

“十二五”国家重点图书出版规划项目

MOLECULAR IDENTIFICATION
OF TRADITIONAL CHINESE MEDICINE (TCM)
A LABORATORY MANUAL



主编 黄璐琦 | 副主编 袁 媛

中药分子鉴定 操作指南



上海科学技术出版社
SHANGHAI SCIENTIFIC & TECHNICAL PUBLISHERS

“十二五”国家重点图书出版规划项目

MOLECULAR IDENTIFICATION
OF TRADITIONAL CHINESE MEDICINE (TCM)
A LABORATORY MANUAL

主编 黄璐琦 | 副主编 袁媛

中药分子鉴定 操作指南

上海科学技术出版社
SHANGHAI SCIENTIFIC & TECHNICAL PUBLISHERS

图书在版编目(CIP)数据

中药分子鉴定操作指南 / 黄璐琦主编. —上海:
上海科学技术出版社, 2014. 4
ISBN 978 - 7 - 5478 - 2133 - 6

I. ①中… II. ①黄… III. ①中药鉴定学—指南
IV. ①R282.5 - 62

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2014)第 027041 号

中药分子鉴定操作指南

主编 黄璐琦

上海世纪出版股份有限公司 出版
上海科学技术出版社

(上海钦州南路 71 号 邮政编码 200235)

上海世纪出版股份有限公司发行中心发行
200001 上海福建中路 193 号 www. ewen. cc
苏州望电印刷有限公司印刷

开本 889×1194 1/32 印张: 7.5

字数 150 千字

2014 年 4 月第 1 版 2014 年 4 月第 1 次印刷

ISBN 978 - 7 - 5478 - 2133 - 6/R · 697

定价: 28.00 元

本书如有缺页、错装或损坏等严重质量问题,
请向工厂联系调换

内容提要

本书主要介绍了分子生药学重要研究领域——中药分子鉴定的理论、技术及研究方法。全书分为三篇：第一篇系统论述了中药分子鉴定产生的背景、优势、应用范围以及与其他中药鉴定方法的关系等内容；第二篇全面介绍了目前常用的中药分子鉴定技术，着重讨论每种方法的应用及其应注意的问题，重点介绍了基于特异性 PCR 技术的药材鉴别方法的操作流程；第三篇主要介绍了中药分子鉴定前沿的研究进展和参考范例。

本书在从理论、技术、实际应用的角度全面介绍中药分子鉴定这一研究领域的同时，提供了具有可操作性的实验指南。本书不仅可以作为医药院校生药专业、中医院校中药专业的本科生、研究生及教师的实验教学用书，也可作为相关科研人员的参考书。

编委会

主 编

黄璐琦 (中国中医科学院中药资源中心)

副主编

袁 媛 (中国中医科学院中药资源中心)

编 委

(按姓氏笔画排序)

王学勇 (北京中医药大学中药学院)

王保民 (中国农业大学农学与生物技术学院)

刘春生 (北京中医药大学中药学院)

许 亮 (辽宁中医药大学药学院)

李旻辉 (内蒙古科技大学包头医学院)

陈随清 (河南中医学院药学院)

国锦琳 (成都中医药大学药学院)

周 涛 (贵阳中医学院科研试验中心)

南铁贵 (中国中医科学院中药资源中心)

秦民坚 (中国药科大学药学院)

晁 志 (南方医科大学中医药学院)

崔光红 (中国中医科学院中药资源中心)

蒋 超 (中国中医科学院中药资源中心)

韩琳娜 (山东中医药大学药学院)

谢冬梅 (安徽中医药大学药学院)

FOREWORD | 前言

中药鉴定的核心是进行品种真伪和质量优劣的评价,其关系到用药安全以及中药产业的健康发展。随着中药产业的蓬勃发展,业内对中药鉴定提出了新的要求。传统鉴别主要是运用经典形态分类来研究中药材的来源,这种方法是建立在个体性状描述和宏观观测水平上,得到的结论往往不完善。早在 1995 年,黄璐琦在《展望分子生物学技术在生药学中的应用》一文中率先提出了利用分子生物学技术,依据遗传物质 DNA 在不同生物个体的差异鉴别生物物种,为鉴别中药材品种提供依据;并指出 PCR 技术由于其可将中药中痕量 DNA 级数扩增,且产物转移性强,有利于建立高速、高效、优质、便于自动化的中药鉴定方法。

在随后的近 20 年间,以 PCR 技术为基础的中药分子鉴定逐渐发展起来,先后涌现出利用 RAPD、AFLP、PCR-RFLP、ISSR、APAPD、DNA 条形码等

手段进行中药真伪鉴别的各种方法。其中高特异性 PCR 方法用于乌梢蛇、蕲蛇鉴别,作为分子鉴定技术首次被《中华人民共和国药典》2010 年版收载,表明其在中药鉴定中具有极高的应用价值。中药分子鉴定已成为分子生药学这一新兴学科的重要研究领域。

从理论层面上来看,中药分子鉴定先后提出了中药系统鉴定法、二维分子标记等理论。从技术层面上来看,中药分子鉴定已从单一技术向多种技术组合方向发展。中药分子鉴定已经历了两个重要发展阶段:1995~2004 年,RAPD 技术被应用于细辛类药材、白芷、天花粉、栝楼、苍术、地黄、杜仲、肉苁蓉、人参的鉴定研究中;2005~2012 年,进入了技术快速发展时期,包括蛋白免疫检测、毛细管电泳、高特异性 PCR 等技术被用于中药的分子鉴定。但建立和完善能够满足准确、快速、高通量、低成本中药鉴定要求的分子鉴定体系,寻找适合野生与栽培品、生长年限、道地药材鉴定的标记仍是未来研究的重点和难点。从药材种类上来看,动物药分子鉴别研究平台日趋成熟,目前已完成包括乌梢蛇、蕲蛇、金钱白花蛇、蛇胆、龟甲、羚羊角、海马、鸡内金、鹿茸、鹿鞭等药材及原动物分子鉴定方法的建立。与动物药相比,植物药由于其原植物遗传物质的复杂性,导致仅属于不同种且种在进化树上互为单系的药材及其混淆品可建立分子鉴别方法。

在已出现的研究方法中,特异性 PCR 技术被认为是中药真伪鉴定的有力工具,酶联免疫技术有望在中药优劣鉴定方向发挥重要的作用。建立中药分子鉴别

方法时需要遵循两个主要原则：① 科学原则：分子鉴定作为中药鉴定的一种技术手段，是传统性状鉴别的重要、有力补充。引入风险-获益评估理论对中药材进行相应的评价，选择易混淆、传统鉴定方法难以解决的、产业急需的中药材，建立分子鉴定方法。② 个案原则：中药材种类繁多、来源复杂，药材间存在较大的差异，需要具体情况具体分析，即对每一种药材采用特异性引物、探针等进行鉴别，以提高鉴别的准确度。

2012年，为了推动中药分子鉴别技术的发展，中国中医科学院中药资源中心在内蒙古包头市开展了第一届分子生药学暑期班活动，邀请国内从事该领域的同行共同对来自中医药院校、科研机构的青年科技人员和在校研究生进行了中药分子鉴定相关理论和实验技能培训；2013年，在贵州省贵阳市开展了第二届分子生药学暑期班活动，受到了广泛的好评。目前，已有来自全国26个省、市、地区的34家单位的老师、学生参与了暑期班活动。

与会师生们希望能够将暑期班“中药分子鉴别实验操作”中的授课内容编写成一本实用性强、易入门、可操作的讲义。根据大家的意见，本书对中药分子鉴定的理论和技术进行了梳理，并在长期实践经验积累的基础上，依据特异性PCR中药真伪鉴别方法编写了中药分子鉴别基本操作规程，包括样品的采(收)集与保存(实验一)、数据获取(实验二)、鉴别位点的筛选(实验三)、引物设计(实验四)、植物类药材及成药生粉原料DNA提取方法(实验五)、动物类药材DNA提取

方法(实验六)、中药材 DNA 快速提取方法(实验七)、特异性 PCR(实验八)、电泳技术(实验九)、成药(口服液、糖浆等)水提原料 DNA 提取方法(实验十)。其他相关实验可参考《分子生药学》第一版和第二版。此外,本书还介绍了中药分子鉴别方面研究和应用的实例,希冀对从事中药分子鉴定以及分子生药学研究的科研人员和在校师生提供参考。

编委会

2014 年 2 月

CONTENTS 目 录

第一篇 理论篇

一、中药分子鉴定概述	3
(一) 常用的中药鉴定方法	3
(二) 中药产业对中药鉴定的新要求	4
(三) 中药分子鉴定的优势与适用性	6
二、中药系统鉴定法	8
(一) 中药系统鉴定法的提出	8
(二) 中药系统鉴定法的原理	9
(三) 中药系统鉴定法的优势与应用范围	10
(四) 中药系统鉴定的操作	12
(五) 结语	13
三、中药材二维分子标记法	15
(一) 二维分子标记方法	15

(二) 二维分子标记的原理与方法	16
(三) 二维分子标记的优势与应用	17
(四) 结语	19

第二篇 技术篇

一、概述	23
(一) DNA 提取技术	23
(二) SCAR 标记技术	23
(三) 特异性 PCR 技术	25
(四) SSR 分型技术	27
(五) PCR-RFLP 技术	28
(六) 环介导等温扩增技术	29
(七) 序列分析技术	31
(八) 免疫检测技术	32
(九) 基因芯片技术	33
二、基于特异性 PCR 技术的药材真伪鉴别方法	39
实验一 样品的采(收)集与保存	39
实验二 数据获取	43
实验三 鉴别位点的筛选	45
实验四 引物设计	47
实验五 植物类药材及成药生粉原料 DNA 提取方法	49
实验六 动物类药材 DNA 提取方法	51
实验七 中药材 DNA 快速提取方法	53
实验八 特异性 PCR	54

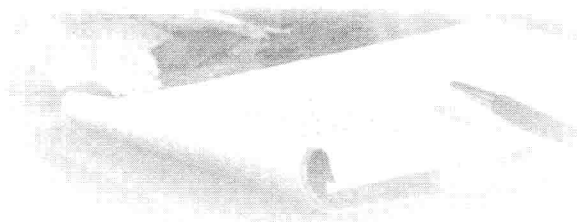
实验九 电泳技术	56
实验十 成药(口服液、糖浆等)水提原料 DNA 提取 方法	58

第三篇 实践篇

一、含淀粉及多糖类中药材 DNA 的提取方法研究	63
二、鹿骨类药材 DNA 提取方法研究	70
三、使用碱裂解法快速提取药材 DNA 方法的研究	80
四、断肠草与金银花类药材水提液特异性 PCR 鉴定方法 研究	102
五、头花蓼 RAPD 向 SCAR 分子标记转化的研究	110
六、获取人参、西洋参特定序列位点(STS)标记的新方法	119
七、金钱白花蛇快速 PCR 鉴别方法的建立	125
八、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	135
九、基于位点特异性 PCR 的黄芪与红芪鉴别方法研究	145
十、基于双向位点特异性 PCR 的金银花真伪鉴别方法 研究	155
十一、山茱萸种子形态和蛋白电泳分析	167
十二、冬虫夏草可溶性蛋白质多样性与产地关联度初探	173
十三、不同种源引种紫锥菊的过氧化物酶同工酶分析	180
十四、蛋白免疫检测技术在天花粉真伪鉴别中的初步 研究	188
十五、中药致肾毒性成分马兜铃酸 A 单抗制备及酶联免疫	

分析方法的建立	197
十六、牛蒡子及其伪品的 ITS 序列分子鉴定研究	206
十七、太子参及其混伪品的 rDNA ITS 区序列分析及 鉴别	213
十八、基于 ITS 区多态性研制用于柴胡属植物来源生药鉴定 的寡核苷酸 DNA 芯片	218

第一篇 理论篇



一、中药分子鉴定概述

中药(Chinese medicine)是在中医药学理论指导下使用记载于中医药典籍,并能以中医药术语表述其功效和使用规律,用于预防、诊断和治疗疾病的药物,包括中药材(Chinese crude drugs)、中药饮片(decoction pieces of Chinese material medica)和中成药(Chinese patent medicine)。

目前,《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》)和《中华人民共和国卫生部药品部颁标准》(简称《部颁标准》)等为中药质量提供了国家标准。中药鉴定就是按照国家标准评价其是否符合要求,并随着科学技术的进步,不断探索新的方法和技术,以实现更快、更准确地对其进行评价,其核心是进行品种真伪和质量优劣的评价。

(一) 常用的中药鉴定方法

1. 感官鉴定法

中药的性状是生物遗传变异和环境饰变的共同反映,是中药鉴定的重要表征。感官鉴定是指通过人体感官,利用中药品种间性状变化情况鉴定中药,包括基源鉴定和性状鉴定。其中,基源鉴定适用于具有花、果实、叶等主要特征信息的中药,是利用植物分类学或动物分类学手段进行鉴定的方法;性状鉴定则是利用中药的大小、形状、颜色、气味、质地、断面等特征进行鉴别的方法。感官鉴定方法具有快速、高效的特点,但存在依赖经验、有时分辨率较低的缺点,对多基源药材、品种混乱药材的鉴定较为困难。

2. 显微鉴定法

中药的显微特征是中药鉴定的重要表征。显微鉴定是利用显微技术对中药进行显微分析以确定其品种和质量的一种鉴定方法,主要包括组织鉴定和粉末鉴定。该方法适宜于需要对感官鉴定结果进行进一步确认时使用,是根据横切面的保护组织、机械组织、输导组织、分泌组织等的种类或有无,或者粉末中石细胞、纤维、木栓组织、导管等的有无及特征对中药进行鉴定。该方法存在分辨率较低的缺点,对多基源药材、品种混乱药材的鉴定较为困难,但作为一种在性状鉴定基础上进行进一步确认的方法具有重要应用意义。

3. 理化鉴定法

理化鉴定法是目前发展最为迅速的一种鉴定方法,是利用某些物理、化学或仪器分析方法,鉴定中药的真实性、纯度和品质优劣程度的一种鉴定方法。由于中药有效性的物质基础是其中的有效成分,因此理化鉴定的优势是其反映了中药的真伪,即反映了质量。但就真伪鉴定来说,理化鉴定的劣势也是对同属混伪品分辨率较低,需要标准物质,在不同药用部位化学成分相似的情况下不能区分药用部分,需要特殊分析仪器等;但作为在性状鉴定基础上进一步确认时具有重要应用意义。

经过长期发展,目前常用的中药鉴定方法已经逐步趋于成熟,但存在的不足逐渐成为制约中药产业发展的瓶颈,因此急需发展新的鉴定方法以适应中药产业对中药鉴定的要求。

(二) 中药产业对中药鉴定的新要求

中药鉴定作为保证中药质量的重要环节,在整个中药产业中起着重要作用,但同时也面临着新的问题。