1</sup>, 臧艺玫<sup>1</sup>, 李妍芃<sup>1</sup>, 马长华<sup>1</sup>, 赵百孝<sup>2</sup>, 刘春生<sup>1\*</sup>

(1. 北京中医药大学 中药学院, 北京 100102; 2. 北京中医药大学 针灸推拿学院, 北京 100029)

**[摘要]** 利用 NCBI 核酸数据库中 ITS (internal transcribed spacer) 序列 结合产地分析和形态分析对新发现的一种黑果枸杞混伪品进行溯源研究。通过提取样品 DNA, PCR 扩增及双向测序, 获得样品的 ITS 序列。所得序列用 ContingExpress 软件进行拼接, 截取 ITS 序列全长; 利用 NCBI 核酸数据库中已登录的 ITS 序列进行相似度分析对其进行 DNA 条码溯源; 根据其产地分析 DNA 条形码溯源结果; 再根据形态特征进一步验证结果, 3 种方法联用获得溯源结果。新发现的黑果枸杞混伪品来源于小檗科小檗属植物喀什小檗 *Berberis kaschgarica*。与黑果枸杞的主要区别: 喀什小檗果实表面平滑, 质地轻脆, 黑果枸杞表面皱缩, 质地坚实而硬; 喀什小檗外果皮细胞壁连珠状增厚, 石细胞壁平直, 层纹不明显, 黑果枸杞外果皮细胞壁不增厚, 石细胞壁波浪状, 层纹明显; 喀什小檗的 ITS 序列长度为 606 bp, 黑果枸杞的长度为 654 bp, 二者序列对齐后的相似度为 53.32%。

**[关键词]** 黑果枸杞; 混伪品; ITS 序列; 溯源

传统的药材溯源方法是通过产地调研、标本采集和实验室植物分类鉴定等步骤进行<sup>[1]</sup>, 这种方法需要采集到植物完整标本, 尤其是花的标本, 溯源周期长, 不能满足实际工作中的需要。DNA 条形码是一段短的 DNA 片段, 能够用于物种识别, 其特点是不依赖于植物形态、不受生长发育阶段限制、不依赖于鉴定人员经验, 能够鉴定无背景信息的药用植物<sup>[2-4]</sup>。在 DNA 条形码中, ITS (internal transcribed spacer) 序列的进化速率适中且具有较高的物种分辨率<sup>[5]</sup>, 已经被广泛地应用到中药材的物种鉴定中<sup>[6-9]</sup>。但是, 由于利用 ITS 序列进行分子鉴定时还存在着相似度阈值等问题, DNA 条形码分子鉴定还不能完全解决药材溯源问题; 每种药用植物都有其固定的产地, 野生药用植物产地尤其明确, 产地信息对中药材溯源也有重要作用; 植物的部分信息, 如果果实形态、颜色等, 在科属确定的基础上, 对种的鉴别具有重要意义。本文基于以上思路, 提出“DNA 条形码-产地-形态”联用方法对中药和民族药材进行溯源, 弥补传统溯源方法的缺点, 为进一步提高中药材质量奠定基础。

黑果枸杞为茄科植物黑果枸杞 *Lycium ruthenicum* Murr. 的干燥成熟果实<sup>[10]</sup>, 具有补肾益精, 养肝明目, 补血安神, 生津止渴, 润肺止咳, 清热除蒸, 清肺降火、补虚等功效<sup>[11]</sup>。近年来, 在黑果枸杞中发现了具有清除自由基及抗氧化、抗辐射功能的花青素<sup>[12-13]</sup>, 导致黑果枸杞用量猛增, 市场价格迅速上涨<sup>[14]</sup>。作者在对黑果枸杞市场调查时发现, 市场中存在一种黑果枸杞, 产地为新疆, 但种子粒数和显微结构与黑果枸杞不同, 这种黑果枸杞是产地变异还是其他物种无法确定, 为保证黑果枸杞质量, 对其进行品种溯源具有重要意义。本实验拟采取 DNA 条形码-产地-形态分析相结合的方法对黑果枸杞的这种疑似混伪品进行溯源, 为保证黑果枸杞质量提供依据。

## 1 材料

黑果枸杞药材 3 份, 来源于青海格尔木, 由北京中医药大学刘春生教授鉴定。黑果枸杞的疑似伪品药材 3 份, 来源于新疆喀什市。6 份样品的凭证标本均保存于北京中医药大学大学标本室。

## 2 方法

### 2.1 DNA 提取和 PCR 扩增方法

取样品, 观察形态, 形态结果一致。每份样品取 3 粒果实进行 DNA 提取。各份样本分别用液氮冷冻后研磨成细粉, 采用植物 DNA 提取试剂盒(北京博迈德生物有限公司)提取总 DNA。采用 ITS 序列

**[收稿日期]** 2014-07-05

**[基金项目]** 国际科技合作项目(2011DFA31370)

**[通信作者]** \* 刘春生, 教授, 博士生导师, 研究方向为药用植物学与分子生物学, Tel: (010) 84738624, E-mail: max\_liucs@263.net

**[作者简介]** 顾选, 硕士研究生, E-mail: guxuan123.love@163.com

通用引物<sup>[6]</sup>在PCR扩增仪(TProfessional型,德国Biometra公司)上进行扩增,PCR扩增条件:50 μL体系含2×Taq PCR MasterMix 25 μL,引物P1和P4各加2.5 μL(5 μmol·L<sup>-1</sup>),DNA模板4 μL,ddH<sub>2</sub>O 16 μL。PCR扩增程序:94℃预变性5 min,94℃变性1 min,55℃退火1 min,72℃延伸1 min,40个循环后,72℃延伸10 min。PCR产物经1%的琼脂糖凝胶电泳,在紫外灯下检视,均由上海生工生物工程有限公司测序部测序。各样品均采用正向和反向测序,以保证测序的准确性。

## 2.2 序列分析方法

利用ContigExpress软件对测序获得的正、反向序列进行拼接,根据BLAST所获相似度最高物种的ITS序列边界,截取待鉴定物种的ITS序列,然后利用相似度法和系统发育树法分析序列。

## 2.3 基于DNA条形码的溯源方法

根据NCBI中BLAST功能,检索NCBI中注册的相似度最高的物种,按照相似度最高的物种截取ITS全长。再利用样品的ITS序列检索,根据属间差异为9.6%~28.8%、种间差异值为1.2%~10.2%的研究结果<sup>[15]</sup>,种内的差异小于1%<sup>[16]</sup>,本文以相似度90%以上为属的溯源依据,以相似度99%以上为物种溯源依据,获得溯源结果。

## 2.4 基于产地分析的溯源方法

根据2.3项下获得的科属溯源结果,依据《新疆植物志》记载的新疆分布的该属植物物种信息;在NCBI上下载这些物种的ITS序列,通过相似度法、聚类分析法和特异位点法确定物种,获得物种的溯源结果。

## 2.5 基于形态分析的溯源方法

根据2.4项下获得的溯源结果,查询《新疆植物志》的果实形态信息,通过形态核对,进一步证实2.4项下的溯源结果。

## 2.6 生药学研究及比较

根据颜色、形状、大小等观察混伪品的性状特征,在显微镜(OLYMPUS CX-21,中国)下观察显微特征,描述混伪品的性状和显微特征,比较混伪品和黑果枸杞的区别;利用DNAMAN软件分析混伪品和黑果枸杞的分子序列特征和相似度差异。

# 3 结果与分析

## 3.1 基于DNA条形码的溯源

### 3.1.1 科属的溯源

6份样品的测序峰图良好,3

份疑似混伪品测序结果一致,3份黑果枸杞的测序结果一致,各选择一条序列用于后续分析。截取ITS片段后,经BLAST检索,混伪品与小檗科小檗属*Berberis* Linn.植物相似度最高,相似度范围为95%~100%,与其他属相似度均低于90%。因此,该混伪品来自小檗科小檗属植物。

**3.1.2 种的溯源** 根据DNA条形码溯源指标(与混伪品相似度达到99%以上),全缘小檗*B. integririma* (JN228267.1)、威宁小檗*B. weiningensis* (JN012238.1)、有棱小檗*B. angulosa* (HM347900.1, GU934612.1)、华西小檗*B. silva-taroucana* (AF328969.1)、永思小檗*B. tsienii* (JN012234.1)、错那小檗*B. griffithiana* (GU934673.1)及球果小檗*B. insigni* (GU934682.1)等植物可能为黑果枸杞混伪品的基原。

## 3.2 基于产地分析的溯源

由于混伪品产自新疆,在3.1.2分析结果中没有物种分布于新疆,原因可能是新疆分布的小檗属植物的ITS序列和混伪品的相似度也能达到99%以上,但未在NCBI中注册而已,因此,该混伪品可能的基原包括:喀什小檗*B. kaschgarica* Rupr.、西伯利亚小檗*B. sibirica* Pall.、黑果小檗*B. heteropoda* Schrenk.、红果小檗*B. nummularia* Bge.和小檗*B. amurensis* Rupr.<sup>[17]</sup>。

## 3.3 基于形态分析的溯源

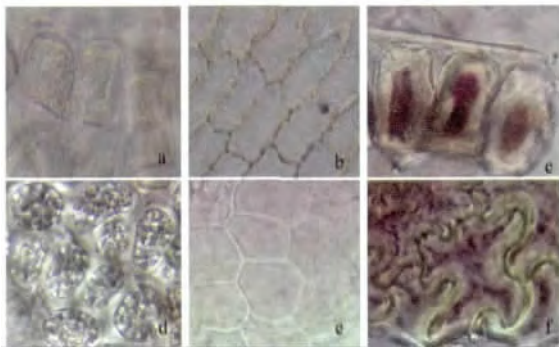
新疆分布的小檗属植物果实颜色分成2类,一类是红色调果实,包括西伯利亚小檗、红果小檗、小檗,这类小檗属植物不符合待溯源混伪品的颜色特征;另一类是黑色调果实,包括黑果小檗和喀什小檗,其中黑果小檗果实紫黑色,直径达1.2 cm,微被白粉,种子长卵形,不符合待溯源混伪品特征;喀什小檗果实紫黑色,长约6~8 mm,直径约6 mm,种子3~4枚,长圆状而弯曲,背部圆而腹部具钝棱,符合待溯源混伪品的特征<sup>[17]</sup>,因此,该混伪品来源为小檗科植物喀什小檗。

## 3.4 混伪品的生药学研究及与正品的比较

**3.4.1 性状特征及比较** 混伪品为圆形或椭圆形,多压瘪,长7~10 mm,直径6~9 mm,表面黑色,有光泽,顶端具宿存花柱。果皮薄,易碎,种子3~4粒,种子长卵形,长约5 mm,表面棕黑色,稍细一端弯曲,种仁黄白色,质轻脆,气微,味酸、咸。与黑果枸杞的主要区别是:喀什小檗果实较大,长7~10

mm,直径6~9 mm,表面平滑,而黑果枸杞果实长约3 mm,直径4~7 mm,表面皱缩;喀什小檠具有宿存花柱,黑果枸杞常具有灰绿色果柄及宿存的花萼;喀什小檠质地轻脆,而黑果枸杞质地坚硬;喀什小檠种子为长卵形,尖端弯曲,而黑果枸杞种子近圆形;喀什小檠的种子3~4粒,黑果枸杞种子多粒。喀什小檠味酸、咸,而黑果枸杞味酸、甘。

**3.4.2 显微特征及比较** 混伪品粉末暗红色至暗紫色。种皮细胞棕黄色,多角形,胚乳细胞长方形,内有糊粉粒。果皮表皮细胞淡棕黄色,多角形,细胞壁连珠状增厚,外果皮石细胞长方形,纤维成束,内果皮石细胞卵圆形或近方形,细胞内为紫红色。导管主为梯纹和网纹导管,单粒淀粉粒。与黑果枸杞的主要区别是:喀什小檠胚乳细胞长方形,黑果枸杞胚乳细胞类圆形;喀什小檠果皮细胞多角形,细胞壁连珠状增厚,淡棕黄色,而黑果枸杞果皮细胞也是多角形,壁不增厚;喀什小檠外果皮石细胞壁平直,层纹不明显,黑果枸杞外果皮石细胞壁波浪状,层纹明显,见图1。



a, b, c 分别为喀什小檠的胚乳细胞、外果皮细胞及外果皮石细胞;  
d, e, f 分别为黑果枸杞的胚乳细胞、外果皮细胞及外果皮石细胞。

图1 喀什小檠和黑果枸杞的显微区别

Fig. 1 Differences of *Berberis kaschgarica* and *Lycium ruthenicum* in microscopic characteristics

**3.4.3 DNA条形码特征及比较** 混伪品喀什小檠的ITS序列长度为606 bp, G+C量为51.16%, ITS1长度为228 bp, G+C量为46.93%, 5.8S长度为159 bp, G+C量为54.72%, ITS2长度为219 bp, G+C量为52.97%。黑果枸杞的ITS序列长度为654 bp, G+C量为62.08%, ITS1长度为243 bp, G+C量为62.96%, 5.8S长度为154 bp, G+C量为51.95%, ITS2长度为257 bp, G+C量为67.73%。

以上结果表明,喀什小檠的ITS, ITS1, ITS2序列的长度均小于黑果枸杞, G+C含量低于黑果枸杞。利用DNAMAN软件将喀什小檠与黑果枸杞的ITS序列对齐后,相似度仅为53.32%,二者序列差异较大。

## 4 讨论

### 4.1 中药材混伪品溯源新方法

单一的DNA条形码鉴定方法还不能满足药材溯源的要求,尤其是一些尚未登录核酸数据库的物种,通过分子鉴定技术能够进行科属溯源,但不能进行物种溯源,有时相似度均达到99%以上的有多个物种,这时利用DNA条形码鉴定技术进行药材溯源也存在困难;仅采用产地或形态鉴定,由于缺少基础信息,往往无从下手,例如本文的黑果枸杞混伪品,但从产地和形态进行溯源,由于没有科属信息,无法进行溯源。采用DNA条形码-产地-形态联合分析,先进行DNA条形码溯源, DNA条形码溯源方法是通过核酸数据库鉴定样品,能够不受样品开花季节限制及不受样品外形的影响,对无背景信息的药材溯源提供了重要的参考,然后利用产地-形态信息进行溯源,各种方法相互补充,弥补了单一鉴定方法的不足,能够快速、准确的对未知样品进行溯源。

### 4.2 黑果枸杞新的混伪品

本研究结果表明,黑果枸杞中新发现的伪品为小檠科小檠属植物喀什小檠。喀什小檠分布在新疆,其化学成分主要为氨基酸、蛋白质、糖及糖苷、皂苷、酚类、有机酸、黄酮类、香豆素类、挥发油等<sup>[18]</sup>,具有活血、利胆、治疗高血压的疗效,不能掺入黑果枸杞使用。但喀什小檠在维药中代茶饮,也具有一定的保健价值,值得进一步开发。

#### [参考文献]

- [1] 康延国. 中药鉴定学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2011: 31.
- [2] 陈士林, 郭宝林, 张贵君, 等. 中药鉴定学新技术新方法研究进展[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(8): 1043.
- [3] 陈士林, 姚辉, 韩建萍. 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.
- [4] Xin T Y, Yao H, Gao H H, et al. Super food *Lycium barbarum* (Solanaceae) traceability via an internal transcribed spacer 2 barcode[J]. Food Res Int, 2013, 54(2): 1699.
- [5] 王建波, 张文驹, 陈家宽. 核rDNA的ITS序列在被子植物系统与进化研究中的应用[J]. 植物分类学报, 1999, 37(4): 407.
- [6] 程小丽, 廖彩丽, 刘春生, 等. 基于NCBI核酸数据库的紫荆

- 皮混淆品种华中五味子的 DNA 鉴定研究[J]. 中国中药杂志 2012, 37(17): 2534.
- [7] 杨耀华, 赵志礼, 嘎务, 等. 基于 ITS 序列的藏药“川布”的分子鉴定研究[J]. 中国中药杂志 2013, 38(21): 3773.
- [8] 冯杉杉, 郑司浩, 李亚康, 等. 中药材威灵仙及其伪品 DNA 条形码鉴别研究[J]. 药学报 2014, 49(2): 260.
- [9] Ma X C, Xie C X, Guan M et al. High levels of genetic diversity within one population of *Rheum tanguticum* on the Qinghai-Tibet Plateau have implications for germplasm conservation[J]. Pharmaceutical Crops, 2014, 5: 1.
- [10] 甘青梅, 左振常, 昌也平, 等. 藏药“旁玛”的考证及生药学研究[J]. 中国民族民间医药杂志, 1995, 2(1): 31.
- [11] 甘青梅, 骆桂法. 藏药黑果枸杞开发利用的研究[J]. 青海科技, 1999, 4(1): 17.
- [12] 陈海魁, 蒲凌奎. 黑果枸杞的研究现状及其开发利用[J]. 黑龙江农业科学 2008(5): 157.
- [13] Ni W, Gao T, Wang H, et. Anti-fatigue activity of polysaccharides from the fruits of four Tibetan plateau indigenous medicinal plants[J]. Ethnopharmacol 2013, 150(2): 529.
- [14] Peng Q, Song J, Lv X, Wang Z, et. Structural characterization of an arabinogalactan protein from the fruits of *Lycium ruthenicum* [J]. J Agric Food Chem 2012, 60(37): 9424.
- [15] 屈良鸽, 陈月琴. 生物分子分类检索表——原理与方法[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 1999, 38(1): 11.
- [16] Landeweert R, Leeftang P, Kuyper T W, et al. Molecular identification of ectomy corrhizal mycelium in soil horizons [J]. Appl Environ Microbiol 2003, 69(1): 327.
- [17] 新疆植物志编辑委员会. 新疆植物志[M]. 乌鲁木齐: 新疆科技卫生出版社, 1995.
- [18] 王燕. 喀什小檗果实化学成分定性分析[J]. 塔里木大学学报 2009, 21(1): 19.

## A new herbs traceability method based on DNA barcoding—origin—morphology analysis——an example from an adulterant of ‘Heiguogouqi’

GU Xuan<sup>1</sup>, ZHANG Xiao-qin<sup>1</sup>, SONG Xiao-na<sup>1</sup>, ZANG Yi-mei<sup>1</sup>, LI Yan-peng<sup>1</sup>,  
MA Chang-hua<sup>1</sup>, ZHAO Bai-xiao<sup>2</sup>, LIU Chun-sheng<sup>1\*</sup>

(1. School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China;

2. School of Acupuncture-Moxibustion and Tuina, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

**[Abstract]** The fruit of *Lycium ruthenicum* is a common folk medicine in China. Now it is popular for its antioxidative effect and other medical functions. The adulterants of the herb confuse consumers. In order to identify a new adulterant of *L. ruthenicum*, a research was performed based on NCBI Nucleotide Database ITS Sequence, combined analysis of the origin and morphology of the adulterant to traceable varieties. Total genomic DNA was isolated from the materials, and nuclear DNA ITS sequences were amplified and sequenced; DNA fragments were collated and matched by using ContingExpress. Similarity identification of BLAST analysis was performed. Besides, the distribution of plant origin and morphology were considered to further identification and verification. Families and genera were identified by molecular identification method. The adulterant was identified as plant belonging to Berberis. Origin analysis narrowed the range of sample identification. Seven different kinds of plants in Berberis were potential sources of the sample. Adulterants variety was traced by morphological analysis. The united molecular identification—origin—morphology research proves to be a preceding way to medical herbs traceability with time-saving and economic advantages and the results showed the new adulterant of *L. ruthenicum* was *B. kaschgarica*. The main differences between *B. kaschgarica* and *L. ruthenicum* are as follows: in terms of the traits, the surface of *B. kaschgarica* is smooth and crispy, and that of *L. ruthenicum* is shrinkage, solid and hard. In microscopic characteristics, epicarp cells of *B. kaschgarica* thickening like a string of beads, stone cells as the rectangle, and the stone cell walls of *L. ruthenicum* is wavy, obvious grain layer. In molecular sequences, the length of ITS sequence of *B. kaschgarica* is 606 bp, *L. ruthenicum* is 654 bp, the similarity of the two sequences is 53.32%.

**[Key words]** *Lycium ruthenicum*; ITS sequence; adulterant; traceability

doi: 10.4268/cjmm20142412

[责任编辑 吕冬梅]