

普乐安片DNA条形码分子鉴定研究

魏妙洁^{1,3}, 刘金欣², 赵 晴², 徐晓兰⁴, 任 萍⁵, 李明玥², 石林春^{1,2*}, 孙 伟^{1*}

- (1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 2. 中国医学科学院、北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193;
3. 中央民族大学药学院, 北京 100081; 4. 福建农林大学动物科学学院(蜂学学院), 福建 福州 350002;
5. 中国农业科学院农业资源与农业区划研究所, 北京 100081)

摘要: 建立基于DNA条形码技术的普乐安片处方成分鉴定方法。共收集8个厂家的16份普乐安片样品, 分别采用植物和动物基因组DNA提取试剂盒提取样品DNA, 所获DNA的ITS2序列扩增成功率均为100%, 细胞色素C氧化酶亚基I(COI)序列扩增成功率分别为43.75%和56.25%。对于ITS2序列, 12份样品可获得高质量测序峰图, 鉴定结果为油菜 *Brassica campestris*, 4份样品存在较严重套峰, 经克隆测序鉴定为油菜和黑芥 *B. nigra*。对于COI序列通用引物获得的9份PCR产物, 其中2份样品可直接进行PCR产物测序, 鉴定结果为蚜虫类, 7份样品经克隆测序获得82条序列, 其中5份样品可检测到意大利蜜蜂 *Apis mellifera*, 7份样品均可检测到病原菌或病虫害。为解决COI通用引物因外源污染导致的蜜蜂源检测失败问题, 新设计2对蜜蜂属 *Apis* 的COI引物, 扩增效率均为43.75%, 7份PCR产物直接测序的鉴定结果均为意大利蜜蜂 *A. mellifera*。9份未检测到蜜蜂源的普乐安片来自同一厂家生产的3个不同批次, 且每个批次含3份样品, 推测原料花粉非蜜蜂采集所得。本研究基于ITS2和COI序列建立了普乐安片处方成分的鉴定方法, 将为普乐安片的质量控制和市场监管提供科学依据和技术保障。

关键词: 普乐安片; 油菜花粉; ITS2; COI; 鉴定

中图分类号: R931 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2020)06-1327-07

Identification of Pule'an Tablets based on DNA barcoding molecular technology

WEI Miao-jie^{1,3}, LIU Jin-xin², ZHAO Qing², XU Xiao-lan⁴, REN Ping⁵,
LI Ming-yue², SHI Lin-chun^{1,2*}, SUN Wei^{1*}

- (1. Institute of Chinese Materia, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China; 3. School of Pharmacy, Minzu University of China, Beijing 100081, China; 4. College of Animal Science (College of Bee Science), Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 5. Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: This study aimed to establish a method for identification of the prescription components of Pule'an Tablet based on DNA barcoding technology. Sixteen samples have been collected from 8 different companies, and their DNA were purified using Plant and Animal Genomic Kits. The amplification rates of ITS2 were both 100%, and the amplification rates of COI were 43.75% and 56.25% for these samples' DNA purified using plant and animal kits, respectively. For ITS2, 12 samples obtained high-quality sequencing traces and then were identified as

收稿日期: 2019-12-09; 修回日期: 2020-02-20.

基金项目: 北京市自然科学基金(7202136); 国家自然科学基金项目(81703659); 中国博士后科学基金面上项目(2017M610815).

*通讯作者 Tel: 86-10-57833194, E-mail: linchun_shi@163.com;

Tel: 86-10-84017374, E-mail: wsun@icmm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-1005

containing *Brassica campestris*. The other 4 samples showed crucial SNP peaks in the sequencing traces, which were assigned to be *B. campestris* and *B. nigra* on the basis of cloning and sequencing experiments. For the PCR products of 9 samples from *COI* universal primers, two samples were directly sequenced and identified as aphids, and 7 other samples were subjected to cloning and sequencing experiments. Finally, we obtained 82 clone sequences and found that *Apis mellifera* was detected only in 5 of the remaining 7 samples, and pathogens or pests were detected in all these 7 samples. To solve the failure of bee source detection caused by exogenous contaminations based on *COI* universal primers, we designed two new *COI* primer pairs of *Apis* genus. The amplification rates of both primer pairs were 43.75%, and they were identified as *A. mellifera*. A total of 9 bee source-free Pule'an Tablet samples from 3 different batches were produced by the same company, and each batch contained 3 replicates. Thus, we speculated that raw rape pollen materials for these 9 samples was not collected by bees. This study proposes an identification method for the prescription components of Pule'an Tablets based on ITS2 and *COI* sequences, which will provide scientific basis and technical guidance for quality control and market regulation of Pule'an Tablets.

Key words: Pule'an Tablets; rape pollen; ITS2; *COI*; identification

普乐安片为2015版《中国药典》收载品种,具有补肾固本作用,主要用于治疗肾气不固所致的腰膝酸软、排尿不畅、尿后余沥或失禁;慢性前列腺炎及前列腺增生症见上述证候者^[1]。普乐安片为国内前列腺治疗的一线临床用药,收录于《国家基本医疗保险、工伤保险和生育保险药品目录》(甲类)。普乐安片的处方成分为十字花科 Brassicaceae 芸苔属 *Brassica* 油菜 *B. Campestis* 的花粉,经蜜蜂科 Apidae 昆虫中华蜜蜂 *A. cerana* 等工蜂采集所得,在医药、食品保健品以及化妆品等领域有广泛的应用^[2],在我国分布范围广、产量大^[3]。现代研究表明,油菜花粉中含有多种生物活性成分,如蛋白质、氨基酸、维生素、酚酸类物质、胡萝卜素和脂肪酸等^[4],具有抗炎、抗氧化、抗过敏、保护心脏,抑制前列腺增生、抗肿瘤等多种药理作用^[5,6]。2015版《中国药典》收载了普乐安片的显微鉴别法和薄层鉴别法,用于鉴别普乐安片中的油菜花粉药材,未提供花粉药材中蜜蜂源的鉴别方法。

中药材DNA条形码分子鉴定法是利用基因组中一段公认的、相对较短的DNA序列来进行物种鉴定的一种分子生物学技术,是传统形态鉴别方法的有效补充^[7],已纳入中国^[1]、英国^[8]、日本^[9]等国家药典,成功应用于药用动植物^[10,11]、中药材^[12,13]、部分饮片^[14],以及中药材种子种苗^[15,16]和中成药^[17]的鉴别。中药材DNA条形码分子鉴定体系包含以ITS2为核心、*psbA-trnH*为补充序列的植物类药材鉴定和以*COI*为核心、ITS2为辅助序列的动物类药材鉴定,推动了中药鉴定学的发展,被称为中药鉴定学的“文艺复兴”^[18]。当前,中成药DNA条形码分子鉴定研究已成为中药鉴定学领域的新热点,贾静等^[19]基于SMRT测序和DNA条形码技术应用用于中成药益母丸的质量控制,辛天怡等^[20]建立了基于DNA宏条形码和SMRT测序技术的生物监测

方法,并已在市售样品(九味羌活丸)中进行了验证。

本研究收集8个厂家的16份普乐安片样品,尝试基于ITS2序列对普乐安片的植物源成分进行物种鉴定,通过*COI*序列鉴定蜜蜂源,为普乐安片的质量控制提供科学依据,以保障其临床用药安全。

材料与方法

材料 共收集8个厂家的16份普乐安片作为待检样品,其中生产厂家1的9份样品包含3个批次,每个批次包含3个重复,样品信息见表1。油菜样品由中国农业科学院农业资源与农业区划研究所任萍副研究员提供和鉴定,样品号为HS2604~HS2606,ITS2序列登录号为MT062831~MT062833。黑芥的ITS2序列从已发表文献下载,登录号为AF128102^[21]、AF128102^[21]和DQ340645^[22]。意大利蜂样品由福建农林大学蜂学学院徐晓兰博士提供,样品号为HS2601-HS2603,*COI*序列登录号为MT062511~MT062513。

Table 1 The information of 16 Pule'an Tablet samples

| Sample ID | Manufacturer | Batch No. | Price (Yuan) | Specification |
|-----------|--------------|-----------|--------------|------------------|
| CPM001 | Company 1 | 160520 | 17.3 | 0.57g*60 tablets |
| CPM002 | Company 1 | 160520 | 17.3 | 0.57g*60 tablets |
| CPM003 | Company 1 | 160520 | 17.3 | 0.57g*60 tablets |
| CPM004 | Company 1 | 170605 | 17.3 | 0.57g*60 tablets |
| CPM005 | Company 1 | 170605 | 17.3 | 0.57g*60 tablets |
| CPM006 | Company 1 | 170605 | 17.3 | 0.57g*60 tablets |
| CPM007 | Company 1 | 170502 | 17.3 | 0.57g*60 tablets |
| CPM008 | Company 1 | 170502 | 17.3 | 0.57g*60 tablets |
| CPM009 | Company 1 | 170502 | 17.3 | 0.57g*60 tablets |
| CPM010 | Company 2 | ZMA1801 | 7.8 | 0.64g*60 tablets |
| CPM011 | Company 3 | C18047 | 6.0 | 0.55g*60 tablets |
| CPM012 | Company 4 | 190103 | 5.0 | 0.57g*60 tablets |
| CPM013 | Company 5 | 9181016 | 5.8 | 0.57g*60 tablets |
| CPM014 | Company 6 | 180206 | 5.9 | 69 tablets |
| CPM015 | Company 7 | 2180903 | 16.0 | 0.57g*60 tablets |
| CPM016 | Company 8 | 180106 | 6.3 | 0.57g*60 tablets |

DNA 提取及浓度测定 取普乐安片 100 mg, 使用球磨仪 (Retsch MM400, Germany) 研磨 2 min (30 次/秒), 利用植物基因组 DNA 提取试剂盒 (Tiangen Biotech Co., China) 和动物基因组 DNA 提取试剂盒 (Tiangen Biotech Co., China) 进行 DNA 提取, 采用超微量分光光度计 (Thermo NanoDrop 2000, USA) 进行 OD 值及 A_{260}/A_{280} 比值测定。另取一不含样品的空管按照 DNA 提取的方法步骤进行操作, 以排除实验室环境中的外源污染。

PCR 扩增、克隆及测序 ITS2 序列扩增采用通用引物 ITS2F/ITS3R^[23], *COI* 序列扩增采用通用引物 LCO1490/HCO2198^[23], 以及新设计的两对蜜蜂属 *COI* 序列引物 LCO282/HCO595 和 LCO1490-APF/HCO2198-APR, 引物序列详见表 2, ITS2 和 *COI* 通用引物的扩增条件参照 2015 版《中国药典》^[23], 新设计的蜜蜂属 *COI* 序列引物 PCR 扩增条件为: 94 °C 1 min; 94 °C 1 min, 52 °C 1.5 min, 72 °C 1 min, 40 个循环; 72 °C 5 min。PCR 反应体系为 25 μ L: 2 \times PCR mix (Aidlab Biotechnologies Co., China) 12.5 μ L, 2.5 mmol \cdot L⁻¹ 正反向引物各 1 μ L, 模板 DNA 2 μ L, 加灭菌双蒸水至 25 μ L, 设置未加模板 DNA 的 PCR 反应为阴性对照。采用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行检测。

扩增产物经纯化后使用 ABI 3730XL (Applied Biosystems Co., USA) 测序仪进行双向测序, 直接测序成功的样品提交至 GenBank。测序失败的 PCR 产物进行克隆测序, 具体方法为: PCR 产物采用 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒 (Axygen Biosciences Co., USA) 进行胶回收, 回收产物使用 *pEASY*[®]-Blunt Cloning Kit (Beijing TransGen Biotech Co., China) 与载体进行克隆、连接和转化, 转化菌液在含抗生素培养基的平板上进行过夜培养, 挑选单菌落白斑加入 LB 液体培养基培养过夜 (187 r \cdot min⁻¹, 37 °C), 采用 AxyPrep 质粒 DNA 小量试剂盒 (Axygen Biosciences Co., USA) 进行质粒 DNA 提取并测序。

数据分析 利用 CodonCode Aligner V 9.0.1 (CodonCode Co., USA) 软件进行序列校对、拼接, 去除低质量序列及引物区。基于隐马尔可夫模型 (Hidden

Markov model, HMM) 去除 5.8S rRNA 和 28S rRNA 基因区^[24]。油菜、黑芥和意大利蜂的物种鉴定使用“中药材 DNA 条形码鉴定系统” (www.tcbarcode.cn) 和参考序列比对完成。病原菌或昆虫等的鉴定使用 NCBI 的 BLAST 功能完成 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)。采用 MEGA X 软件对得到的 ITS2 序列进行多序列比对和 NJ (Neighbor-Joining) 系统发育树构建, 利用 Bootstrap (1 000 次重复) 检验各分支的支持率。

显微鉴别和薄层色谱鉴别 油菜花粉对照药材、 β -谷甾醇对照品购自中国食品药品检定研究院。显微鉴别和薄层色谱鉴别方法 (通则 0502) 分别依照 2015 版《中国药典》I 部^[1]和 2015 版《中国药典》IV 部^[23]操作。

结果

1 普乐安片 DNA 提取、PCR 扩增成功率与测序结果

利用植物基因组 DNA 提取试剂盒和动物基因组 DNA 提取试剂盒分别对 16 份普乐安片样品进行 DNA 提取, 两类基因组 DNA 提取试剂盒获得的 DNA 质量均可满足常规 PCR 扩增要求, DNA 浓度的平均值分别为 955 和 1 200 ng \cdot μ L⁻¹, A_{260}/A_{280} 的平均值分别为 1.94 和 1.99; 两类试剂盒提取得到的 DNA 均可利用 ITS2 序列的通用引物 ITS2F/ITS3R 进行 PCR 扩增, 成功率为 100%; 对于 *COI* 序列通用引物 LCO1490/HCO2198, 利用针对植物的基因组 DNA 提取试剂盒提取得到的 DNA 可对其中 7 份样品 (CPM010~CPM016) 成功进行 PCR 扩增, 利用动物基因组 DNA 提取试剂盒提取得到的 DNA 可对其中 9 份样品 (CPM004、CPM009、CPM010~CPM016) 成功进行 PCR 扩增, 具体结果见表 3, 成功率分别为 43.75% 和 56.25%; 对于 *COI* 序列的蜜蜂属特异性引物 LCO1490-APF/HCO2198-APR 和 LCO282/HCO595, 利用两类试剂盒提取得到的 DNA 均仅能对其中 7 份样品 (CPM010-CPM016) 成功进行 PCR 扩增, 见表 3, 成功率为 43.75%。此外选取一个不含样品的空管, 按照 DNA 提取及 PCR 扩增的方法步骤操作, PCR 扩增结果的电泳图显示无条带, 可以排除实验室环境对样品提取可能造成的外源污染。

Table 2 Primers and their sequences

| Marker | Primer | 5'-3' sequence |
|------------|-------------|-----------------------------|
| ITS2 | ITS2F | ATGCGATACTTGGTGTGAAT |
| | ITS3R | GACGCTTCTCCAGACTACAAT |
| <i>COI</i> | LCO1490 | GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG |
| | HCO2198 | TAAACTTTCAGGGTGACCAAAAAATCA |
| | LCO282 | TTTGATTACTTCTCCCTC |
| | HCO595 | TTGCTCCAGCTAATACAGG |
| | LCO1490-APF | TATCAACAAATCATAAAAAATATTGG |
| | HCO2198-APR | TAAATCTCTGGATGACCAAAAAATCA |

Table 3 The result of PCR electrophoresis strip diagram. "Y" represents there is a single PCR electrophoresis strip diagram; "NR" represents there is no PCR electrophoresis strip diagram

| Sample ID | Plant Genomic DNA Extraction Kit | | | Animal Genomic DNA Extraction Kit | | |
|-----------|----------------------------------|-----------------------------|-------------------|-----------------------------------|-----------------------------|-------------------|
| | LCO1490/ HCO2198 | LCO1490-APF/ HCO2198-APR | LCO282/ HCO595 | LCO1490/ HCO2198 | LCO1490-APF/ HCO2198-APR | LCO282/ HCO595 |
| CPM001 | NR | NR | NR | NR | NR | NR |
| CPM002 | NR | NR | NR | NR | NR | NR |
| CPM003 | NR | NR | NR | NR | NR | NR |
| CPM004 | NR | NR | NR | Y | NR | NR |
| CPM005 | NR | NR | NR | NR | NR | NR |
| CPM006 | NR | NR | NR | NR | NR | NR |
| CPM007 | NR | NR | NR | NR | NR | NR |
| CPM008 | NR | NR | NR | NR | NR | NR |
| CPM009 | NR | NR | NR | Y | NR | NR |
| CPM010 | Y | Y | Y | Y | Y | Y |
| CPM011 | Y | Y | Y | Y | Y | Y |
| CPM012 | Y | Y | Y | Y | Y | Y |
| CPM013 | Y | Y | Y | Y | Y | Y |
| CPM014 | Y | Y | Y | Y | Y | Y |
| CPM015 | Y | Y | Y | Y | Y | Y |
| CPM016 | Y | Y | Y | Y | Y | Y |

2 普乐安片植物源成分的基原物种鉴定

采用 ITS2 序列对普乐安片的植物源成分进行基原物种鉴定, 其中 12 份 (CPM002、CPM003、CPM007~CPM016) 普乐安片样品可获得干净的双向测序峰图, 经拼接、注释后可获得一致的 ITS2 序列, 长度均为 191 bp, 无变异位点, 鉴定为油菜 *B. campestris*, GenBank 登录号为: MN737602~MN737613; 4 份样品 (CPM001、CPM004~CPM006) 的双向测序峰图存在较为严重的 SNP 套峰, 拼接后存在 11 个主要的 SNP 位点详见图 1。选取可覆盖所有 SNP 套峰的 CPM004 进行克隆测序、显微鉴别和薄层色谱鉴别分析, 共获得 9 条克隆序列, 包含 7 个单倍型, 鉴定结果显示, 除油菜外还存在黑芥 *B. nigra*, 详见图 2, GenBank 登录号为: MN736617~MN736625。显微鉴别和薄层色谱鉴别结果均符合 2015 版《中国药典》。

3 基于 COI 序列通用引物的普乐安片蜜蜂源成分鉴定

利用植物和动物两种 DNA 提取试剂盒, 从 16 份普乐安片样品中提取 DNA, 采用 COI 序列通用引物 LCO1490/HCO2198 共获得 9 份扩增产物, 其中两份样品 (CPM004、CPM009) 可直接测序获得 COI 序列, 经 NCBI BLAST 样品 CPM004 为铁倍蚜属 *Kaburagia* 蚜虫, 样品 CPM009 为圆角倍蚜属 *Nurudea* 蚜虫。对于 7 份不能直接测序获得 COI 序列的样品, 采用克隆测序方法进行分析, 共获得 82 条克隆测序结果, 物种鉴定结果表明: 5 份样品 (CPM011~CPM014、CPM016) 可检测到意大利蜜蜂, 2 份样品 (CPM010、CPM015) 未检测到意大利蜜蜂或其他蜂种; 7 份样品均可检测到病原菌和病虫害的 COI 序列, 其中病原菌主要来自于: 盘梗霉属 *Bremia*、疫霉属 *Phytophthora*、霜霉属 *Peronos-*

pora、白锈菌属 *Albugo*。昆虫主要为: 蓟马属 *Thrips*、施密摇蚊属 *Smittia*、中国瘤瘿螨属 *Aceria*。

4 基于 COI 序列的蜂属特异性引物对普乐安片中蜜蜂源成分鉴定

由于使用 COI 序列通用引物 LCO1490/HCO2198 无法直接获得测序结果, 因此设计两对蜜蜂属的特异 COI 序列引物 LCO1490-APF/HCO2198-APR 和 LCO282/HCO595 以检测样品中是否存在蜜蜂的 COI 序列。两对 COI 特异性引物的 PCR 扩增结果表明, 均仅有 7 份样品 (CPM010~CPM016) 可成功进行 PCR 扩增, 用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测可在相应位置获得单一且明亮的条带。利用 LCO1490-APF/HCO2198-APR 引物获得的 PCR 产物的测序结果显示, 7 份样品的 COI 序列长度均为 658 bp, 其中 2 份样品分别存在 18 和 13 个正反向测序峰图不一致的位点, 拼接结果需进行人工矫正, GenBank 登录号为: MN756615~MN756621; 通过 LCO282/HCO595 引物获得的 PCR 产物进行双向测序, 7 份样品均可获得高质量的双向测序峰图, 序列长度均为 274 bp, 无变异位点, 由两对引物获得的序列经“中药材 DNA 条形码鉴定系统”鉴定和参考序列比对均为意大利蜜蜂。

讨论

2015 版《中国药典》^[1] 收录的普乐安片鉴定方法包括显微鉴别法、薄层色谱法和基于高效液相色谱法的含量检查, 显微鉴别法根据花粉粒的形状、直径、萌发沟、表面纹理等特征鉴定油菜花粉, 薄层色谱法和高效液相色谱法对油菜花粉及其化学成分 β -谷甾醇、槲皮素和山柰素进行检测, 难以有效甄别是否有其他花粉

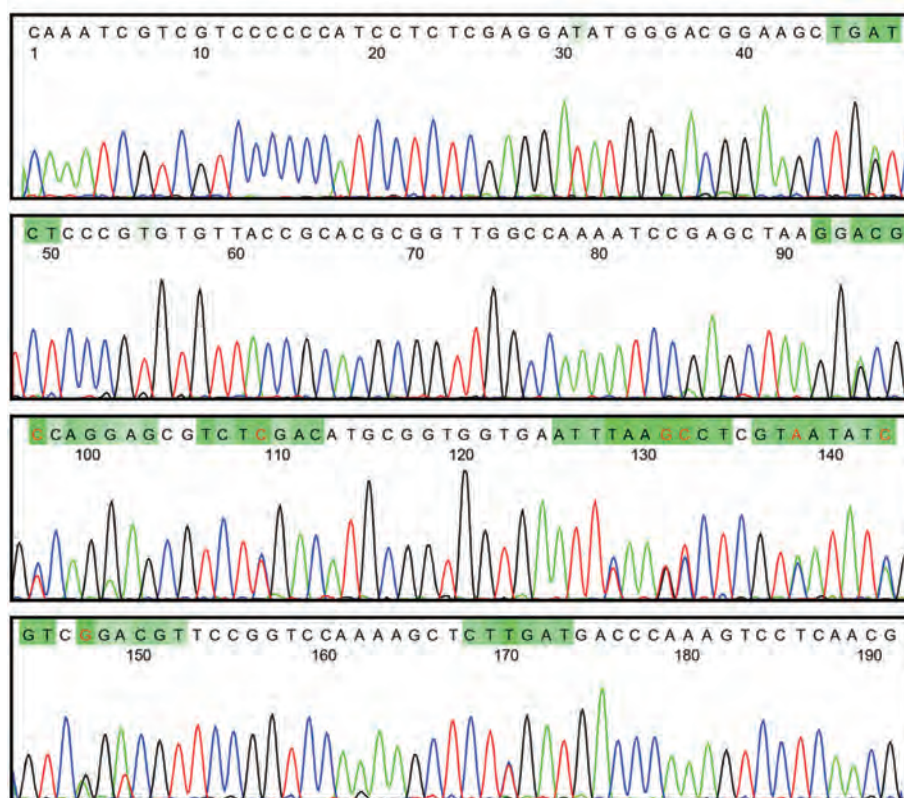


Figure 1 The sequencing chromatogram of CPM004 sample

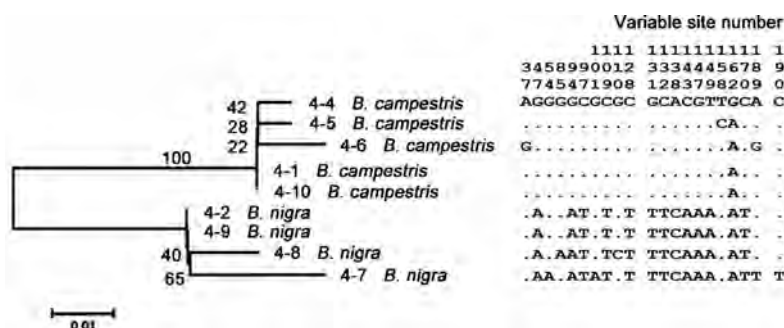


Figure 2 Analysis of NJ phylogenetic tree and variation loci based on haplotypes of CPM004 sample

如茶花粉、荞麦花粉、向日葵花粉、玉米花粉等的投料^[25]。另外, 尚未有方法鉴定普乐安片的油菜花粉原料是否为蜜蜂采集所得, 因此需进一步建立专属性更强的质量控制方法以提高普乐安片的质量标准。

本研究基于DNA条形码技术对普乐安片处方成分进行鉴定, ITS2序列鉴定结果表明4份普乐安片的植物源物种包含油菜和黑芥, 但无法进一步证明是原料中掺了黑芥花粉, 还是油菜花粉的原植物具有黑芥的遗传背景。油菜和黑芥同属十字花科芸苔属, 该属亲缘进化关系较为复杂, 其栽培种包括蔓菁 *B. rapa* (AA)、黑芥 *B. nigra* (BB) 和野甘蓝 *B. oleracea* (CC) 3个二倍体基本种, 以及欧洲油菜 *B. napus* (AACC)、芥

菜 *B. juncea* (AABB) 和埃塞俄比亚芥 *B. carinata* (BBCC) 3个四倍体复合种^[26,27], 芸苔属物种间的进化关系通过禹氏三角 (U Triangle) 模型描述^[28]。1833年, Johann Metzger首次将蔓菁和油菜两个物种联合命名, 并采用蔓菁作为两个物种的合并种名称^[29]。但其实油菜和蔓菁存在区别, 油菜属一年生植物具非肉质主根, 蔓菁是二年生植物具肉质主根, 中国植物志英文版将油菜作为蔓菁变种 *B. nigra* var. *oleifera*^[30]的异名。通常所说的油菜一般为芸苔的统称^[31], 广泛种植于亚洲, 种子被用作油料, 而黑芥广泛种植于西方, 种子常作为调味品使用。采用不同遗传背景的油菜花粉制作的普乐安片是否具有临床疗效差异尚缺乏系统研究。

采用 *COI* 序列进行鉴定表明 LCO1490/HCO2198 通用引物直接测序失败, 经克隆测序发现存在蓟马等以花粉为食的害虫。为解决因外源污染导致的蜜蜂源检测失败, 本研究针对蜜蜂属序列设计了两对 *COI* 特异性引物并成功在 7 个厂家的样品中检测到意大利蜜蜂, 1 个厂家的样品未检测到蜜蜂源, 进一步收集该厂家 3 个批次的 9 份样品进行重复性验证, 结果均未检测到蜜蜂源, 推测该厂家普乐安片的原料油菜花粉非由蜜蜂采集所得。两对新的 *COI* 引物中引物 LCO1490-APF/HCO2198-APR 与 *COI* 通用引物 LCO1490/HCO2198 扩增区间相同, 目的片段长度均为 658 bp, 测序峰图基线有轻微的杂峰, 表明存在一定程度的外源污染干扰, 但不影响后续序列分析和结果判定。引物 LCO282/HCO595 扩增目的片段为 274 bp, 测序峰图噪声低、基线平, 对蜜蜂的鉴定具有更好的特异性。Meusnier 等^[32]研究表明长度约 150 bp 的 *COI* 区间即可获得足够的物种鉴定效率; Bhattacharjee 等^[33]设计了一个 119 bp 的 *COI* 短序列, 可准确鉴定现存鲶鱼的 3 000 个物种。因此, 本研究推荐采用扩增目的片段较短的引物 LCO282/HCO595 作为普乐安片蜜蜂源物种鉴定的 *COI* 引物使用。

中成药是在中医药理论指导下, 以中药材为原料, 按规定的处方和工艺生产的具有确切疗效和可控的质量标准, 可以直接供临床辨证使用的制剂, 包括复方制剂和单味制剂, 其中单味制剂是指单味中药通过现代化研究、生产的中成药^[34]。单味制剂疗效确切^[35], 早期医药文献的治疗也以单方居多, 利用现代技术生产的单味制剂如银杏叶片已广泛用于心血管疾病、脑缺血疾病等, 是目前世界上治疗心脑血管疾病疗效确切的天然药物^[36-39]。此外, 单味制剂生产工艺较为简单, 可变因素较少, 易于被国际社会接受, 可以作为中成药国际化的开端。2015 版《中国药典》共收录的单味制剂有 70 余种, 除了普乐安片外, 还有宫血宁胶囊、板蓝根颗粒、诺迪康片、穿心莲片、益母草膏等常用中成药。因此, 单味制剂可以作为中成药 DNA 条形码鉴定的切入点, 同时 DNA 条形码技术也有助于单味制剂质量标准的提升, 进一步推进其现代化、标准化和国际化进程。

References

- [1] Chinese Pharmacopoeia Committee. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. Part I. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 1623-1624.
- [2] Hui F, Jiao SR, Tang YM, et al. Advance studying of rape pollen [J]. Food Ind (食品工业), 2011, 32: 108-111.
- [3] Yang BH, Yin KQ, Chen J, et al. Analysis of nutrition composition on four pollens [J]. Apicult China (中国蜂业), 2010, 61: 11-14.
- [4] Morais M, Moreira L, Feás X, et al. Honeybee-collected pollen from five Portuguese natural parks: palynological origin, phenolic content, antioxidant properties and antimicrobial activity [J]. Food Chem Toxicol, 2011, 49: 1096-1101.
- [5] Lv HH, Wang XY, He YF, et al. Identification and quantification of flavonoid aglycones in rape bee pollen from Qinghai-Tibetan plateau by HPLC-DAD-APCI/MS [J]. J Food Compos Anal, 2015, 38: 49-54.
- [6] Wu YD, Lou YJ. Brassinolide, a plant sterol from pollen of *Brassica napus* L., induces apoptosis in human prostate cancer PC-3 cells [J]. Pharmazie, 2007, 62: 392-395.
- [7] Chen SL, Yao H, Han JP, et al. Principles for molecular identification of traditional Chinese materia medica using DNA barcoding [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2013, 38: 141-148.
- [8] British Pharmacopoeia Commission. British Pharmacopoeia, 2017 Edition [S]. London: TSO, 2016.
- [9] Chen XC, Xiang L, Shi LC, et al. Identification of crude drugs in the Japanese pharmacopoeia using a DNA barcoding system [J]. Sci Rep, 2017, 7: 42325.
- [10] Jia J, Shi LC, Yao H, et al. Identification of *Bombyx Batryticatus* based on DNA barcoding technology [J]. Acta Pharm Sin (药学期报), 2016, 51: 1784-1790.
- [11] Zhu YJ, Chen SL, Yao H, et al. DNA barcoding the medicinal plants of the genus *Paris* [J]. Acta Pharm Sin (药学期报), 2010, 45: 376-382.
- [12] Zhao S, Pang XH, Song JY, et al. Identification of *Albiziae Cortex*, *Albiziae Flos* and their adulterants using ITS2 barcoding [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2014, 39: 2164-2168.
- [13] Xin TY, Yao H, Luo K, et al. Stability and accuracy of the identification of *Notopterygii Rhizoma et Radix* using the ITS/ITS2 barcodes [J]. Acta Pharm Sin (药学期报), 2012, 47: 1098-1105.
- [14] Jia J, Shi LC, Xu ZC, et al. Identification of antler powder components based on DNA barcoding technology [J]. Acta Pharm Sin (药学期报), 2015, 50: 1356-1361.
- [15] Shi LC, Jin Y, Zhao CY, et al. Species identification of *Anemarrhenae Rhizoma* seeds by DNA barcoding technique [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2018, 24: 21-27.
- [16] Liu JX, Li G, Chen CX, et al. Identification of DNA barcoding of *Atractylodis Rhizoma* seedlings by ITS2 sequence [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2018, 24: 34-38.
- [17] Shi LC, Liu JX, Wei MJ, et al. DNA metabarcoding identification of prescription ingredients in traditional medicine Ruyi Jinhuang San [J]. Sci Sin Vit (中国科学: 生命科学), 2018, 48: 490-497.
- [18] Miller SE. DNA barcoding and the renaissance of taxonomy [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104: 4775-4776.
- [19] Jia J, Xu ZC, Xin YT, et al. Quality control of the traditional

- patent medicine Yimu Wan based on SMRT sequencing and DNA barcoding [J]. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 926.
- [20] Xin TY, Xu ZC, Jia J, et al. Biomonitoring for traditional herbal medicinal products using DNA metabarcoding and single molecule, real-time sequencing [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2018, 8: 488-497.
- [21] Yang YW, Lai KN, Tai PY, et al. Molecular phylogenetic studies of *Brassica*, *Rorippa*, *Arabidopsis* and Allied Genera based on the internal transcribed spacer region of 18S-25S rDNA [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 1999, 13: 455-462.
- [22] Qi XH, Zhang MF, Yang JH. Molecular phylogeny of Chinese vegetable mustard (*Brassica juncea*) based on the internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA [J]. *Genet Resour Crop Evol*, 2007, 54: 1709-1716.
- [23] Chinese Pharmacopoeia Committee. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. Part IV. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 57-59, 383-385.
- [24] Keller A, Schleicher T, Schultz J, et al. 5.8S-28S rRNA interaction and HMM-based ITS2 annotation [J]. *Gene*, 2009, 430: 50-57.
- [25] Cheng QY, Zhang WT, Chen BL, et al. HPLC fingerprint of Pule'an Tablets [J]. *Chin Tradit Pat Med (中成药)*, 2016, 38: 94-97.
- [26] Lu K, Wei LJ, Li XL, et al. Whole-genome resequencing reveals *Brassica napus* origin and genetic loci involved in its improvement [J]. *Nat Commun*, 2019, 10: 1154.
- [27] Yang JH, Liu DY, Wang XW, et al. The genome sequence of allopolyploid *Brassica juncea* and analysis of differential homoeolog gene expression influencing selection [J]. *Nat Genet*, 2016, 48: 1225-1232.
- [28] Nagaharu U. Genome analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization [J]. *Jpn J Bot*, 1935, 7, 389-452.
- [29] Metzger J. Systematische Beschreibung der kultivirten Kohlarten mit ihren zahlreichen Spielarten, ihrer Kultur und ökonomischen Benutzung nach mehrjährigen Anbauungs-Versuchen [M]. A. Osswald, 1833.
- [30] Flora of China Editorial Committee. Flora of China [M]. Vol 22. Beijing: Science Press and Missouri Botanical Garden Press, 2006: 7.
- [31] Sinicae Agendae Academiae Sinicae Edita. Flora Reipublicae Popularis Sinicae (中国植物志) [M]. Beijing: Science Press, 1977: 386.
- [32] Meusnier I, Singer GAC, Landry J, et al. A universal DNA mini-barcode for biodiversity analysis [J]. *BMC Genomics*, 2008, 9: 214.
- [33] Bhattacharjee MJ, Ghosh SK. Design of mini-barcode for catfishes for assessment of archival biodiversity [J]. *Mol Ecol Resour*, 2014, 14: 469-477.
- [34] Zhang DF. Chinese Patent Medicine Study(中成药学) [M]. Beijing: China Press of Traditional Chinese Medicine, 2009: 1-2.
- [35] Du HQ. Single-herb Chinese patent medicine and modernization of Chinese medicine [J]. *China Health Care Nutr (中国保健营养)*, 2013, 8: 4780.
- [36] Pereira E, Barros L, Ferreira ICFR. Chemical characterization of *Ginkgo biloba* L. and antioxidant properties of its extracts and dietary supplements [J]. *Ind Crops Prod*, 2013, 51: 244-248.
- [37] Wang WP, Kang Q, Liu N, et al. Enhanced dissolution rate and oral bioavailability of *Ginkgo biloba* extract by preparing solid dispersion via hot-melt extrusion [J]. *Fitoterapia*, 2015, 102: 189-197.
- [38] Canevelli M, Adali N, Kelaiditi E, et al. Effects of *Ginkgo biloba* supplementation in Alzheimer's disease patients receiving cholinesterase inhibitors: data from the ICTUS study [J]. *Phytomedicine*, 2014, 21: 888-892.
- [39] Heinonen T, Gaus W. Cross matching observations on toxicological and clinical data for the assessment of tolerability and safety of *Ginkgo biloba* leaf extract [J]. *Toxicology*, 2015, 327: 95-115.