



· 专论 ·

## 动物药材分子鉴定研究策略

黄璐琦\*, 唐仕欢, 李军德, 赵静雪

(中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700)

**[摘要]** 作者对动物药材分子鉴定研究的现状及问题进行了总结和分析,在此基础上,提出全国范围内相关单位联合攻关,扩大研究品种,加快动物药材分子鉴定试剂盒的研制和推广,全面启动中国动物药材 DNA 条形码研究计划,建立动物药材分子鉴定标准数据库等研究策略。

**[关键词]** 动物药材;分子鉴定;DNA 条形码

动物药材是祖国医药重要组成部分,临床上被广泛用于治疗疑难杂证、急重病证等。由于动物药材特别是多来源品种较为混乱,如虻虫、斑蝥等,而且大部分为贵重紧缺药材,通常多以粉末、中成药等形式入药,给动物药材的准确鉴定带来了极大的困难。过去传统的中药鉴定技术,主要是经验性的性状鉴别,这些方法虽然简便、快速,但对多来源药材、破碎药材、粉末药材以及中成药的鉴定有一定的局限性。随着现代科学技术的发展,显微鉴定、红外光谱、紫外吸收光谱、薄层色谱、凝胶电泳等方法也在动物药材的鉴定中起到了重要作用<sup>[1-9]</sup>。近年来,分子生物学技术和方法不断更新,其理论和实验技术不断渗透到中药鉴定领域,中药鉴定涌现了一批中药材 DNA 分子鉴定技术,如 RFLP(restriction fragment length polymorphism, 限制性片段长度多态性), RAPD(random amplified polymorphic DNA, 随机扩增多态性 DNA 标记)以及基因芯片技术等。DNA 分子鉴定技术不仅能对有形的动物药材整体及破碎部分器官组织进行准确的鉴定,而且还可以对以动物粉末、体液、分泌物和排泄物入药的生药及制剂进行有效的真伪鉴定、纯度检查与质量评价,为动物药材的鉴定带来了蓬勃生机,呈现出良好的发展前景。

### 1 动物药材分子鉴定研究现状

**1.1 基于线粒体 12S rRNA 基因序列的鉴别研究** 由于线粒体 12S rRNA 基因的进化速率较快,不同物种间序列差异大,有利于设计针对目标物种的高特异性引物,加上扩增该基因的稳定性和可重复性好,可以用来作为生物物种种属的鉴定,并在动物药材的分子鉴定中得到应用。利用该基因序列对蛇类药材进行鉴定的报道较多,主要集中在乌梢蛇、金钱白花蛇、蕲蛇及其混淆品的鉴定,如根据乌梢蛇及 10 种常

见混淆品线粒体 12S rRNA 基因序列,设计一对专用于乌梢蛇的鉴别引物,从而建立一种简便、准确的乌梢蛇药材分子标记鉴别方法。结果表明,所设计的鉴别引物对正品乌梢蛇有高度的特异性<sup>[10]</sup>。运用分子标记技术分别从药材蛇胆的胆衣和胆汁、原动物棕黑锦蛇的肌肉和胆汁中提取 DNA,经 PCR 扩增得到约 400 bp 的 12S rRNA 基因片段,并对该基因片段进行测序研究。结果表明,DNA 分子标记技术可用于中药材蛇胆和胆汁的鉴定,提示该技术也可用于其他动物分泌物类型药材的鉴别<sup>[11]</sup>。有学者从乌龟 *Chinemys reevesii* 和其他 20 种产地为中国或东南亚国家的龟类组织材料中提取 DNA,扩增约 110 bp 的线粒体 12S rRNA 基因片段并进行序列分析,构建了 21 种龟类的 12S rRNA 基因片段序列数据库。序列比较的结果表明乌龟与其他 20 种龟类的这段序列均有差别,序列差异在 3.7% ~ 15.7%<sup>[12]</sup>。基于此,设计 1 对专用于鉴定中药材龟甲原动物乌龟的鉴别引物,对龟甲药材进行了分子鉴定<sup>[13]</sup>。从 5 种海马药材中提取 DNA,用 PCR 技术扩增约 450 bp 的 12S rRNA 基因片段和约 490 bp 的细胞色素 b 基因片段。结果表明,用 DNA 序列分析方法得到的分子遗传标记可以鉴别所有 5 种海马<sup>[14]</sup>。

**1.2 基于线粒体 Cyt b 基因序列的鉴别研究** Cyt b 基因是动物线粒体上一个编码蛋白质的基因,有一定的保守性,根据蛇类药材 Cyt b 基因片段序列的分析,表明这种在种内个体间的序列差异很小,而种间的序列差异却较大的 DNA 片段,正是物种鉴别的理想标记。因此,Cyt b 基因片段的 DNA 序列是鉴别蛇类药材原动物种类的一种良好分子标记<sup>[15]</sup>。设计金钱白花蛇 PCR 鉴别的一对高度特异性引物,可以对金钱白花蛇及其伪品的 Cyt b 基因片段序列分析和 PCR 鉴别研究。结果表明,该对引物在对金钱白花蛇的 PCR 鉴别中,可以 100% 检出金钱白花蛇,并能在混合的药材粉末中检测出被检样品中是否含有金钱白花蛇组分<sup>[16-17]</sup>。以同样的原理,利用 Cyt b 基因对蕲蛇药材及其市场收集样品进行了序列测定和分析。结果表明,Cyt b 基因序列是一种鉴别蕲

**[稿件编号]** 20100629003

**[基金项目]** 《中国药典》2010 版一部标准研究项目(YD-195);中国中医科学院自主选题项目(ZO2085)

**[通信作者]** \* 黄璐琦, Tel: (010)64014411-2956, E-mail: huangluqi@263.net



蛇药材与其混淆品较好的分子遗传标记<sup>[18]</sup>。类似的研究还有鸡内金及其伪品的分子鉴别研究,所设计的引物只扩增家鸡 DNA,而不扩增其他动物 DNA<sup>[19]</sup>。利用 *Cyt b* 基因对鹿类中药材进行分子鉴定研究已见诸多报道。在对鹿类中药材的正品原动物梅花鹿、马鹿及其混伪品原动物的 *Cyt b* 基因全序列分析的基础上,设计一对专用于鉴定正品鹿类药材的位点特异性鉴别引物,建立鹿类中药材鹿茸、鹿鞭、鹿筋、鹿胎的 DNA 分子标记鉴定方法<sup>[20-21]</sup>。建立的位点特异性 PCR 方法,能将正品鹿茸与其他近源种鹿茸药材鉴别开来,具有较高的特异性、重复性,可广泛应用于鹿类药材的鉴别<sup>[22-23]</sup>。

## 2 动物药材分子鉴定研究存在的问题

**2.1 研究品种局限** 近几年,国内动物药材的 DNA 分子鉴定报道较多,但研究的品种比较局限,主要研究的品种集中在蛇类中药材、鹿类中药材、鸡内金、海马、龟甲等少数品种,而对于其他常用的品种研究不多,如中药材虻虫、斑蝥、蝉蜕、土鳖虫、水蛭、地龙、全蝎、蜈蚣等,急需在以后的研究工作中得到加强。

**2.2 参与单位较少** 文献报道显示,从事动物药材分子鉴定的研究机构主要是中国药科大学、沈阳药科大学、南京师范大学、北华大学、中国科学院昆明动物所、安徽大学、北京中医药大学、中国中医科学院中药研究所等少数大中专院校和科研院所,加之从事动物药材鉴定和分类学的研究队伍不断缩减,使得全面而系统地开展动物药材分子鉴定面临巨大的挑战,急需呼吁各具有分子生物学技术的相关单位和从业人员联合研究,扩大规模。

**2.3 数据共享不足** 由于各自研究比较分散,品种局限,在分子鉴定的操作中,没有形成统一和规范的操作标准和规程,如药用动物遗传物质材料采集规范、动物药材 DNA 提取操作规范等,难以形成共享的分子鉴定数据信息系统,从而限制了相应技术和方法的推广应用。因此,急需制定实验技术规范流程,建立中国药用动物分子鉴定共享信息平台。

**2.4 实际应用不够** 有关动物药材的分子鉴定重点在基础研究,虽然在很多的报道中,均提示建立的方法具有简单、准确、快速、灵敏度高、重复性好等特点,但在实际操作中得到推广应用的很少。当然,基础研究到实际应用需要一定的积累,随着蕲蛇、乌梢蛇饮片 PCR 鉴别方法被 2010 年版《中国药典》刊载,分子鉴别动物药材技术与方法,将逐步走向应用,有广阔的发展潜力及应用价值。

## 3 动物药材分子鉴定研究策略

**3.1 研究品种应逐步扩大** 根据 1985—1989 年开展的全国中药资源普查显示,我国中药资源共有 12 772 种,其中药用动物有 414 科、879 属、1 574 种;《中国中药资源志要》(1994 年)刊载药用动物 1 590 种(414 科,879 属);《中国动物药志》(1996 年)刊载动物药 975 种,药用动物 1 546 种;《中华本草》(1999 年)刊载动物药(药用动物)1 047 种;《动物本草》(2001 年)刊载药用动物 1 567 种;目前,由中国中医

科学院中药研究所牵头修订再版的《中国药用动物志》将刊载药用动物约 1 800 种。可以看出,我国动物药材(药用动物)品种丰富,为此,应在进行临床常用的动物药材分子鉴定研究的基础上,逐步完成 2010 年版《中国药典》记载的动物药材品种分子鉴定研究,并从药用动物科属的角度,进一步扩大样品,从而逐步拓宽研究品种和对象,开展全面深入研究。

**3.2 组织形式应联合攻关** 开展动物药材的分子鉴定,最为关键的是获得准确和足够的样品,由于动物药材的获得不同于一般的植物药材,尤其是珍稀濒危的野生动物,其样品的获得更是困难。为开展大规模的动物药材的分子鉴定研究,应以《中国药用动物志》修订再版工作为基础,抓住即将开展的全国中药资源普查的契机,进行全国范围药用动物的采样调查,在药材鉴定和动物分类学鉴定的基础上,采用适宜的分子鉴定技术进行鉴定研究。由于品种较多,分布复杂,采样工作艰苦,仅靠一个单位或一部分科研工作者,难以完成,需要与动物药材相关的各大中专院校、科研机构、药监部门、林业部门等联合攻关,协调进行,从而建立动物药材分子鉴定的技术平台。

**3.3 加快分子鉴定试剂盒的开发与应用** 近几年来,针对某一类药材的鉴定,位点特异性鉴别 PCR 方法应用较为广泛,通过对正品药材及其伪、混品的某些 DNA 片段序列(如 12S rRNA, *Cyt b*)的研究,找出正品药材的特异性位点,从而设计高度特异性的鉴别引物,PCR 反应后,经过电泳检测便可准确鉴别样品的真伪,这种方法简便,可操作性强,容易推广应用。并且,这种方法在反复实验验证后,进一步优化各种条件,可以制成分子鉴定的试剂盒,从而可以在实际操作中推广应用。已经有学者根据对不同产地梅花鹿、马鹿、白唇鹿、水鹿线粒体 DNA 进行 PCR 扩增和序列测定,并与常见伪充药材来源动物线粒体 DNA 同位置序列比较,找到该 4 个鹿种的特征片段,建立中药材鹿鞭的分子分类学鉴定试剂盒。结果表明,该引物与相关试剂组成试剂盒后,可用于中药材鹿鞭与常见伪充药材牛鞭、驴鞭等的鉴别<sup>[23]</sup>。因此,动物药材分子鉴定试剂盒的研制,应当大力提倡和推广,逐步将基础研究走向应用研究。

**3.4 全面启动中国动物药材 DNA 条形码研究计划** 与上述分子生物学技术相比,DNA 条形码(DNA barcoding)是利用一段标准 DNA 序列作为标记来实现快速、准确和自动化的物种鉴定,是分类学中辅助物种鉴定的新技术,这种新兴分类学技术引起了越来越多的生物学家关注,成为物种鉴定和分类学研究的新方向和研究热点。目前,中国作为国际生命条形码计划 4 个中心节点(加拿大、美国、欧盟和中国)之一,中国在世界生物 DNA 系统分类及条形码技术中占据相当重要的地位。植物(包括药用植物)DNA 条形码研究已经全面启动,动物条形码研究正在逐步开展,为此,对常用的动物药材也进行了有益尝试,制定了相应的操作规范,包括药



用动物遗传物质材料采集规范、动物药材 DNA 提取操作规范等,下一步将联合国内各有关科研院所、大中专院校,全面启动中国动物药材 DNA 条形码研究计划,按照标准的操作规范,进一步扩大样品数量,完善标本的采集,利用分子生物学技术获得动物药材标准序列,构建动物药材 DNA 条形码分子鉴定的标准平台。

**3.5 建立中国动物药材分子鉴定标准数据库** 对《中国药用动物志》(修订版) 收录药用动物种质资源(包括活体、标本、精子等)进行标准化整理、整合和数字化表达,建立“中国药用动物种质资源共享平台”,在此基础上,联合全国有关科研院所,制定、完善药用动物种质资源的描述标准、技术规程,逐步建立“中国动物药材分子鉴定数据库系统”,包括“中国动物药材 DNA 条形码数据库”、“中国动物药材分子标识数据库”、“中国动物药材分子鉴定基因序列数据库”等,实现信息数据共享,这不仅为动物药材的鉴定提供依据,而且为药用动物的分类及其遗传多样性研究奠定基础。

#### [参考文献]

[1] 刘宝玲,岩崎裕二,风见务,等. 常用虫类药材的显微鉴定[J]. 中国中药杂志,2002,27(10):729.

[2] 周友华,王振忠,黄振宇,等. 羚羊角及其骨角塞的紫外光谱鉴别[J]. 基层中药杂志,1996,10(1):15.

[3] 画红顺. 羚羊角与水牛角的薄层色谱法比较[J]. 江西中医学院学报,1998,10(2):84.

[4] 廖汉成,王实强,杨瑛,等. 蜈蚣全蝎蛤蚧3种动物中药超微饮片的薄层鉴别[J]. 湖南中医杂志,2003,19(6):54.

[5] 石俊英,李辉,宋广运,等. 14种皮类中药的电泳鉴别[J]. 中国中药杂志,1992,17(2):74.

[6] 孙晓荣,吴爱英,邹德录,等. 4种鞭类中药蛋白电泳鉴别[J]. 中国中药杂志,1997,22(5):271.

[7] 李仁茂,钟炳辉,林海强,等. 鹿筋的电泳鉴别研究[J]. 湛江师范学院学报:自然科学版,1998,19(2):77.

[8] 曹秀明,尚明,郑蔚虹. 中药鉴定中电泳技术的应用[J]. 黑

龙江医药,2005,18(6):428.

[9] 赵华英,许欣荣,陈永林,等. 羚羊角及其伪品的蛋白电泳鉴别[J]. 中国中药杂志,1994,19(9):524.

[10] 唐晓晶,冯成强,黄璐琦,等. 高特异性 PCR 方法鉴别乌梢蛇及其混淆品[J]. 中国药理学杂志,2007,42(5):333.

[11] 刘向华,王义权,刘忠权,等. 中药材蛇胆的 DNA 分子标记鉴定研究[J]. 药学学报,2001,36(3):229.

[12] 吴平,周开亚,徐璐珊,等. 中药材龟甲的分子鉴定研究[J]. 药学学报,1998,33(4):304.

[13] 刘中权,王义权,周开亚,等. 中药材龟甲及原动物的高特异性 PCR 鉴定研究[J]. 药学学报,1999,34(12):941.

[14] 吴平,周开亚,张朝晖,等. 海马类药材的分子遗传标记鉴定研究[J]. 药学学报,1998,33(3):226.

[15] 王义权,周开亚,徐璐珊,等. 中药材乌梢蛇及其混淆品的 DNA 序列分析鉴别[J]. 药学学报,1999,34(1):67.

[16] 王义权,周开亚,徐璐珊,等. 金钱白花蛇及其伪品的 Cyt b 基因片段序列分析和 PCR 鉴别研究[J]. 药学学报,1998,33(12):941.

[17] 冯成强,唐晓晶,黄璐琦,等. 金钱白花蛇及其混淆品高特异性 PCR 的鉴别[J]. 中国中药杂志,2006,31(13):1050.

[18] 宋文成,宋社吾,刘道芳,等. 蕲蛇药材及其市售混淆品的 Cyt b 基因序列与分析[J]. 中草药,2006,37(12):1862.

[19] 曲萌,崔继春,董志恒,等. 鸡内金的分子鉴定研究[J]. 中国中药杂志,2009,34(24):3192.

[20] 刘向华,王义权,周开亚,等. 鹿类中药材的位点特异性 PCR 鉴定研究[J]. 药学学报,2001,36(8):631.

[21] 傅文,唐双焱,陈永久,等. 鹿属动物线粒体 DNA 序列测定的研究[J]. 中国药理学杂志,2000,35(12):803.

[22] 王学勇,刘春生,张蓉,等. 位点特异性 PCR 方法的建立及对近源种鹿茸药材的鉴别研究[J]. 中国中药杂志,2009,34(23):3013.

[23] 唐双焱,傅文,陈永久,等. 中药材鹿鞭的分子鉴定研究[J]. 中国中药杂志,2002,27(8):573.

## Research strategy on molecular identification of animal medical material

HUANG Luqi\*, TANG Shihuan, LI Junde, ZHAO Jingxue

(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

**[Abstract]** This paper summarized and analyzed the status quo and problems about molecular identification of animal medical material, based on the facts, we proposed some research strategies, including uniting to tackle key problems, expanding the research species, accelerating manufacture and generalization of molecular identification kit, priming the research project of DNA barcoding, and establishing standard database on animal medical material.

**[Key words]** animal medical material; molecular identification; DNA barcoding

doi:10.4268/cjcm20110301

[责任编辑 吕冬梅]