

邱希斌. 基于 ITS 基因条码的保健食品中植物源性成分的鉴定 [J]. 福建农业学报, 2023, 38 (8): 989–1003.

QIU X B. Utilization of ITS Gene Barcodes for Identifying Plant-derived Functional Ingredients in Health Food Products [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2023, 38 (8): 989–1003.

基于 ITS 基因条码的保健食品中植物源性成分的鉴定

邱希斌

[福建省产品质量检验研究院/国家加工食品质量检验检测中心(福州), 福建 福州 350002]

摘要:【目的】研究并建立运用 ITS 基因条码技术针对保健食品常见植物原料源性成分的分子生物学鉴定技术。

【方法】通过采用回顾性调查方法, 选取西洋参 (*Panax quinquefolius*)、铁皮石斛 (*Dendrobium candidum*) 以及红景天 (*Rhodiola nobilis*)、枸杞子 (*Lycium barbarum* L.) 与人参 Ginseng (*Radix Ginseng*) 作为研究对象。探索其作为生产原料的常见保健食品剂型中, 目标 DNA 的最佳提取方法。运用 ITS2 内转录间隔区保守特性设计引物序列, 并通过调整优化体系中各物质的组分, 由此构建稳定高效准确的 PCR 反应体系。【结果】采用改良 CTAB 法可实现对所研究的保健食品中常见剂型目标 DNA 的提取, 纯度及质量达到反应要求。所建立的 PCR 法扩增效果良好, 对西洋参、铁皮石斛以及红景天的方法灵敏度均为 $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 枸杞子与人参的方法灵敏度为 $0.1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。【结论】运用建立的方法可实现对保健食品中常见植物性原料西洋参、人参、铁皮石斛、枸杞子、红景天成分的鉴定, 适用于丸剂、片剂、口服液等不同剂型的保健食品中原料鉴别, 可运用于对保健食品中植物源性的检测。

关键词: 基因条码技术; 保健食品; 植物源性成分; PCR

中图分类号: Q751

文献标志码: A

文章编号: 1008-0384 (2023) 08-0989-15

Utilization of ITS Gene Barcodes for Identifying Plant-derived Functional Ingredients in Health Food Products

QIU Xibin

[Fujian Inspection and Research Institute for Product Quality/National Quality Supervision and Testing Center for Processed Food (FuZhou), Fuzhou, Fujian 350002, China]

Abstract: 【Objective】A molecular biology identification method to detect common plant-derived functional ingredients in health food products using genetic barcodes was developed. 【Method】By means of retrospective investigation, 5 common health food raw materials in China, i.e., American ginseng (*Panax quinquefolius*), *Dendrobium candidum*, rhodiola (*Rhodiola nobilis*), wolfberries (*Lycium barbarum* L.), and ginseng (*Radix Ginseng*), were firstly tested for functional ingredients using the best extraction method on the target DNA. A stable, efficient, and accurate PCR reaction system was constructed with primer sequence designed based on the conservative characteristics of ITS2 internal transcribed spacer and components of each substance adjusted and optimized. Molecular identification on health food products of various forms was tested using the developed method. 【Result】The innovative application of a modified CTAB method afforded successful extraction of the target DNA in health food materials as well as products at commonly formulated dosages. The PCR amplified with the detection sensitivity on nucleic acids of American ginseng, *D. candidum*, and rhodiola reached $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, and of wolfberries and ginseng $0.1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. 【Conclusion】By using the ITS gene barcodes obtained through the DNA extraction and PCR amplification, the key functional ingredients from plant materials such as American ginseng, ginseng, *D. candidum*, wolfberries, and rhodiola rosea could be identified for authentication of health food products in the forms of pills, tablets, and concoctions.

Key words: Gene barcode; health food; plant-derived functional ingredients; PCR

收稿日期: 2022-09-15 修回日期: 2023-05-25

作者简介: 邱希斌 (1991—), 男, 硕士, 工程师, 主要从事加工食品检验及分子生物学研究, E-mail: 120734300@qq.com

基金项目: 福建省市场监督管理局科技项目 (FJMS2020002); 福建省产品质量检验研究院科技项目 (KY202012A)

0 引言

【研究意义】保健食品是指供特定的亚健康人群食用,具有一定的养生保健功能或是以旨在为身体提供维生素和矿物质,且不能代替药品治愈疾病的功能性食品^[1-2]。近 10 年许多科研工作者对本国已获允许的如辅助降血脂、抗疲劳、耐缺氧、缓解视疲劳等保健食品进行统计研究与报道^[3-4]。据统计,植物原料在保健食品市场应用广泛^[5]。但是,近年来,由于产业发展过于迅猛,导致监管过程中难免有漏洞,使得保健食品市场存在不少乱象,如所用中药材以党参替代西洋参、人参,以紫皮石斛、水草石斛冒充铁皮石斛等现象多发。因此,亟需建立并完善的保健食品中植物源性鉴定检测方法^[6]。【前人研究进展】Guo 等探讨了硅藻“条形码”基因(18S rRNA 基因和 ITS、COI、rbcL)的比较及其在区分和确定硅藻门物种分类学中的有效性^[7]。Quaresma 等^[8]通过不断探索构建了应用条码技术的研究模式。Cheng 等^[9]通过研究,基于聚合酶链式反应开展通过利用核基因 ITS2 条形码的 SNP 位点的鉴定技术。Zhou 等^[10]将其运用于植物鉴定的多项研究,并比较了多位点的优劣。陈士林等^[11]对 6 000 余份药用植物样本开展基因条形码序列筛选,比较 7 个候选基因条形码,其筛选标准涵盖了 PCR 扩增效率、种内、种间遗传变异以及 barcoding gap,结果表明最适合的基因条形码为核 DNA 的 ITS2 序列。Shi 等^[12]的研究表明,许多科属基原植物和药材的鉴定中使用该技术具有可行与准确性。【本研究切入点】近年来,国外学者对中药材鉴定的研究多停留在化学分析领域,但也有少数学者绕过药材本身对其中添加的植物有效成分进行分析,主要通过物理、化学、气相和液相等方法对含植物性原料成分的保健食品进行检测。鉴于中药保健食品加工过程比较复杂,DNA 片段经过密集加工,加入糖类、脂类或其他吸附性辅料,不利于核酸的提取。综合来看,国内外对于保健食品中运用分子生物学鉴定技术的研究尚未形成较为成熟的成果。【拟解决关键问题】本研究采用回顾性调查方法,参考李庆等^[13]的反观考查方式,统计分析国家食品药品监督管理局网站中 2010—2020 年各年度已注册保健食品信息,通过建立数据库进行分析。结合市场调研情况与电商平台销售大数据分析,研究选择枸杞子、西洋参、人参、红景天、铁皮石斛作为保健食品中植物源性成分鉴定的主要研究目标。探索常见剂型中目标 DNA 的最佳提取方法,并运用 ITS2 内转录间隔区保守特性的引物序列,优化建立稳定的鉴定方法探究建立保健食品中

植物性原料的鉴定方法,以期为市场监管提供理论依据,为进一步规范保健食品市场提供支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试药材

本研究中的供试药材样本(植物原材料)来自福建中医药大学药学院及正规电商平台药店采购,产品附有产地信息及销售许可,共选取 5 个物种的共计 25 个药材样品作为供试样本。为确保不同来源及产地的药材样品 DNA 提取的稳定和代表性,根据《中华人民共和国药典》《中药材质量标准》和《中药制剂质量标准》,委托福建省食品药品检验研究院对供试药材的采购进行指导,所获得的药材均属二等及以上,所有样品经减压干燥后保存于本实验室,样品详细信息见表 1。

1.1.2 深加工保健食品

本研究中的供试保健食品主要来自正规电商平台(京东、天猫)以及连锁实体药店。在选购前拟定了所选研究的含植物性原料的中药保健食品所涵盖的基本剂型品类。并登陆国家市场监督管理总局(<http://www.samr.gov.cn>)特殊食品信息查询平台,核查中药保健食品的相关讯息,确保试验所用的中药保健食品来源可靠。同时,通过查询产品配料表对宣称含有的目标植物种类进行确认,选取排名最前的并含有目标物种的保健食品作为采购对象,以符合试验研究的试验要求,保健食品名称、剂型及配料表宣称所含目标植物相关信息见表 2。

1.1.3 主要仪器

S1000 梯度双模块 PCR 仪:美国伯乐公司;DB-3D 热块加热器:意大利泰科尼(TECHNE);MSU-125P-100-DU 分析天平:德国赛多利斯公司;Sub-Cell 192 水平电泳仪:美国伯乐公司;GEL LOGIC 212PRO 凝胶成像系统:美国柯达公司;Minispin 台式离心机:德国 Eppendorf 公司;IKA MS3basic 涡旋混合器:德国艾卡公司;Ster-ilGARD III Advance 生物安全柜:美国 Baker 公司;HVE50 高压灭菌锅:日本 Hirayama 公司;DNA 浓缩仪:赛默飞世尔科技公司;UV-2550 紫外分光光度计:日本岛津公司;ULTROSPEC 2100 PRO 核酸蛋白质测定仪:美国通用电气公司;CR22G II 高速冷冻离心机:日本 Hitachi 公司。

1.1.4 主要试剂

U9211 血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒:天根生化科技(北京)有限公司;LP0028A 琼

表 1 供试药材信息
Table 1 Information on test materials

序号 Serial No	物种名称及编号 Species name and number	产品状态 Product State	产地 Place of Origin
1	西洋参1 American ginseng 1	粉末 Powder	云南昆明 Kunming, Yunnan
2	西洋参2 American ginseng 2	药材 Medicinal materials	黑龙江饶河 Raohe, Heilongjiang
3	西洋参3 American ginseng 3	药材 Medicinal materials	加拿大 Canada
4	西洋参4 American ginseng 4	饮片 Decoction pieces	吉林清河 Qinghe, Jilin
5	西洋参5 American ginseng 5	饮片 Decoction pieces	美国 U.S.A
6	人参1 Ginseng1	鲜品 Fresh products	吉林通化 Tonghua ,Jilin
7	人参2 Ginseng2	鲜品 Fresh products	吉林延吉 Yanji ,Jilin
8	人参3 Ginseng3	鲜品 Fresh products	吉林长白山 Changbai Mountain, Jilin
9	人参4 Ginseng4	鲜品 Fresh products	黑龙江饶河 Raohe, Heilongjiang
10	人参5 Ginseng5	饮片 Decoction pieces	新西兰 New Zealand
11	枸杞子1 Chinese wolfberry1	药材 Medicinal materials	内蒙古 Inner Mongolia
12	枸杞子2 Chinese wolfberry2	药材 Medicinal materials	宁夏 Ningxia
13	枸杞子3 Chinese wolfberry3	药材 Medicinal materials	甘肃陇南 Longnan, Gansu
14	枸杞子4 Chinese wolfberry4	药材 Medicinal materials	山东日照 Rizhao, Shandong
15	枸杞子5 Chinese wolfberry5	药材 Medicinal materials	河北邢台 Xingtai, Hebei
16	铁皮石斛1 Dendrobium candidum1	粉末 Powder	湖南邵阳 Shaoyang, Hunan
17	铁皮石斛2 Dendrobium candidum2	药材 Medicinal materials	浙江天台 Tiantai, Zhejiang
18	铁皮石斛3 Dendrobium candidum3	药材 Medicinal materials	福建宁化 Ninghua, Fujian
19	铁皮石斛4 Dendrobium candidum4	饮片 Decoction pieces	广西天峨 Tian'e, Guangxi
20	铁皮石斛5 Dendrobium candidum5	饮片 Decoction pieces	云南文山 Wenshan, Yunnan
21	红景天1 Rhodiola1	饮片 Decoction pieces	内蒙古兴安 Xing'an, Inner Mongolia
22	红景天2 Rhodiola2	药材 Medicinal materials	吉林延吉 Yanji ,Jilin
23	红景天3 Rhodiola3	药材 Medicinal materials	西藏拉萨 Tibet Lhasa
24	红景天4 Rhodiola4	饮片 Decoction pieces	黑龙江饶河 Raohe, Heilongjiang
25	红景天5 Rhodiola5	饮片 Decoction pieces	甘肃兰州 Lanzhou, Gansu

脂糖：英国 OXOID 公司；*Taq* DNA Polymerase（5 U·μL⁻¹）、MgCl₂（25 mmol·L⁻¹）、dNTP mixture（25 mmol·L⁻¹）、10× Buffer 缓冲液、2×*SanTaq* PCR Mix 预混液（含蓝染料）、100~2000 bp DNA 分子量标准 Marker D、6×Loading buffer 和 4S Red Plus 核酸染色剂购自 bbi-lifesciences corporation；十六烷基三甲基溴化铵（CTAB）、十二烷基磺酸钠（SDS）、乙二胺四乙酸二钠（EDTA）、聚乙烯吡咯烷酮、三羟甲基氨基甲烷和 β-巯基乙醇购自西陇化工；大肠埃希氏菌（ATCC 25922）。

研究采用 ITS2 序列作为鉴定反应通用引物，以真核生物 18s-DNA 内参基因验证提取有效性。委托

生工生物工程（上海）股份有限公司合成，引物序列见表 3。

1.2 试验方法

1.2.1 药用植物 DNA 提取方法比较优化

研究通过比较常见的植物 DNA 提取方法作为保健食品中植物 DNA 提取的基础方法，主要包括以下 3 种，每种方法开展 3 次重复试验。

（1）传统碱裂解 SDS 法

取经预处理后的药材 1 置预冷研钵中，加 10% PVP-40 粉末后速加液氮研成粉末。转至预冷的离心管中，加入 1 mL 提取缓冲液 1（25 mmol·L⁻¹ Tris-HCl，10 mmol·L⁻¹ EDTA）充分混匀，加入 2 mL 提取缓冲

表 2 供试保健食品信息
Table 2 Information on health food products

序号 Serial No	保健食品名称 Name of health food	剂型 Dosage form	配料表宣称所含目标植物 Target plants claimed in the ingredient list
1	西洋参含片 American ginseng buccal tablet	片剂 Tablet	西洋参 American ginseng
2	美国洋参含片 American ginseng buccal tablet	片剂 Tablet	西洋参 American ginseng
3	西洋参三七胶囊 Panax quinquefolium and panax notoginseng capsules	胶囊 Capsule	西洋参 American ginseng
4	西洋参淫羊藿枸杞子软胶囊 Panax quinquefolium epimedium and wolfberry fruit soft capsules	胶囊 Capsule	西洋参 American ginseng
5	西洋参三七口服液 American ginseng and panax notoginseng oral liquid	口服液 oral liquid	西洋参 American ginseng
6	灵芝西洋参口服液 Ganoderma lucidum and American ginseng oral liquid	口服液 oral liquid	西洋参 American ginseng
7	人参提取口服液 Ginseng Extract Oral Liquid	口服液 oral liquid	人参 Ginseng
8	人参氨基酸口服液 Ginseng Amino Acid Oral Liquid	口服液 oral liquid	人参 Ginseng
9	人参三七含片 Ginseng and Sanqi Buccal Tablets	片剂 Tablet	人参 Ginseng
10	人参滴丸 Ginseng dropping pill	丸剂 Pills	人参 Ginseng
11	杞苓枣氨基酸口服液 Jujube Amino Acid Oral Liquid	口服液 oral liquid	枸杞子 Chinese wolfberry
12	玛咖枸杞胶囊 Maca medlar capsule	胶囊 Capsule	枸杞子 Chinese wolfberry
13	氨基酸枸杞片 Amino acid medlar tablet	片剂 Tablet	枸杞子 Chinese wolfberry
14	阿胶枸杞颗粒冲剂 Donkey hide gelatin and wolfberry granules	颗粒剂 Granule	枸杞子 Chinese wolfberry
15	森山铁皮枫斗颗粒 Senshan Iron Sheet Granules	冲剂 Granules	铁皮石斛 Dendrobium candidum
16	九仙尊米斛枫斗浆 Nine Immortals Zun Rice Dendrobium Maple Juice	片剂 Tablet	铁皮石斛 Dendrobium candidum
17	铁皮枫斗口服液 Dendrobium candidum oral liquid	口服液 oral liquid	铁皮石斛 Dendrobium candidum
18	津玉石斛口服液 Jinyu Dendrobium Oral Liquid	口服液 oral liquid	铁皮石斛 Dendrobium candidum
19	铁皮石斛西洋参黄芪胶囊 Dendrobium candidum, American ginseng and astragalus capsule	胶囊 Capsule	铁皮石斛 Dendrobium candidum
20	红景天软胶囊 Rhodiola Soft Capsule	胶囊 Capsule	红景天 Rhodiola
21	红景天西洋参口服液 Rhodiola and American Ginseng Oral Liquid	口服液 oral liquid	红景天 Rhodiola
22	红景天提取物口服液 Rhodiola extract oral liquid	口服液 oral liquid	红景天 Rhodiola
23	红景天胶囊 Rhodiola Capsule	胶囊 Capsule	红景天 Rhodiola
24	圣莲红景天丸 Shenglian Rhodiola Capsule	丸剂 Pills	红景天 Rhodiola

表 3 引物序列
Table 3 Primer sequences

片段 Fragment	引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')
ITS2	ITS2-F	ATGCGATACTTGGTGTGAAT
	ITS2-R	GACGCTTCTCCAGACTACAAT
18S	18S-F	CCTGAGAAACGGCTACCAT
	18S-R	CGTGTCAGGATTGGGTAAT

液 2 (0.2 mol·L⁻¹ NaOH, 1% SDS), 75 ℃ 水浴 30 min, 使样品基本溶解。加入 1.5 mL 提取缓冲液 3 (3 mL KAC, 0.575 mL HAC, 加水至 5 mL) 0 ℃ 放置 10 min

充分沉淀。4 ℃, 12 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 取上清。加入等体积氯仿-异戊醇 [*V* (氯仿):*V* (异戊醇) =24:1], 充分混匀, 放置片刻。12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min。取上清, 加入等体积预冷异丙醇, 混匀, 室温放置 30 min。12 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 弃上清, 加入 100 μL TE 溶解, -20 ℃ 冷冻备用。

(2) 改良 CTAB 法

取药材 2 g 置于 10 mL 离心管中, 加 65 ℃ 预热的 2×CTAB 提取缓冲液 2.5 mL 及巯基乙醇 100 μL, 于 65 ℃ 水浴裂解 2 h, 期间常振荡, 8 000 r·min⁻¹ 离心 5 min; 取上清液加甲醇 5 mL, 20 ℃ 沉淀 1 h, 8 000 r·min⁻¹ 离心 5 min; 取沉淀转移到 2 mL EP 管

中, 再加入 65 ℃ 预热的 2×CTAB 提取缓冲液 600 μL 及巯基乙醇 16 μL, 置于 65 ℃ 裂解 20 min, 期间常振荡, 随后加等体积氯仿-异戊醇 [$V(\text{氯仿}) : V(\text{异戊醇}) = 24:1$], 颠倒混匀 5 min, $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min; 取上清液加等体积-20 ℃ 预冷的异丙醇, -20 ℃ 沉淀 2 h, $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min; 取沉淀用无菌水 600 μL 溶解, 随后加入乙醇 1 200 μL 及 $3\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸钠溶液 60 μL, 混匀, 置-20 ℃ 沉淀 1 h, $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 根据 DNA 的质量重复本操作 2~3 次; 沉淀置于 37 ℃ 烘箱温育 1 h, 直至乙醇挥干, 随后加无菌水 200 μL 溶解, -20 ℃ 冷冻备用。

(3) 试剂盒法

取适量药材干燥后于-20 ℃ 冰箱冷冻 4 h, 置于刀片式均质器中粉碎至细粉状, 再取约 30 mg 置 1.5 mL EP 管中, 具体试验步骤按照试剂盒说明书进行提取, 最终加入 100 μL TE 洗脱缓冲液。

采用上述 3 种提取 DNA 的方法, 再分别用核酸蛋白测定仪测定其 DNA 的质量浓度, 通过记录其在紫外光 260 nm 和 280 nm 的吸收值 A_{260} 和 A_{280} , 并以 A_{260}/A_{280} 的比值用于鉴定其纯度。同时数据采用 SPSS 26.0 进行分析处理, 经方差分析确定, 不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著, 以此选择最优提取方式。

1.2.2 源性鉴定 PCR 体系的建立及方法灵敏度测定

本研究通过建立自配体系确定最佳扩增体系。用通用引物 ITS-F 和 ITS-R 进行 ITS2 片段整段扩增 (内参基因 18S 同)。PCR 体系 (50 μL): $10\times\text{PCR buffer}$ 5.0 μL, dNTP mixture ($10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 1.0 μL, $Taq\text{ DNA Polymerase}$ ($5\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) 1.0 μL, 使用单因素法对不同成分添加量进行组合, MgCl_2 ($25\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 添加量为 3.0、4.0、5.0 μL、引物 F 及 R ($10\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 添加量为 0.50、1.0、1.5、2.0 μL, 模板 DNA 添加量为 2.0、2.5、3.0 μL, ddH_2O 补足至 50 μL。反应中使用不同退火温度 (52、55、58 ℃), 保持时间 (50、55、60 s) 进行筛选。反应完毕后采用 $6\times\text{Loading buffer}$ 溶液与模板 DNA 充分混匀, 于 1.5% 琼脂糖凝胶板上点样, 电压 140 V, 时间 45 min。扩增产物经纯化后, 送生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序, 此峰形图经专业软件拼接后再去除引物及低质量区, 从而获得相应条形码序列。于中药材条形码鉴定系统 (<http://www.tcmbarcode.cn>) 查找并在 GenBank 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 中应用 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)

方法进行结果判定, 以此确认及验证方法的准确性。在方法灵敏度的确定上, 将提取到的供试药用植物采用最佳提取方式提取 DNA, 使用核酸蛋白浓缩仪至 $100\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 并稀释至 1、0.1、0.01、0.001 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 将稀释后的 DNA 溶液作为模板进行 PCR 反应, 确定方法灵敏度。

1.2.3 供试深加工保健食品植物源性成分的鉴定

由于保健食品的生产工艺多样, 在加工过程中, 经过破碎、浸泡、提纯、萃取、烘干、暴晒等过程, 难免对 DNA 产生一定的破坏, 其代表性浓度与完整性有较大影响, 对 DNA 的提取造成一定的困难。加之不同剂型中所采用的功效机理有较大的不同, 更对 DNA 的提取造成较大的影响。研究根据保健食品的剂型对采样量做适当调整, 尤其对于口服液等深加工的产品, 通过离心、去糖化等方式, 降低口味中和剂对提取效率的影响以提高 DNA 的获取率。选用 1.2.1 中得出的最优提取方式作为保健食品中植物源性 DNA 提取的基础方法。对于丸剂、片剂、冲剂, 取完整食用部分于-20 ℃ 冷冻 2 h 后速加液氮研成粉末置于 EP 管中, 取 4 g 于离心管超声作用 3 min 进行后开展后续试验。对于胶囊, 取胶囊内容物于-20 ℃ 冷冻 2 h 后速加液氮研成粉末, 取 2 g 于离心管-10 ℃ 进行超声作用后开展后续试验。口服液取 10 mL 于 15 mL 离心管, $15\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 冷冻离心, 弃上清取沉淀或下层溶液于离心管, 超声作用后进行后续试验。同时, 根据不同剂型的特点做适当调整, 最终确定针对不同剂型的保健食品中 DNA 的提取方法。在 PCR 反应的构建方面, 根据不同剂型的保健食品的特点, 结合 1.2.2 中研究探索的 PCR 体系进行建立优化。

2 结果与分析

2.1 3 种 DAN 提取方法的比较

表 4 结果显示, 传统碱裂解法在提取所选取的 25 种植物 DNA 效果较为稳定, 但鉴于不同植物 DNA 分布及其他物质干扰有所不同, 整体提取纯度在 3 种方法中较低。试剂盒法提取的 DNA 得率虽整体高于传统方法, 但纯度没有较为明显的提升, 考虑试剂盒作为真核生物的通用产品, 在进行植物源性提取时针对性不强, 在裂解具有坚硬外表的植物组织方面需进行更为复杂的前处理。同时, 在提取有糖类物质包裹的 DNA 时, 提取方法对糖类杂质的去除作为后续提取保健食品中 DNA 成分的重要过程

显得更为重要。研究中所采用的改良 CTAB 法提取的 DNA A_{260}/A_{280} 值均约在 1.80~2.00, 说明采用该方法所提取的基因组 DNA 纯度较高, 含 RNA、蛋白、酚类等干扰性成分较低, 得率也较为理想。

2.2 PCR 扩增方法的建立优化与应用

2.2.1 PCR 反应体系的建立及灵敏度试验

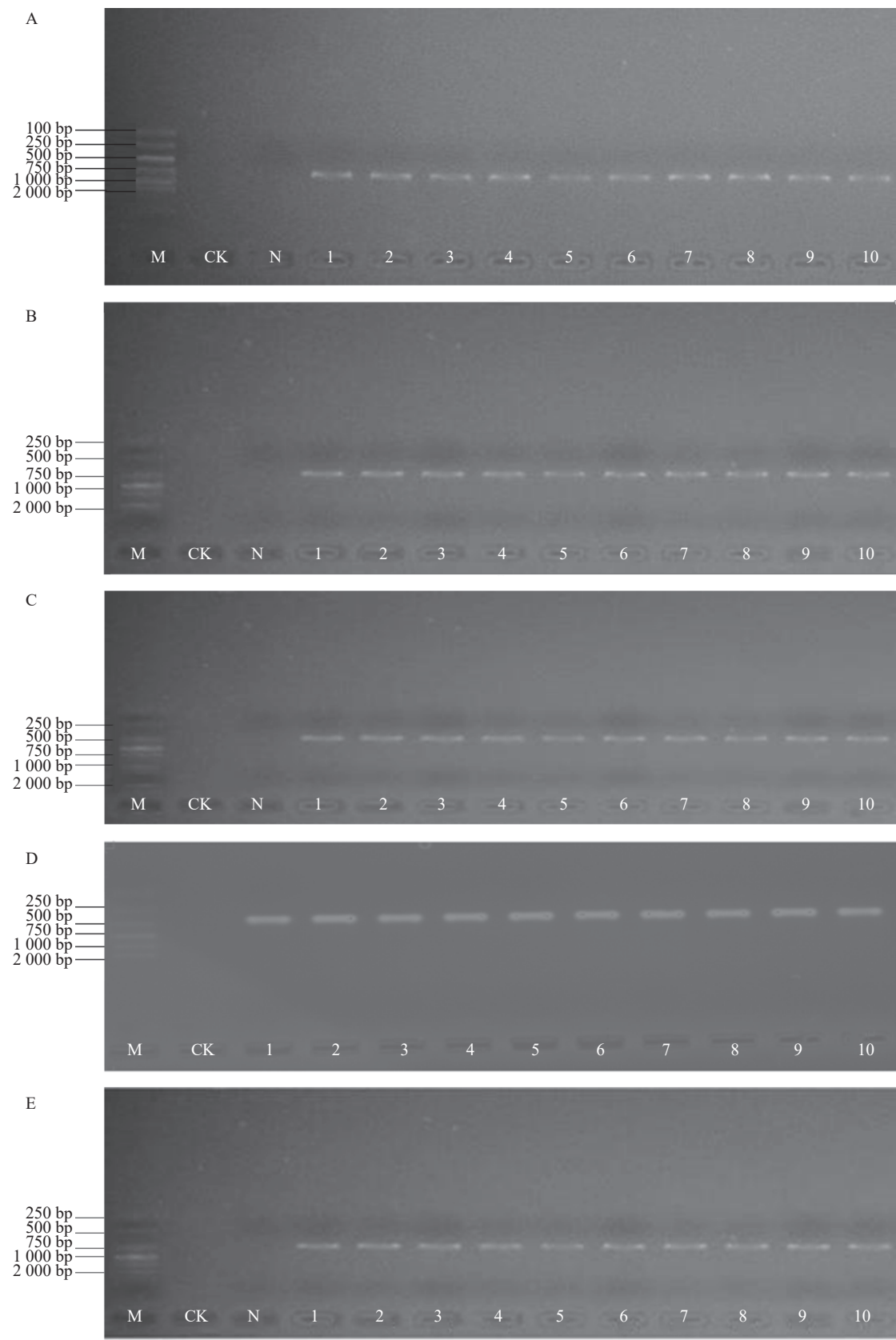
通过对反应体系中不同成分添加量以及反应体系温度及维持时间的组合探索。最终确认的自配反应体系为: 10×PCR Buffer 5 μL, 25 mmol·L⁻¹ MgCl₂ 4 μL, 10 mmol·L⁻¹ dNTPs 1 μL, 10 μmol·L⁻¹ 引物上下游各 2 μL, 5 U·μL⁻¹ Taq DNA 酶 1 μL, 模板 DNA 5 μL, dd H₂O 补足 50 μL。反应程序: 95 ℃, 5 min;

94 ℃ 90 s, 52 ℃ 50 s, 72 ℃ 1 min, 35 个循环; 72 ℃, 5 min, 4 ℃, ∞。建立的方法 PCR 产物电泳图见图 1。结果显示, 西洋参约为 1 000 bp、人参约为 800 bp、枸杞子约为 750 bp、红景天约为 800 bp、铁皮石斛约为 500 bp, 均与预期一致。根据 PCR 反应的基本原理, MgCl₂ 的添加量影响聚合酶的活性, 进而影响扩增物的产量, 由于提取的植物 DNA 模板受到食品生产的深加工影响, 虽浓度达到反应要求, 但糖类或其他生产辅料的残留对反应强度特别是 DNA 骨架的形成造成一定影响。同时, 在一定范围内提高聚合酶作用温度、缩短作用时间, 对摆脱辅料残留对反应的影响有一定的效果。

表 4 不同方法 DNA 提取效果比较
Table 4 DNA extraction by different methods

物种 Species	传统碱裂解SDS法 Traditional alkali cracking method		改良CTAB法 Modified CTAB method		试剂盒法 Kit method	
	纯度	得率	纯度	得率	纯度	得率
	Purity A_{260}/A_{280}	Yield/ (ng·μL ⁻¹)	Purity A_{260}/A_{280}	Yield / (ng·μL ⁻¹)	Purity A_{260}/A_{280}	Yield/ (ng·μL ⁻¹)
西洋参1 American ginseng1	1.35±0.04 c	363±8.19c	1.85±0.04a	814±4.16 a	1.50±0.06b	494±1.53 b
西洋参2 American ginseng 2	1.31±0.03 b	494±6.11 b	1.84±0.03 a	831±10.15 a	1.54±0.04 b	481±5.57 b
西洋参3 American ginseng 3	1.22±0.04 c	424±2.52 c	1.86±0.04 a	865±9.54 a	1.72±0.03b	454±6.56 b
西洋参4 American ginseng 4	1.33±0.04 c	322±5.57 c	2.06±0.10 a	868±3.51 a	1.59±0.03 b	478±6.03 b
西洋参5 American ginseng 5	1.43±0.05 c	422±4.16c	1.94±0.04 a	787±2.65a	1.58±0.23 b	489±8.39 b
人参1 Ginseng1	1.37±0.03 c	315±3.06 c	1.85±0.05a	896±1.00 a	1.45±0.05 b	500±5.86 b
人参2 Ginseng2	1.34±0.04 c	321±9.24 c	1.86±0.04 a	807±2.08 a	1.52±0.02 b	504±1.53 b
人参3 Ginseng3	1.21±0.02 c	322±4.36 c	2.05±0.04 a	853±7.77 a	1.45±0.05 b	481±7.02 b
人参4 Ginseng4	1.32±0.03 c	378±3.79 c	1.84±0.04 a	803±3.51 a	1.46±0.05 b	484±2.52 b
人参5 Ginseng5	1.35±0.04 c	348±5.57 c	1.91±0.06 a	807±5.13 a	1.58±0.06 b	489±2.52 b
枸杞子1 Chinese wolfberry1	1.63±0.03 c	573±4.04 c	2.04±0.05 a	806±2.00 a	1.41±0.04 b	621±9.62 b
枸杞子2 Chinese wolfberry2	1.74±0.02 b	540±6.35 c	1.88±0.03 a	759±4.73 a	1.67±0.05 b	601±1.73 b
枸杞子3 Chinese wolfberry3	1.59±0.06 b	565±0.58 c	1.85±0.03 a	780±5.86 a	1.43±0.05 b	594±1.53 b
枸杞子4 Chinese wolfberry4	1.64±0.03 c	589±3.46 c	1.84±0.04 a	794±3.06 a	1.47±0.06 b	613±9.45 b
枸杞子5 Chinese wolfberry1	1.73±0.03 c	582±4.16 c	1.95±0.04 a	774±2.08 a	1.54±0.04 b	606±5.51 b
铁皮石斛1 Dendrobium candidum1	1.55±0.03 c	362±10.44 c	1.99±0.04 a	827±2.31 a	1.68±0.05 b	499±9.02 b
铁皮石斛2 Dendrobium candidum2	1.52±0.02 c	486±2.08 c	1.86±0.05 a	815±5.51 a	1.66±0.05 b	481±3.46 b
铁皮石斛3 Dendrobium candidum3	1.33±0.03 c	424±5.13 c	1.95±0.04 a	870±3.79 a	1.71±0.07 b	457±5.03 b
铁皮石斛4 Dendrobium candidum4	1.34±0.03 c	320±6.66 c	1.94±0.04 a	858±7.81 a	1.71±0.06 b	479±10.01 b
铁皮石斛5 Dendrobium candidum5	1.47±0.05 c	429±6.51 c	1.90±0.05 a	793±4.73 a	1.64±0.04 b	504±3.51 b
红景天1 Rhodiola1	1.40±0.06 b	382±9.87 c	1.88±0.04 a	886±2.89 a	1.46±0.02 b	512±1.73 b
红景天2 Rhodiola2	1.28±0.07 c	329±5.57 c	1.90±0.06 a	807±5.03 a	1.50±0.07 b	509±4.51 b
红景天3 Rhodiola3	1.25±0.04 c	330±2.52 c	1.98±0.03 a	846±6.08 a	1.62±0.05 b	486±4.04 b
红景天4 Rhodiola4	1.35±0.04 c	383±3.51 c	1.86±0.03 a	800±8.33 a	1.58±0.08 b	490±4.16 b
红景天5 Rhodiola5	1.34±0.04 c	348±8.50 c	1.94±0.04 a	810±5.77 a	1.63±0.06 b	488±8.39 b

同指标数据后小写字母不同表示 0.05 水平上差异显著。
Those with different lowercase letters on same indicator indicate significant difference at 0.05 level.

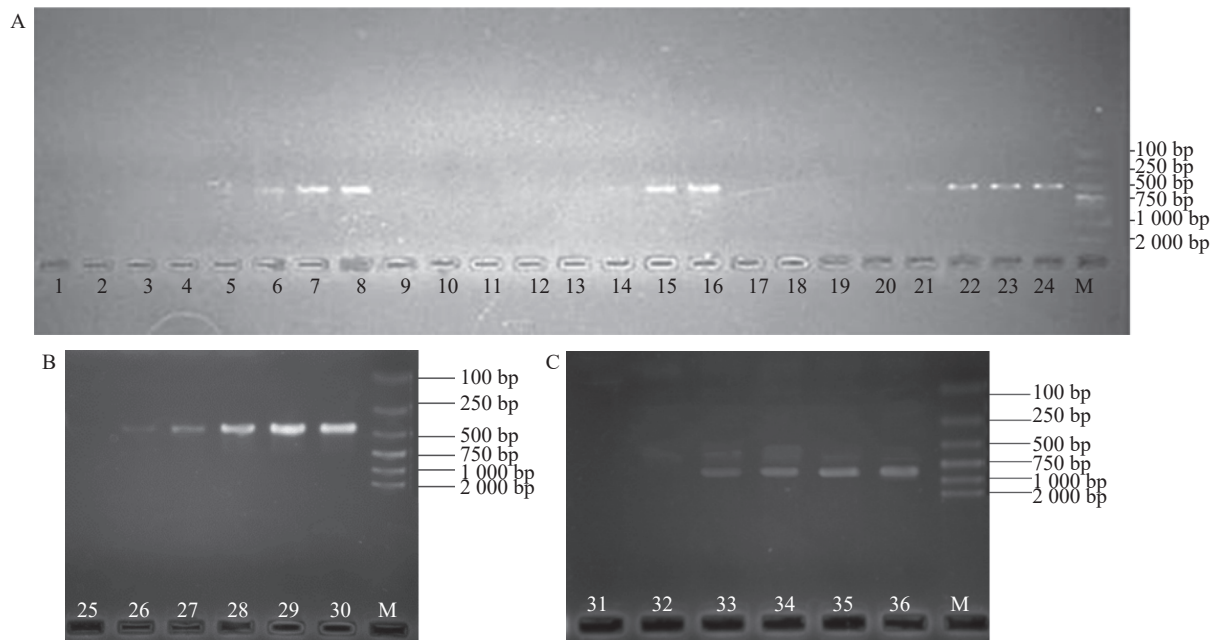


M: DNA Marker;CK:空白; N:阴性对照; A 图 1—10: 西洋参药材; B 图 1-10: 人参药材; C 图 1—10: 枸杞药材; D 图 1-10: 红景天药材; E 图 1-10: 铁皮石斛。
M: DNA marker; CK: blank; N: negative control; Fig. A 1 — 10: American ginseng; Fig. B 1 — 10: ginseng; Fig. C 1 — 10: Chinese wolfberry; Fig. D 1 — 10: rhodiola; Fig. E 1 — 10: *D. candidum*.

图 1 *ITS2* 基因特异片段 PCR 产物电泳图
Fig. 1 Electrophoresis on PCR products of *ITS2* specific fragment

西洋参、铁皮石斛、红景天、枸杞子和人参的方法灵敏度试验结果如图 2 所示, 西洋参、铁皮石斛以及红景天的 DNA 方法灵敏度均为 $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$; 枸

杞子与人参的 DNA 方法灵敏度为 $0.1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。因此, 鉴于在标本药材中 DNA 提取的较优表现, 最终选取改良 CTAB 法作为保健食品的 DNA 提取的主要方法。



M: DNA Marker; 泳道 1—8 为西洋参 DNA 质量浓度, 依次为: 0.01 、 0.1 、 $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$; 泳道 9—16 为铁皮石斛 DNA 质量浓度, 依次为: 0.01 、 0.1 、 $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$; 泳道 17—24 为红景天 DNA 质量浓度, 依次为: 0.01 、 0.1 、 $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$; 泳道 25—30 为枸杞子 DNA 质量浓度, 依次为: 0.01 、 0.1 、 $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$; 泳道 31—36 为人参 DNA 质量浓度, 依次为: 0.01 、 0.1 、 $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。

M: DNA marker; Swimlane No. 1-8: American ginseng DNA mass concentrations at 0.01 , 0.1 , and $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$; Swimlane No. 9-16: *D. candidum* DNA mass concentrations at 0.01 , 0.1 , and $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$; Swimlane No. 17-24: rhodiola DNA mass concentrations at 0.01 , 0.1 , and $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$; Swimlane No. 25-30: Chinese wolfberry DNA mass concentrations at 0.01 , 0.1 , and $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$; Swimlane No. 31-36: ginseng DNA mass concentrations at 0.01 , 0.1 , and $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。

图 2 灵敏度试验结果

Fig. 2 Sensitivity of assay

2.2.2 基于 ITS 基因条形码序列比对的药材植物源性成分的鉴定及系统发育树分析

将 PCR 产物外送测序, 比对其碱基长度与所示条带位置, 并将结果登录中药材条形码鉴定系统 (<http://www.tcmbarcode.cn>), 同时在 GenBank 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 中应用 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 方法进行结果判定, 结果与所采样物种信息吻合, BLAST 结果见图 3。

同时, 进一步对 ITS2 基因构建了基于 K-2-P 距离的 NJ 系统发育树 (图 4), 涉及了本研究的 5 类共 25 种药材, 发育树中涉及的英文名称表述均对照表 1。结果显示, DNA 条形码对所选取的不同物种区分效果明显, 每个物种分别集中在各自的物种分支簇上, 与传统分类学结果相一致。这种相同物种内不同品种的高度聚集性和“树枝”的长短反映了不同物种的亲缘关系远近。说明这 ITS2 基因满足标准 DNA 条形码应具备的良好识别能力, 即不同种群间的特异性、相同种群的一致性以及其他物种的无

重叠性, 适用于保健食品中植物原料的鉴定。

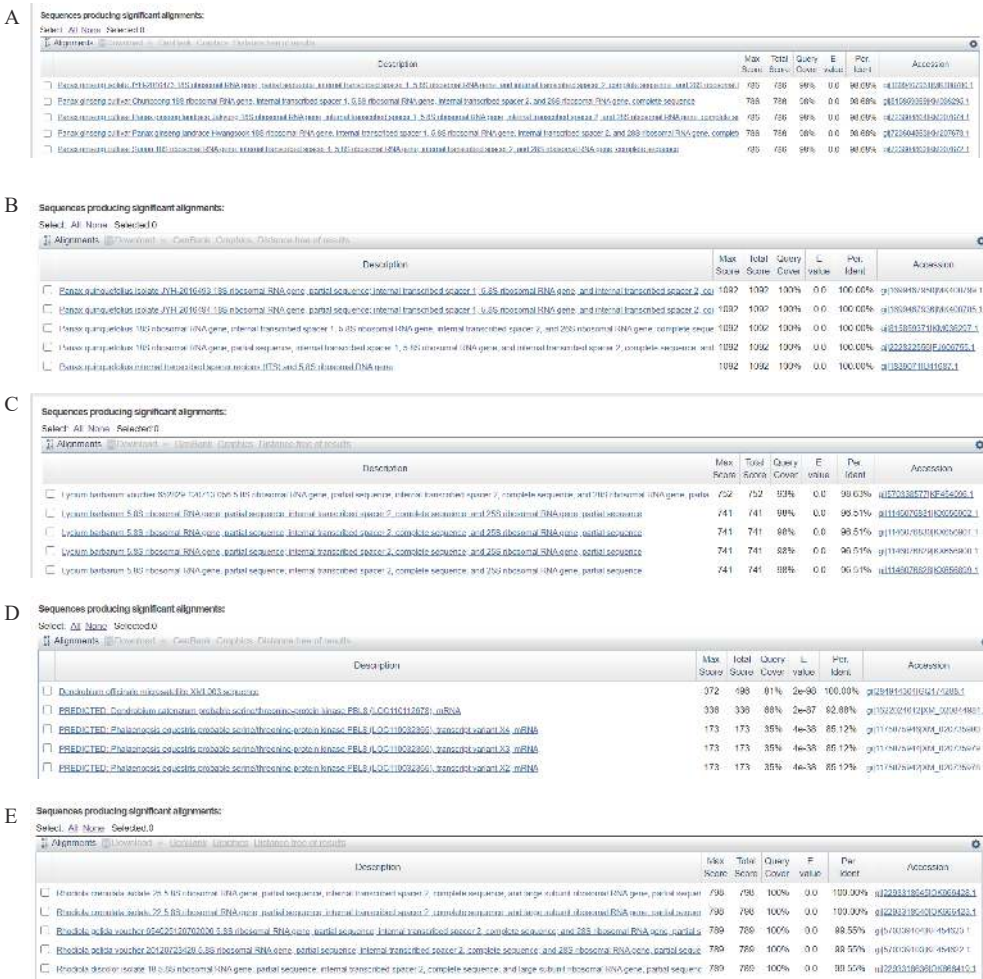
2.3 深加工保健食品中植物源性成分的鉴定

2.3.1 深加工保健食品的 DNA 提取

将前处理后所得产物使用改良 CTAB 法进行 DNA 提取, 结果见表 5。由表 5 可知, 采用改良后的 CTAB 法提取保健食品中 DNA 纯度略有差异, 其中片剂、颗粒剂 (冲剂) 的纯度均在 $1.70 \sim 1.90$, 说明所提基因组 DNA 纯度较高, 含 RNA 和蛋白质这两种干扰性成分较低。其次为胶囊, 纯度在 $1.50 \sim 1.80$, 其原因在于胶囊制剂在加工过程中带入了胶状辅料, 工艺中对于药材的浓缩作用使得植物 DNA 的裂解不充分, 使得提取纯度有所下降。同时, 对液体剂型中 DNA 的提取虽有意加大取样量, 但其 DNA 提取率及其纯度还是不高, 可能与其所含杂质或多糖类物质的干扰多等因素有关。所有研究对象的得率均大于 $200 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 均超过 PCR 反应的最低要求。

2.3.2 供试保健食品的植物源性检测

试验表明以 ITS 通用引物, 采用 2.1.2 所优化的



A, 人参; B, 西洋参; C, 枸杞子; D, 铁皮石斛; E, 红景天。
A: ginseng; B: American ginseng; C: Chinese wolfberry; D: *D. candidum*; E: rhodiola.

图 3 序列 BLAST 比对图

Fig. 3 BLAST comparison on sequences

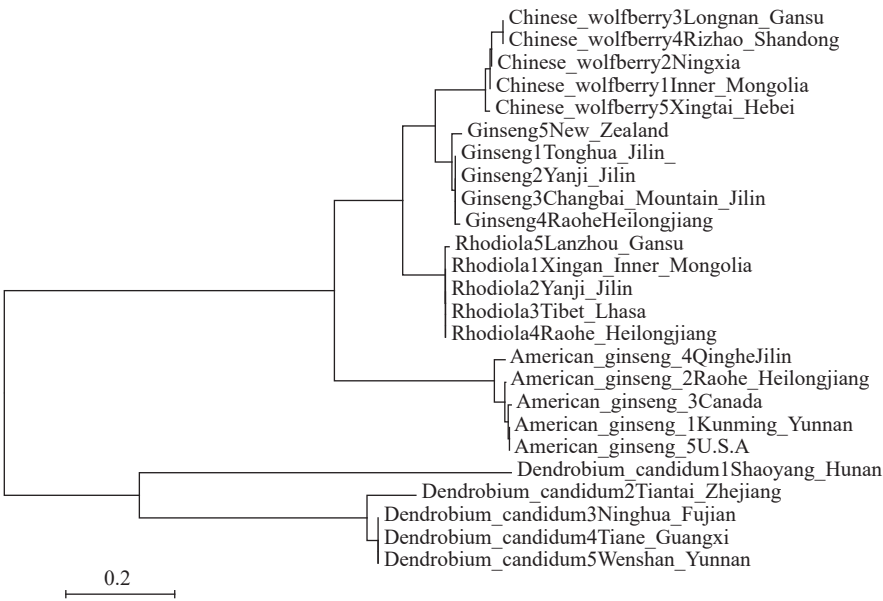
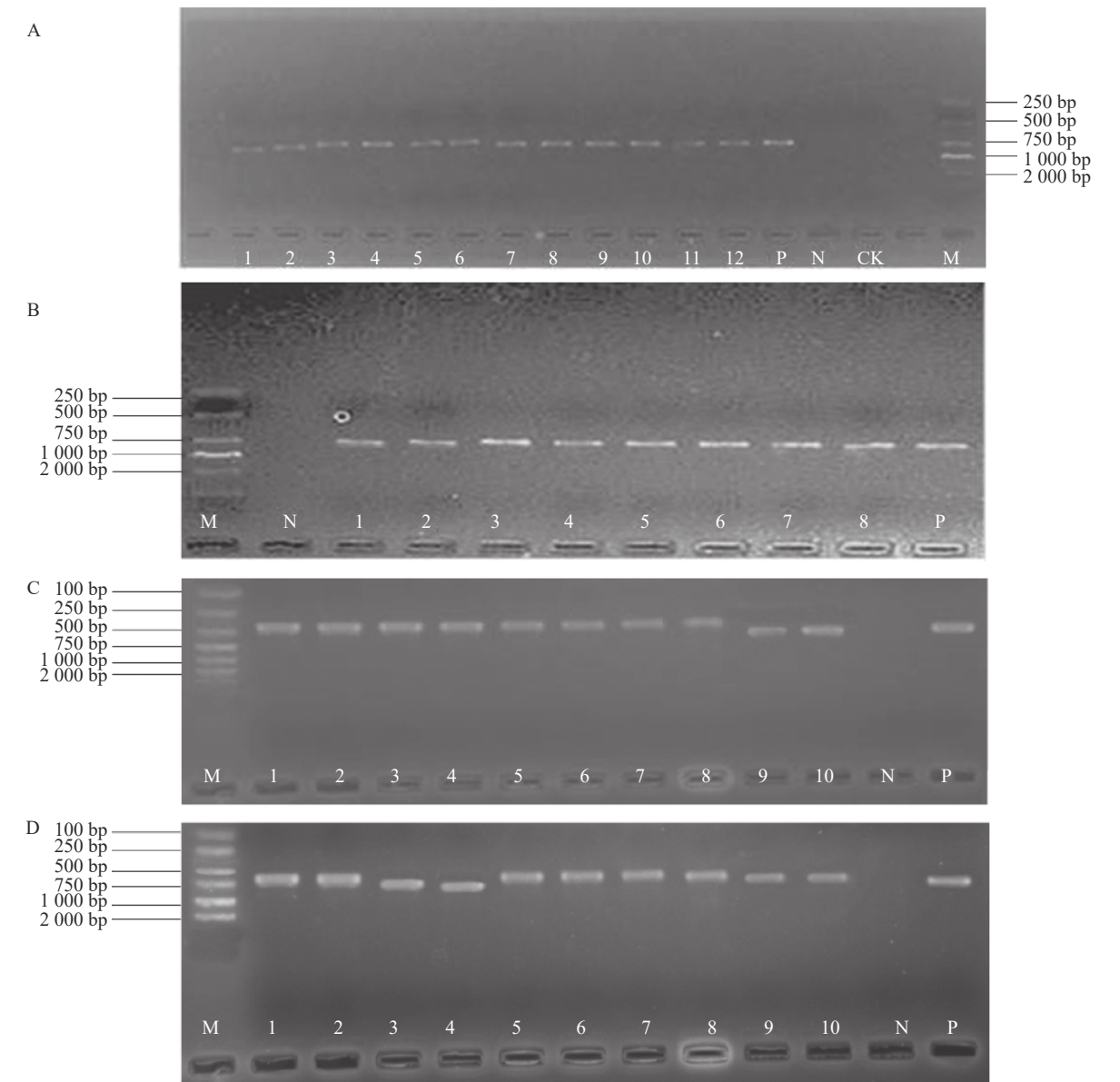


图 4 ITS 2 DNA 条形码植物鉴别 NJ 系统发育树

Fig. 4 Neighbor joining tree of health plant materials constructed using ITS 2 DNA barcodes

表 5 供试保健食品基因组 DNA 的纯度与得率
Table 5 Purity and yield of genomic DNA of health food materials

保健食品编号 Health food No	保健食品名称 Name of health food	配料表宣称所含目标植物 Target plants claimed in the ingredient list	纯度 Purity A_{260}/A_{280}	DNA 质量浓度 DNA concentration/ ($\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)
西洋参供试样1 American ginseng samples 1	西洋参含片 American ginseng buccal tablet	西洋参 American ginseng	1.82	561
西洋参供试样2 American ginseng samples 2	美国洋参含片 American ginseng buccal tablet	西洋参 American ginseng	1.92	497
西洋参供试样3 American ginseng samples 3	西洋参三七胶囊 Panax quinquefolium and panax notoginseng capsules	西洋参 American ginseng	1.54	269
西洋参供试样4 American ginseng samples 4	西洋参淫羊藿枸杞子软胶囊 Panax quinquefolium epimedium and wolfberry fruit soft capsules	西洋参 American ginseng	1.55	341
西洋参供试样5 American ginseng samples 5	西洋参三七口服液 American ginseng and panax notoginseng oral liquid	西洋参 American ginseng	1.37	206
西洋参供试样6 American ginseng samples 1	灵芝西洋参口服液 Ganoderma lucidum and American ginseng oral liquid	西洋参 American ginseng	1.33	219
人参供试样1 Ginseng sample 1	人参提取口服液 Ginseng Extract Oral Liquid	人参 Ginseng	1.37	252
人参供试样2 Ginseng sample 2	人参氨基酸口服液 Ginseng Amino Acid Oral Liquid	人参 Ginseng	1.39	200
人参供试样3 Ginseng sample 3	人参三七含片 Ginseng and Sanqi Buccal Tablets	人参 Ginseng	1.76	578
人参供试样4 Ginseng sample4	人参滴丸 Ginseng dropping pill	人参 Ginseng	1.80	622
枸杞子供试样1 Chinese wolfberry sample 1	杞苓枣氨基酸口服液 Jujube Amino Acid Oral Liquid	枸杞子 Chinese wolfberry	1.52	213
枸杞子供试样2 Chinese wolfberry sample 2	玛咖枸杞胶囊 Maca medlar capsule	枸杞子 Chinese wolfberry	1.56	456
枸杞子供试样3 Chinese wolfberry sample 3	氨基酸枸杞片 Amino acid medlar tablet	枸杞子 Chinese wolfberry	1.90	389
枸杞子供试样4 Chinese wolfberry sample 4	阿胶枸杞颗粒冲剂 Donkey hide gelatin and wolfberry granules	枸杞子 Chinese wolfberry	1.79	420
铁皮石斛供试样1 Dendrobium candidum sample1	森山铁皮枫斗颗粒 Senshan Iron Sheet Granules	铁皮石斛 Dendrobium candidum	1.84	565
铁皮石斛供试样2 Dendrobium candidum sample2	九仙尊米斛枫斗浆 Nine Immortals Zun Rice Dendrobium Maple Juice	铁皮石斛 Dendrobium candidum	1.97	500
铁皮石斛供试样3 Dendrobium candidum sample3	铁皮枫斗口服液 Dendrobium candidum oral liquid	铁皮石斛 Dendrobium candidum	1.66	270
铁皮石斛供试样4 Dendrobium candidum sample4	津玉石斛口服液 Jinyu Dendrobium Oral Liquid	铁皮石斛 Dendrobium candidum	1.54	339
铁皮石斛供试样5 Dendrobium candidum sample5	铁皮石斛西洋参黄芪胶囊 Dendrobium candidum, American ginseng and astragalus capsule	铁皮石斛 Dendrobium candidum	1.36	205
红景天供试样1 Rhodiola sample1	红景天软胶囊 Rhodiola Soft Capsule	红景天 Rhodiola	1.38	220
红景天供试样2 Rhodiola sample2	红景天西洋参口服液 Rhodiola and American Ginseng Oral Liquid	红景天 Rhodiola	1.40	252
红景天供试样3 Rhodiola sample3	红景天提取物口服液 Rhodiola extract oral liquid	红景天 Rhodiola	1.53	403
红景天供试样4 Rhodiola sample4	红景天胶囊 Rhodiola Capsule	红景天 Rhodiola	1.77	580
红景天供试样5 Rhodiola sample5	圣莲红景天丸 Shenglian Rhodiola Capsule	红景天 Rhodiola	1.85	625



M: DNA Marker; CK: 空白对照; N: 阴性对照; P: 阳性对照; A1—12: 西洋参供试样品; B1—8: 人参供试样品; C1—10: 铁皮石斛供试样品; D1—10: 红景天供试样品。

M: DNA marker; CK: blank; N: negative control; A1-12: American ginseng samples; B1-8: ginseng samples; C1-10: *D. candidum* samples; D1-10: rhodiola samples.

图 5 部分供试保健食品样品 ITS2 基因 PCR 产物电泳图

Fig. 5 Electrophoresis on PCR products of ITS2 genes in some health food products

体系及反应条件的 PCR 扩增效果良好，以大肠埃希氏菌（ATCC 25922）作为阴性对照、无菌超纯水和提取空白产物作为空白对照均未扩增，以相应的标本药用植物 DNA 作为阳性对照均出现了扩增。所有样品中的 18S 内参基因和 ITS2 基因均出现扩增。同时，部分 ITS2 基因 PCR 产物出现了条带位置的差异见图 5。每种保健食品均进行了平行试验，部分供试保健食品源性检测对照表见表 6。

结合 PCR 产物电泳图，可以得到使用改良 CTAB 法对所选取的配料表标称为：人参、枸杞子、西洋参、铁皮石斛、红景天为主要原料的保健食品进行

提取的 DNA，在 ITS2 基因的反应中，均获得较为良好的扩增。说明研究所确定的提取方法和反应体系适合选取保健食品中植物源性成分的提取。而在对应的源性成分鉴定中，所选取的部分剂型的保健食品的扩增条带位置存在差异，这一现象在口服液产品中出现的概率较大，占所选取口服液产品数量的 50%，说明在产品中存在使用了其他植物原料的可能。随后，将 PCR 产物外送测序，将测序通过 GenBank 数据库做 BLAST 比对，同时登录中药材 DNA 条形码数据库做相似性对比，结果如表 7 所示。

由表 7 可以看出，BLAST 比对结果与药材 DNA

表 6 部分供试保健食品源性检测对照表
Table 6 Origins of some health food products

保健食品编号 Health food No	保健食品名称 Name of health food	PCR产物电泳图及泳道编号 Electrophoresis diagram and Swimlane No of PCR products
西洋参供试样3 American ginseng samples 3	西洋参三七胶囊 Panax quinquefolium and panax notoginseng capsules	图5A, 泳道编号5、6 Fig.5A, Swimlane No 5、6
西洋参供试样5 American ginseng samples 5	西洋参三七口服液 American ginseng and panax notoginseng oral liquid	图5A, 泳道编号9、10 Fig.5A, Swimlane No 9、10
人参供试样1 Ginseng sample 1	人参提取口服液 Ginseng Extract Oral Liquid	图5B, 泳道编号1、2 Fig.5B, Swimlane No 1、2
铁皮石斛供试样2 Dendrobium candidum sample2	九仙尊米斛枫斗浆 Nine Immortals Zun Rice Dendrobium Maple Juice	图5C, 泳道编号3、4 Fig.5C, Swimlane No 3、4
铁皮石斛供试样3 Dendrobium candidum sample3	铁皮枫斗口服液 Dendrobium candidum oral liquid	图5C, 泳道编号5、6 Fig.5C, Swimlane No 5、6
红景天供试样1 Rhodiola sample1	红景天软胶囊 Rhodiola Soft Capsule	图5D, 泳道编号1、2 Fig.5D, Swimlane No 1、2
红景天供试样3 Rhodiola sample3	红景天提取物口服液 Rhodiola extract oral liquid	图5D, 泳道编号5、6 Fig.5D, Swimlane No 5、6

表 7 供试保健食品基因组测序比对结果
Table 7 Genome sequences of health food products

保健食品名称 Name of health food	配料表宣称 所含目标植物 Target plants claimed in the ingredient list	GenBank数据库 GenBank Database			中药材 DNA条形码数据库 DNA Barcode Database of Chinese Medicinal Materials		
		BLAST鉴定结果 BLAST identification results	相似度 Similarity/%	GenBank登录号 GenBank Login Number	最佳匹配 Best Fit	序列相似度 Sequence similarity/%	Score值 Score value
西洋参含片 American ginseng buccal tablet	西洋参 American ginseng	西洋参 American ginseng	99	HQ112440.1	西洋参 American ginseng	100.0	470.0
美国洋参含片 American ginseng buccal tablet	西洋参 American ginseng	西洋参 American ginseng	97	MG217889.1	西洋参 American ginseng	98.5	410.0
西洋参三七胶囊 Panax quinquefolium and panax notoginseng capsules	西洋参 American ginseng	党参 Codonopsis pilosula	98	EF190460	党参 Codonopsis pilosula	98	403.0
西洋参淫羊藿枸杞子软胶囊 Panax quinquefolium epimedium and wolfberry fruit soft capsules	西洋参 American ginseng	西洋参 American ginseng	97	KM036297.1	西洋参 American ginseng	99.1	460.0
西洋参三七口服液 American ginseng and panax notoginseng oral liquid	西洋参 American ginseng	生晒参 Raw sun dried ginseng	99	HQ112363.1	生晒参 Raw sun dried ginseng	97.6	425.0
灵芝西洋参口服液 Ganoderma lucidum and American ginseng oral liquid	西洋参 American ginseng	西洋参 American ginseng	99	MG217889.1	西洋参 American ginseng	100.0	440.0
人参提取口服液 Ginseng Extract Oral Liquid	人参 Ginseng	竹节参 Panax japonicus	98	KX674924.1	竹节参 Panax japonicus	99.7	435.0
人参氨基酸口服液 Ginseng Amino Acid Oral Liquid	人参 Ginseng	人参 Ginseng	99	EU592017.1	人参 Ginseng	97.4	447.0
人参三七含片 Ginseng and Sanqi Buccal Tablets	人参 Ginseng	人参 Ginseng	100	MG218783.1	人参 Ginseng	100.0	445.0
人参滴丸 Ginseng dropping pill	人参 Ginseng	人参 Ginseng	100	MG283292.11	人参 Ginseng	100.0	448.0
杞苓枣氨基酸口服液 Jujube Amino Acid Oral Liquid	枸杞子 Chinese wolfberry	枸杞子 Chinese	98	JQ320160	枸杞子 Chinese wolfberry	99.8	412.0

续上表

保健食品名称 Name of health food	配料表宣称 所含目标植物 Target plants claimed in the ingredient list	GenBank数据库 GenBank Database		中药材 DNA条形码数据库 DNA Barcode Database of Chinese Medicinal Materials		
		BLAST鉴定结果 BLAST identification results	相似度 Similarity/%	GenBank登录号 GenBank Login Number	最佳匹配 Best Fit	序列相似度 Sequence similarity/% Score值 Score value
玛咖枸杞胶囊 Maca medlar capsule	枸杞子 Chinese wolfberry	枸杞子 Chinese	99	JQ320155	枸杞子 Chinese wolfberry	99.4 410.0
氨基酸枸杞片 Amino acid medlar tablet	枸杞子 Chinese wolfberry	枸杞子 Chinese	99	JQ320172	枸杞子 Chinese wolfberry	100.0 415.0
阿胶枸杞颗粒冲剂 Donkey hide gelatin and wolfberry granules	枸杞子 Chinese wolfberry	枸杞子 Chinese	98	JQ320160	枸杞子 Chinese wolfberry	98.9 416.0
森山铁皮枫斗颗粒 Senshan Iron Sheet Granules	铁皮石斛 Dendrobium candidum	铁皮石斛 Dendrobium candidum	97	YQ76839	铁皮石斛 Dendrobium candidum	98.7 457.0
九仙尊米斛枫斗浆 Nine Immortals Zun Rice Dendrobium Maple Juice	铁皮石斛 Dendrobium candidum	金钗石斛 Dendrobium nobile	98	UJ89765	金钗石斛 Dendrobium nobile	99.8 461.0
铁皮枫斗口服液 Dendrobium candidum oral liquid	铁皮石斛 Dendrobium candidum	铁皮石斛 Dendrobium candidum	99	YQ82313	铁皮石斛 Dendrobium candidum	100.0 452.0
津玉石斛口服液 Jinyu Dendrobium Oral Liquid	铁皮石斛 Dendrobium candidum	铁皮石斛 Dendrobium candidum	97	YQ78411	铁皮石斛 Dendrobium candidum	100.0 459.0
铁皮石斛西洋参黄芪胶囊 Dendrobium candidum, American ginseng and astragalus capsule	铁皮石斛 Dendrobium candidum	矩唇石斛 Dendrobium linawianum	99	QD53678	矩唇石斛 Dendrobium linawianum	98.2 423.0
红景天软胶囊 Rhodiola Soft Capsule	红景天 Rhodiola	红景天 Rhodiola	99	AY545716	红景天 Rhodiola	98.6 480.0
红景天西洋参口服液 Rhodiola and American Ginseng Oral Liquid	红景天 Rhodiola	轮叶景天 Sedum chauveaudii	100	EU592006	轮叶景天 Sedum chauveaudii	99.4 458.0
红景天提取物口服液 Rhodiola extract oral liquid	红景天 Rhodiola	红景天 Rhodiola	98	AB088628	红景天 Rhodiola	99.6 477.0
西洋参含片 American ginseng buccal tablet	红景天 Rhodiola	珠芽景天 Sedum bulbiferum	97	AY352897	珠芽景天 Sedum bulbiferum	98.7 481.0
美国洋参含片 American ginseng buccal tablet	红景天 Rhodiola	红景天 Rhodiola	98	AY545712	红景天 Rhodiola	99.0 469.0

Score: 离散匹配数值。
Score: Discrete matching value.

条形码数据库的结果保持一致。从结果来看，在所选取的 24 中保健食品中，有 7 种产品其宣称的主要使用的中药材与鉴定结果不一致，主要是以党参、生晒参替代西洋参，以竹节参替代人参，以金钗石斛、矩唇石斛替代铁皮石斛，以轮叶景天、珠芽景天代替红景天。

3 讨论

保健食品其产生的初衷，是为了方便大众较为便捷地从所选需原料中获取有益或有效成分，生产过程中在提取获得有效成分的同时，为保持稳定性状或优化口感添加了必要的辅料作为补充，这对 DNA 的提取存在不可忽视的影响。传统 CTAB 法即可用于裂解细胞，同时还能够有效的沉淀多糖，是

一种较为合适的提取基础方法。近年多有将该提取方法运用于转基因大豆或转基因玉米深加工产品的研究中^[14-15]。但由于保健食品中每种剂型得到的 DNA 纯度不同，伴随淀粉或糊精等成分与 CTAB 在加热条件下反应生成高极性富含正电荷的复合物，从而影响了 DNA 的沉淀效果。

本研究主要从口服液、片剂、胶囊剂、颗粒剂等常见剂型入手，通过增加必要的前处理流程，并通过试剂摸索，改良了 CTAB 提取法，而后建立 PCR 反应体系，针对保健食品中植物性原料源性成分开展基于基因条码技术的分子生物学鉴定，特别是首次开发针对保健食品不同剂型的 DNA 提取技术，并通过建立稳定高效的检测方法，可以实现对保健食品中植物性原料的鉴定，具有重大的创新与

应用价值。而 BLAST 是基于局部序列比对算法的搜索工具,由美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 开发和管理的一套生物大分子一级结构序列比对程序。程序可将输入的核酸碱基或蛋白质氨基酸序列与数据库中的已知来源序列进行比对,输出序列之间的同源性信息,从而辅助判断输入的序列来源或与已知序列的进化关系;而中药材 DNA 条形码数据库是一个适用于中药材物种鉴定的 DNA 条形码,通俗来讲,就是为中药材量身定做的“基因身份证”,本研究基于基因条码技术建立的保健食品中植物源性成分的鉴定技术的结果能与国际通用的 BLAST 对比较为准确的对应。该方法在不同剂型保健食品中具有一定通用性,只需选用一个或少数几个基因片段即可对植物源性进行准确鉴定;鉴定过程快速,重复性和稳定性高;实验过程标准、操作简单,并能有效缓解分类鉴定人才缺乏的现状。

近年来,保健食品中运用基因条码技术中的研究的主要方向趋于病原微生物,相关报道中阐述了保健食品微生物限度检查中病原微生物鉴定和溯源分析的过程和方法^[16],在针对生产工艺中间过程控制的研究也运用荧光定量 PCR 技术对其中微生物分布和溯源做相关分析^[17],而尚未将其运用于保健食品中植物源性的检测。在保健食品的鉴定方面,开展的分析多以非法添加鉴定为研究代表,尤其以高效液相色谱串联质谱法为代表的保健食品非法添加物检测技术报道较多^[18],例如保健品中非法添加小檗碱的鉴定^[19],以及减肥类中成药及保健食品中胡椒碱探究其鉴定及检测技术^[20]。本研究成果能有效克服传统检验理论瓶颈,开发便捷的检验检测方法,加快有关部门出台相关检测规范运用于产品监管,为提升政府职能部门的工作效能提供有效途径和技术支撑。鉴于现代化学工业在物质合成及提取技术上愈发成熟,方法在后续的开发上应继续优化提取方法步骤,开发出更适用于保健食品的试剂盒产品,并将提取方法拓展到剩余剂型。同时,伴随分子生物学技术特别是荧光定量 PCR 技术的发展,已有学者使用 RT-PCR 法探究植物真实属性的研究^[21],表明了研究出更高特异性的检测方法是顺势所趋,可使得特异性与及时性在探究保健食品中植物源性鉴定中产生质的飞跃。

参考文献:

- [1] 赵晋燕,胡宇驰,曹春然,等. 中药复方保健产品安全性评价体系的要素探讨 [J]. 中华中医药杂志, 2022, 37 (9): 5013-5018.
ZHAO J Y, HU Y C, CAO C R, et al. Discussion on elements of safety

evaluation system of compound Chinese medicine health care products [J]. *China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy*, 2022, 37 (9): 5013-5018. (in Chinese)

- [2] 曾清银. 浅论保健食品与健康养生的关系和解决途径 [J]. 食品安全导刊, 2020 (20): 64.
ZENG Q Y. On the relationship between health food and health preservation and its solutions [J]. *China Food Safety Magazine*, 2020 (20): 64. (in Chinese)
- [3] 刘杰,张翔,张卫华. 1996—2012年国内注册保健食品状况分析 [J]. 食品工业, 2015, 36 (10): 242-244.
LIU J, ZHANG X, ZHANG W H. Analysis of the domestic health care products registered in 1996-2012 in domestic [J]. *The Food Industry*, 2015, 36 (10): 242-244. (in Chinese)
- [4] 束云,刘长喜,李连达. 中国已获批准的保健食品现状分析 [J]. 中国食品卫生杂志, 2006, 18 (5): 401-405.
SHU Y, LIU C X, LI L D. Study on present situation of certified native functiona food products in China [J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2006, 18 (5): 401-405. (in Chinese)
- [5] 黄卫东. 中国已获批准的保健食品状况分析 [J]. 昆明学院学报, 2011, 33 (6): 121-122,126.
HUANG W D. Study on present situation of certified native functional food products in China [J]. *Journal of Kunming University*, 2011, 33 (6): 121-122,126. (in Chinese)
- [6] Agilent Technologies Inc. Agilent Technologies Presents Thought Leader Award to Renowned Medicinal Scientist in China [J]. *Journal of Technology & Science*, 2016, 19 (7): 324-325,328.
- [7] GUO L L, SUI Z H, ZHANG S, et al. Comparison of potential diatom 'barcode' genes (the 18S rRNA gene and ITS, COI, rbcL) and their effectiveness in discriminating and determining species taxonomy in the Bacillariophyta[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2015, 65(Pt 4): 1369-1380.
- [8] QUARESMA A, BRODSCHNEIDER R, GRATZER K, et al. Preservation methods of honey bee-collected pollen are not a source of bias in ITS2 metabarcoding [J]. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2021, 193 (12): 785.
- [9] CHENG L, LIN Z Q, XIN C R, et al. Molecular identification and phylogenetic analysis of *Papaver* based on ITS2 barcoding [J]. *Journal of Forensic Sciences*, 2022, 67 (2): 712-719.
- [10] ZHOU T T, JIANG W, WANG H Z, et al. DNA barcoding of Naididae (Annelida, Oligochaeta), based on cytochrome C oxidase gene and ITS2 region in China [J]. *Biodiversity Data Journal*, 2021, 9: e73556.
- [11] 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): 747-754.
CHEN S L, PANG X H, YAO H, et al. Identification system and perspective for DNA barcoding traditional Chinese materia Medica [J]. *World Science and Technology (Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica)*, 2011, 13 (5): 747-754. (in Chinese)
- [12] SHI R X, HU Z G, LU H, et al. Hierarchical nanostructuring array enhances mid-hybridization for accurate herbal identification via ITS2

- DNA barcode [J]. *Analytical Chemistry*, 2020, 92 (2): 2136–2144.
- [13] 李庆, 金润浩, 姜国哲, 等. 2006—2015年我国已注册保健食品现状分析 [J]. *食品科学*, 2017, 38 (3): 292–298.
- LI Q, JIN R H, JIANG G Z, et al. State of the art of registered health foods in China during 2006 to 2015 [J]. *Food Science*, 2017, 38 (3): 292–298. (in Chinese)
- [14] 武林琳. 两种转基因大豆基因组DNA提取方法的比较 [J]. *现代农村科技*, 2022 (3): 60–62.
- WU L L. Comparison of two methods for extracting genomic DNA from transgenic soybean [J]. *Xiandai Nongcun Keji*, 2022 (3): 60–62. (in Chinese)
- [15] 王辉, 赵爱君, 张全军. 转基因玉米深加工产品中DNA提取方法的研究 [J]. *农产品加工*, 2022 (3): 38–41.
- WANG H, ZHAO A J, ZHANG Q J. Study on DNA extraction method in transgenic maize products [J]. *Farm Products Processing*, 2022 (3): 38–41. (in Chinese)
- [16] 郭芯岐, 潘建文. 保健食品中病原微生物的鉴定和溯源分析 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11 (1): 91–94.
- GUO X Q, PAN J W. Identification and traceability analysis of pathogenic microorganism isolated from healthy food [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2020, 11 (1): 91–94. (in Chinese)
- [17] 张依钰, 陈玲, 郑钰清, 等. 胶囊剂型保健食品生产过程微生物分布和溯源分析 [J]. *现代食品科技*, 2022, 38 (8): 89–96.
- ZHANG Y Y, CHEN L, ZHENG Y Q, et al. Microbial distribution and traceability analysis in the production of capsule-type health food products [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2022, 38 (8): 89–96. (in Chinese)
- [18] 高晋梅, 段琼, 马春艳, 等. 保健食品非法添加物检测技术研究进展 [J]. *中国酿造*, 2021, 40 (9): 19–24.
- GAO J M, DUAN Q, MA C Y, et al. Research progress on detection technology of illegal additives in health food [J]. *China Brewing*, 2021, 40 (9): 19–24. (in Chinese)
- [19] 徐硕, 徐文峰, 金鹏飞, 等. 保健品中非法添加小檗碱的鉴定 [J]. *中国药师*, 2022, 25 (2): 373–377.
- XU S, XU W F, JIN P F, et al. Identification of berberine illegally added to health foods [J]. *China Pharmacist*, 2022, 25 (2): 373–377. (in Chinese)
- [20] 张珊珊, 张萍, 闵春艳, 等. 减肥类中成药及保健食品中胡椒碱的鉴定及检测 [J]. *中国药师*, 2022, 25 (1): 194–197.
- ZHANG S S, ZHANG P, MIN C Y, et al. Identification and determination of piperine added to slimming traditional Chinese medicine and health foods [J]. *China Pharmacist*, 2022, 25 (1): 194–197. (in Chinese)
- [21] 张田, 陈娇, 蒋瑞平, 等. *TaqMan-MGB*实时荧光PCR法检测太白贝母及其近缘种的研究 [J]. *药学报*, 2021, 56 (9): 2577–2583.
- ZHANG T, CHEN J, JIANG R P, et al. Identification of *Fritillaria taibaiensis* and its relatives by real-time PCR with a *TaqMan-MGB* probe [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2021, 56 (9): 2577–2583. (in Chinese)

(责任编辑: 林海清)