

DOI: 10.19403/j.cnki.1671-1521.2019.06.016

现代生物技术鉴定人参属药材的研究进展

查琳, 王影, 杨怀雷, 徐芳菲, 李蕾, 谢丽娟, 郭畅冰, 曹志强*
(吉林人参研究院·吉林通化·134001)

摘要: 生物技术是一门应用生物科学研究成果以及工程手段增加数量和提高质量从而满足人类日益增长的对生物制品需求的技术。近年来, 由于假冒伪劣人参属中药充斥市场, 为控制其质量、保证临床用药安全和有效, 应用现代生物技术对人参属药材鉴别具有重大的意义。

关键词: 人参属; DNA 分子鉴定技术; 电泳技术; DNA 条形码; 分子遗传标记

Research progress of DNA Barcoding in medicinal plants

ZHA Lin, WANG Ying, YANG Huai-lei, XU Fang-fei, LI Lei, XIE Li-juan, GUO Chang-bing, CAO Zhiqiang*
(Jilin Ginseng Research Institute, Jilin, Tonghua, 134001)

Abstract: Biotechnology is an applied biological science research and engineering to increase the quantity and improve the quality of human beings to meet the growing demand for bio-technology products. In recent years, Panax counterfeit medicine flooding the market, for the control of its quality, and ensure safe and effective clinical use, the application of modern biotechnology to identify the herbs ginseng genus of great significance.

Keywords: Panax; DNA molecular identification techniques; electrophoresis; DNA barcoding; Molecular genetic markers

五加科人参属^[1]Panax 包括多种药用植物, 其中具有很高的药用价值的有人参 *Panax ginseng*、西洋参 *P. quinquefolius* 和三七 *P. notoginseng* 等。近年来, 假冒伪劣人参属中药充斥市场, 为控制其质量、保证临床用药安全和有效, 需要对其进行严格鉴定。过去传统的鉴定技术, 主要是经验性的性状鉴别, 如通过眼观、鼻闻、口尝、手摸及升华、水火试等对药物的形状、大小、轻重、颜色、表面特征、折断面纹理、气味、粘性、酸碱性等进行鉴别和描述。这些方法虽然简便、快速, 但由于人们对人参属药材的药用价值的迫切需要, 应用现代生物技术对人参属药材鉴别具有重大的意义。

随着科学手段的不断进步, 生物技术在各行各业得到广泛应用, 而且生物技术已经在农业、环保、医药等领域首先取得了实质性成就。生物技术是一门应用生物科学研究成果以及工程手段增加数量和提高质量从而满足人类日益增长的对生物制品需求的技术, 它的具体内容包括细胞工程、发酵工程、酶和蛋白质工程、基因工程四个方面。生物技术的发展不仅为基因药物带来了福音, 也使中药的鉴别分析有了进一步发展。因此, 对于鉴别人参属药材, 现代生物技术也越

来越趋于成熟。因此, 本文通过现代生物技术中基因和蛋白质工程的角度阐述了对人参的鉴别方法的综述及总结。

1 分子鉴定技术

1.1 DNA 条形码鉴定

DNA 条形码(DNA barcoding)技术是通过比较一段通用 DNA 片段, 对物种进行快速、准确的识别和鉴定, 在物种鉴定方面显示了广阔的应用前景^[2]。陈士林等^[3]在 2010 年提出 ITS2 作为药用植物分子鉴定的通用序列。该鉴定技术只需少数基因片段, 其过程快速, 并具有较高的稳定性和可重复性, 操作简单^[4]。Chen 等^[5]将候选基因在 753 个属 4800 个物种 6600 多个样品中进行评估后, 建议将 ITS2 作为药用植物标准 DNA 条形码 pbsA-trnH 可作为 ITS2 的互补序列对药用植物进行鉴定在人参 DNA 条形码序列筛选研究中。Zuo 等^[6]从 95 份人参属样品中, 比较了 13 条 DNA barcoding 的鉴定效率, 最终得出该鉴定条形码序列为 pbsA-trnH 和 ITS。于 2010 年比较了 11 个候选 DNA 条形码, 在人参属药材上的应用推荐将 ITS 和 pbsA-trnH 作为人参属鉴定的条码基因。罗志勇等^[7]采用改

作者简介: 查琳, 女, 硕士, 主要从事中药新药研究与开发

* 通信作者: 曹志强, 男, 研究员, 主要从事人参、西洋参研究、标准制定、产品研发和规范化种植, E-mail: th5161@163.com.

良的 CTAB 法从人参、西洋参新鲜或干燥的根组织中提取得到了纯度较高的 DNA。Yao^[8]系统论述了 ITS2 作为植物条形码的鉴定的优点,利用 ITS2 的保守性设计通用引物,扩增成功率高,可以高效鉴别相近物种等。此方法的结果客观准确,方法简易,在人参类中药材的鉴定上有明显的优势,但单一的 DNA 条码技术无法解决人参类中药材鉴别的难题^[9]。

1.2 DNA 分子遗传标记技术

1.2.1 限制性片段长度多态性分析技术(RFLP)

如果两种植物不同,其 DNA 分子则会有差别,经限制性内切酶消化后所得的限制性酶谱的条带方式将出现不同,即产生多态性。将药材的 DNA 用限制性内切酶消化后,作 RFLP 分析,可确定其基因的种属特异性。如马小军等^[10]采用 RFLP 技术对 5 个人参类型进行了比较研究,找到了其 DNA 特征指纹差异。Ngan^[11]等采用 PCR-RFLP 方法考察了 5.8SrDNA ITS 区,成功区分出人参属 6 种植物及其 2 种易混伪品。罗志勇等^[12]运用这一技术,成功地构建出高质量的人参、西洋参 AFLP 图谱,发现北美西洋参引种到吉林的西洋参图谱之间有一定差异,但小于人参与西洋参间的差异,说明引种的西洋参产生了一定的变异,但与人参的种间差异更为显著。王雪松^[13]等采用 PCR-RFLP 的鉴定方法提取西洋参与人参基因组 DNA 19kb,并扩增核糖体 122bp 大小的基因片段。经酶切后西洋参为 80bp 和 42bp 长度两条片段,而人参仍为 122bp,西洋参与人参 DNA 具有特异性酶切位点,可作为两者鉴定的有效方法。Diao Y^[14]等应用 PCR-RFLP 对人参、西洋参及竹节参进行鉴别研究,成功地区分原药材及其制剂,证明了该方法可以对参类进行区分。华愉教^[15]等采用 DNA-AFLP 技术对来自不同种源和地域太子参的基因表达差异进行分析,通过克隆测序后的序列对比揭示了太子参药材品质形成的分子机制。但这种技术的缺点是不易准确找到限制性内切酶位点,酶切位点也会随着样品 DNA 降解而丢失。

1.2.2 多聚酶链反应(PCR)测序技术

PCR 是一种模拟自然 DNA 复制过程的体外酶促合成特异性核酸片段技术。它以待扩增的两条 DNA 链为模板,由一对人工合成的寡核苷酸引物介导,通过 DNA 聚合酶促反应,在体外进行特异 DNA 序列扩增。PCR 技术具有操作简单、快速、特异、灵敏的特点。由于中药材的加工和储藏过程极不利于 DNA 的保存,而 PCR 技术能对微量或高度降解的样品进行分析,故尤适用于干燥药材鉴别。Fushimi 等^[16]采用

PCR-RFLP 方法对人参属 3 种植物人参、西洋参和竹节参进行了核基因组 18S-rRNA 片段分析较易将其区别开来。

1.2.3 随机引物 PCR 技术(RAPD)

PCR 标记技术采用随机引物对模板 DNA 进行扩增,或对引物进行简单限定,该类标记技术可通过特异条带法和聚类分析法来实现中药材的鉴定。杨维泽等^[17]发现人参属植物人参、西洋参和三七中具有丰富的 SSR 重复基元,设计的人参属 SSR 引物成功地扩增了三七的 SSR 引物,证明利用表达序列标签分析(expressed sequence tag, EST) 数据库建立多态性 EST-SSR 标记是有效可行的。Shaw 等^[18]利用随机扩增多态性 DNA 技术(random amplified polymorphic DNA) RAPD 鉴定人参属药用植物人参、西洋参、三七,得出人参属药用植物与其混伪品的图谱差异较大。Kwon^[19]采用自 AFLP 标记转化而来的物种特异 SCAR 标记技术(sequence characterized amplified region, SCAR)快速将三七从同属其他物种中鉴别出来。陈子易等^[20]通筛选特定的 SSR 引物并扩增出区分人参西洋参的特异性片段。丁建弥^[21]等对人参子药材进行 RAPD 鉴定研究,结果表明其真伪品扩增均能出现差异。日本东京大学 Ozeki 等^[22]运用 RAPD 技术分析人参、高丽参及人参制品,实验表明 RAPD 分析方法不仅可以鉴别人参与其他药材,还可以鉴别人参制剂的中药品种。王戎博^[23]等开发了人参和西洋参之间的内含子长度多态性标记。分别设计了人参和西洋参的特异性引物,并建立了用于人参及西洋参鉴别的多重 PCR 体系。刘丽^[24]等采用 RAPD 标记法,结合 PCR 与聚类分析对三七、人参、西洋参进行了有效地鉴别。此方法存在一定不足,引物进行简单限定进行扩增的方法要随行实验和比较,通用性差。因此,该类方法较难满足良好的鉴定要求。由于 RAPD 是一种显性标记技术,重复性和分辨率较低。

1.3 蛋白质指纹图谱分子鉴定技术

蛋白质指纹图谱是以特异性的蛋白质为检测物质,利用电泳技术呈现出不同的蛋白质谱带,从而将不同的检测对象区分开来。赵皓^[25]采用蛋白质指纹图谱分子对两种人参进行鉴别,鉴别准确率分别为 76% 和 80%。王景^[26]等利用单核苷酸多态性分子标记建立多重 PCR 体系,实现人参品种大马牙的分子鉴定,建立了一种有效的田间纯化技术手段。吴文如^[27]等采用巢式 PCR-直接测序法分析人参中参与皂苷合成的关键酶,发现不同品种与产地人参的 DS 基因特异位点的 SNP 为人参及其相关药材的质量评价提供了遗

传依据。

1.4 其他

采用低 cot 值探针建立 DNA 指纹图谱鉴定人参和西洋参^[28,29]。崔光红^[30]应用多重等位基因特异性引物 PCR 在同一 PCR 反应中同时检测人参、西洋参各自的 SNP 位点。达到准确鉴别人参、西洋参的目的。宋沁馨等^[31]应用 SNP 测定结合芯片电泳法快速鉴别人参和西洋参。蒋超^[32]等通过分析人参属 ITS, 18S 和 matK 序列, 寻找特异性 SNP 位点设计引物, 建立多重位点特异性 PCR 法, 并对不同来源的人参、三七、西洋参样品进行扩增, 根据特异性条带大小进行鉴别。

2 电泳技术

电泳技术是一种分离和鉴别混合物中带电物质的技术, 带电颗粒在电场作用下向着与其电性相反的电极移动, 称为电泳(electrophoresis, EP)。现在已发展了 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳、等电聚焦电泳、双向电泳和印记转移电泳, 毛细管电泳等技术^[33]。毛细管电泳是近几年发展起来的一种重要分离技术, 它在多肽、蛋白、核酸、手性化合物等生物活性物质的分离中显示出广阔的前景。高效毛细管电泳能减少电泳扩散, 速度快, 灵敏度高, 分辨率强, 在中药中的应用集中在生物碱和黄酮及其苷类化合物^[34]。闫正^[35]采用毛细管区带电泳法对人参进行了指纹图谱研究, 获得了 36 个峰, 并对人参的产地、种类进行区分。侯连兵等^[36]采用高效毛细管电泳法对三七及其混淆品蛋白多肽进行分析, 结果是三七及其混淆品蛋白多肽高效毛细管电泳谱图有明显的差异。

3 总结

近年来, 从构建 BAC 文库^[37]对人参基因组进行探索, 到二代高通量测序技术出现, 现代生物技术的发展大大提高了测序的效率, 降低了实验成本, 为人参属药用植物基因组的研究提供了良好的平台, 加快获得人参属药用植物全基因组信息的进程。目前, 以基因工程方法为主要技术手段的合成生物学^[38,39]为实现人参皂苷的高效异源合成提供了一种可行的思路, 且已成功应用于青蒿素^[40-43]、紫杉醇^[44,45]等重要天然产物的人工合成应用中。所以, 生物技术作为高新技术产业具有非常长远的发展前景, 并且能够为我们的生活带来更多的改变。生物技术的发展正在不断的促进经济的发展、科技的进步。把握好发展的方向, 实现对生物技术的广泛应用, 不断的推动人类文明的进步和发展。

参 考 文 献

- [1] 国家药典委员会.《中国药典》(第 1 部)[M].北京: 北京化学工业出版社, 2015.
- [2] 陈士林, 郭宝林, 张贵军, 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).
- [3] 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(1).
- [4] 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): 748.
- [5] 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 PLoS ONE, 2010, 5.
- [6] Zuo Y, Chen Z, Kondo K. et al. DNA Barcoding of Panax species [J]. Planta Med. 2011, 77:182.
- [7] 罗志勇, 周钢, 陈湘晖, 等. 高质量植物基因组 DNA 的分离[J]. 湖南医科大学学报, 2001, 26(2): 178~180.
- [8] 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).
- [9] 孙涛, 滕少娜, 孔德英, 等. DNA 条形码技术应用用于人参鉴定[J]. 2013, 33(4): 143~148.
- [10] 马小军, 汪小全, 肖培根, 等. 人参农家类型的 AFLP 指纹研究[J]. 中国中药杂志, 2000, 25(12): 707.
- [11] Ngan F, Shaw P, But P, et al. Molecular authentication of Panax species [J]. Phytochemistry Oxford, 1999, 50(5): 787~791.
- [12] 罗志勇, 周钢, 周肆清, 等. AFLP 法构建人参、西洋参基因 DNA 指纹图谱[J]. 药学学报, 2000, 35(8): 626~629.
- [13] 王雪松, 周雨晴, 李丹, 等. 基于 PCR-RFLP 的西洋参和人参指纹特征鉴定[J]. 2018, 19(1): 49~52.
- [14] Diao Y, Lin X M, Liao C L, et al. Authentication of Panax ginseng from its adulterants by PCR-RFLP and ARMS[J]. Planta Med, 2009, 75(5): 557~560.
- [15] 华愉教, 耿超, 王胜男, 等. 基于 cDNA-AFLP 技术分析不同种源和地域太子参基因差异表达[J]. 天然产物研究与开发, 2016, 28(2): 188~194.
- [16] Fushimi H, Komatsu K, Isobe M, et al. Application of PCR-RFLP and MASA analysis on 18S ribosomal RNA gene sequence for the identification of three ginseng drugs [J]. J. Biopharm Bull, 1997, 4(20):

765.

[17] 杨维泽,金航,崔秀明,等.三种人参属植物的EST-SSR 信息分析及其在三七中的应用[J].基因组学与应用生物学,2011,30(1):62.

[18] Shaw P C, But P P. Authentication of Panax species and their adulterants by random -primed polymerase chain reaction.[J].Planta Med,1995. 61 (5):466.

[19] Kwon H K, Ahn C H, Choi Y E. Molecular authentication of Panax notoginseng by specific AFLP - derived SCAR marker [J].J Med Plant Res, 2009, 3 (11): 957.

[20] 陈子易,吕旭楠,程舟,等.微卫星标记在人参和西洋参鉴别中的应用[J].复旦学报,2011,50(2):185.

[21] 丁建弥,万树文,梅其春,等.用随机扩增多态DNA(RAPD)技术鉴定野山人参[J].中成药,2001,23(1):3~5.

[22] Ozeki Y, Wake H, Yoshimatsu K, et al. A rapid method for genomic DNA preparation from dried materials of genus panax for PCR analysis[J]. Natrual Med, 1996,50:24.

[23] 王戎博,田惠丽,王洪涛,等.开发 indel 分子标记对人参和西洋参的鉴别研究 [J]. 中国中药杂志, 2018,43(7):1441~1445.

[24] 刘丽,肖炳焱,聂平,等.采用 RAPD 技术对人参属的亲缘关系和鉴别的分析 [J]. 药物分析杂志, 2016, 36(2): 255~260.

[25] 赵皓.生物技术及近红外光谱技术在中药鉴别及分析中的应用观察[J].中国实用医药,2015,10(24):291~292.

[26] 王景,张甜甜,李萌,等.利用 SNP 分子标记对人参品种大马牙的特异鉴定研究[J].中药材,2015, 38(11):2298~2300.

[27] 吴文如,刘良,黄宝明,等.采用巢式 PCR-直接测序法分析人参达玛烯二醇合成酶基因单核苷酸多态性[J].中草药,2015,46(14):2127~2133.

[28] Ho I S, Leung F C. Isolation and characterization of repetitive DNA sequences from ginseng [J]. Mol Genet Genomics, 2002, 266: 951.

[29] Leung F C, Ho I S. Development of low -cot DNA probe for fingerprinting Asia and North American ginseng [C]. Hamilton: Online Proceedings of the 5th Internet World Congress on Biomedical Sciences, 1998.

[30] 崔光红,唐晓晶,黄璐琦.利用多重等位基因特异 PCR 鉴别人参、西洋参[J].中国中药杂志,2006,

[31] 宋沁馨,张芳,张心悦,周国华. SNP 测定结合芯片电泳法快速鉴别人参和西洋参[J]. 药物分析杂志, 2009,29(1).

[32] 蒋超,罗宇琴,袁媛,等.多重位点特异性 PCR 鉴别人参、三七、西洋参掺杂[J].中国中药杂志,2017,42(7):1319~1323.

[33] 曹秀明,尚明,郑蔚红.中药鉴定中电泳技术的应用[J].黑龙江医药.2005,18(6).

[34] 唐双焱,傅文. 生物新技术的发展推动中药鉴定的变革[J].华西药学杂志,2000,15(2):115~116.

[35] 闫正,王春云,苑若瑶,等.长白山人参的毛细管电泳指纹图谱[J]. 河北大学学报.2009,29(1).

[36] 侯连兵,陈振德,陈志良,等.三七及其混淆品蛋白多肽高效毛细管电泳法鉴别 [J]. 中草药, 2000,30(11).

[37] Hong C P, Lee S J, Park J Y, et al. Construction of a BAC library of Korean ginseng and initial analysis of BAC -end sequences [J]. Mol Gen Genomics, 2004,271: 709.

[38] Keasling J D. Synthetic biology for synthetic chemistry[J]. Acs Chemical Biology, 2008,3(1): 64.

[39] Benner S A, Sismour A M. Synthetic biology [J]. Nat Rev Genet. 2005.6: 533.

[40] Martin V J J, Pitera D J, Withers S T, et al. Engineering a mevalonate pathway in Escherichia coli for production of terpenoids [J]. Nature Biotechnol, 2003,21(7): 796.

[41] Chang M C, Eachus R A, Trieu W, et al. Engineering Escherichia coli for production of functionalized terpenoids using plant P [J]. Nat Chem Biol, 2007,3(5): 274.

[42] Tsuruta H, Paddon C J, Eng D, et al. High-level production of amorpha-4,11-diene, a precursor of the antimalarial agent artemisinin, in Escherichia coli [J]. PloS One, 2009,4(2).

[43] Ro D K, Paradise E M, Ouellet M, et al. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast [J]. Nature, 2006,440: 940.

[44] Ajikumar P K, Xiao W H, Tyo K E, et al. Isoprenoid pathway optimization for taxol precursor overproduction in Escherichia coli [J]. Science, 2010,330(6000): 70.

[45] Liu T, Khosla C. A balancing act for taxol precursor pathway in E. coli [J]. Science, 2010,330(6000): 44.

Copyright © 2019 GINSENG RESEARCH Publishing House. All rights reserved. 本期责任编辑:孙清