

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 5131—2019

人 参 鉴 定 方 法

Identification method of *Panax ginseng* C.A.Meyer

行业标准信息服务平台

2019-09-03 发布

2020-03-01 实施

中华人民共和国海关总署 发布

前 言

本标准依据国标 GB/T 1.1—2009 起草编制。

本标准由中华人民共和国海关总署提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国重庆海关、中华人民共和国大连海关、中国医学科学院药用植物研究所。

本标准起草人：孙涛、孔德英、滕少娜、蒋丹、邓朝晖、姚辉。

行业标准信息服务平台

人 参 鉴 定 方 法

1 范围

本标准规定了人参的 DNA 条形码检测鉴定方法。

本标准适用于中药材人参、饮片及其基原植物的检验鉴定,不适用于提取不到核酸的深加工产品和粉末混合物。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅所注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

DNA 条形码 DNA barcode

DNA 条形码是指生物体内能够代表该物种的,标准的、有足够变异的、易扩增且相对较短的 DNA 片段。

3.2

内转录间隔区 Internal Transcribed Spacer; ITS

真核生物基因组中编码核糖体的基因包括 28S rDNA、5SrDNA、18S rDNA 和 5.8S rDNA 4 种,它们在染色体上头尾相连、串联排列,相互之间由间隔区分隔。其中 18S、5.8S 和 28SrDNA 基因组成一个转录单元。三者高度保守,适合于较高等级水平的生物群体间的系统分析,其间的间隔区为内转录间隔区(Internal Transcribed Spacer, ITS),由 ITS1-5.8S-ITS2 组成,由于进化相对迅速而具多态性,ITS2 序列被推荐为药用植物 DNA 条形码序列用于系统学研究。

4 人参基本信息

中文名:人参

学名:*Panax ginseng* C.A.Meyer

五加科(Araliaceae)人参属(*Panax* L.)。

《中国药典》(2010 版)描述人参本品为五加科植物人参 *Panax ginseng* C.A.Mey. 的干燥根和根茎。多于秋季采挖,洗净经晒干或烘干。栽培的俗称“园参”;播种在山林野生状态下自然生长的称“林下山参”,习称“籽海”。

人参的其他资料参见附录 A。

5 方法原理

采用 DNA 条形码标准方法流程,以 ITS2 序列为条码基因,将样品进行 DNA 提取—PCR 扩增—测序—BLAST 比对分析,根据人参的 ITS2 序列特征,对样品进行鉴定。

6 仪器用具和试剂

6.1 仪器

PCR 扩增仪、紫外分光光度仪、电泳仪、凝胶成像系统、高速冷冻离心机、烘箱、高压灭菌锅、电子天平(感量 1/1 000)、球磨机或研钵、水浴锅、纯水仪、涡旋振荡器、冰箱、微量移液器(2 μ L, 10 μ L, 20 μ L, 100 μ L, 200 μ L, 1 000 μ L)、1.5 mL 离心管、0.2 mL PCR 反应管。

6.2 主要试剂

除另有规定外,所有试剂均为分析纯或生化试剂。实验用水应符合 GB/T 6682 要求。

CTAB 提取液、Tris 饱和酚、氯仿、异戊醇、异丙醇、75%乙醇、95%乙醇、RNase A、液氮、10 \times PCR 缓冲液、脱氧核糖核苷三磷酸(dNTPs)、*ExTaq* 聚合酶、引物(见表 1)、DNA Marker、琼脂糖、溴化乙锭(EB)。

7 检测方法

7.1 样品的处理

除特殊标明外,样品使用 75%酒精擦洗表面后晾干。

7.2 DNA 提取

见附录 B。

7.3 DNA 纯度与浓度的测定

用核酸蛋白分析仪测定 DNA 的纯度与浓度,分别取得 260 nm 和 280 nm 处的吸收值,计算核酸的纯度和浓度,计算公式如下:

$$\text{DNA 纯度} = \text{OD}_{260} / \text{OD}_{280}$$

$$\text{DNA 浓度} = 50 \times \text{OD}_{260} \mu\text{g/mL}$$

PCR 级 DNA 溶液的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值应为 1.7~1.9。

7.4 PCR 检测

7.4.1 引物

人参 DNA 条形码方法鉴定 PCR 扩增引物序列见表 1。

表 1 引物序列

目标基因	引物名称	序列	条带大小
ITS2	ITS2F	ATGCGATACTTGGTGTGAAT	500 bp
	ITS3R	GACGCTTCTCCAGACTACAAT	

7.4.2 反应体系

反应体系见表 2。

表 2 反应体系

试剂名称	PCR 反应体系终浓度
10×PCR 缓冲液(不含 Mg ²⁺)	1×PCR 缓冲液
MgCl ₂ 溶液	2 mmol/L/L
dNTPs	0.2 mmol/L/L
正向引物和反向引物	各 0.2 umol/L/L
Taq 酶	1 U
DNA 模板	20 ng~40 ng
双蒸水	补足反应总体积到 25 μL

注：也可用市售 PCR 预混液进行体系配制，反应体系参照说明书进行。

7.4.3 反应条件

反应条件见表 3。

表 3 反应条件

步骤	反应温度(℃)	时间	循环数
预变性	94	5 min	—
变性	94	30 S	40
退火	56	30 S	
延伸	72	45 S	
延伸	72	10 min	—

7.4.4 琼脂糖凝胶电泳

取 5 μL PCR 产物，用 1.5~2%的琼脂糖凝胶进行电泳(5 V/cm 电压)，EB 染色，用凝胶成像系统观察、拍照。将剩余 PCR 产物进行双向测序。

7.4.5 序列分析

7.4.5.1 完整 ITS2 序列的获得

利用序列分析软件对测序结果进行拼接，去除两端 5.8S 和 28S 区段获得完整的 ITS2 序列，具体操作方法见附录 C。人参的完整 ITS2 序列长度为 230 bp。

7.4.5.2 序列比对分析

登陆 NCBI(美国国立生物技术信息中心)BLAST 鉴定系统(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)，通过比对查询相似度最高的物种，具体操作见附录 D。

8 结果判定

样品序列比对结果与人参的序列具有最高的相似性,为 100%,则判定该试样为人参或检出人参成分;

样品序列比对结果与人参的序列不是 100%,则判定该试样不是人参或未检出人参成分。

9 标本与原始数据保存

9.1 标本保存

样本应注明来源、时间、地点及鉴定者等信息,保存期为 1 年,以备复验,如涉及到贸易纠纷则须保存到纠纷解决完毕。保存期满后,按后期用途长久保存或处理。

9.2 原始数据保存

样品检测结束后,其原始记录单和检验报告或证书须归档,妥善保管,以备复验、谈判和仲裁。

行业标准信息平台

附 录 A
(资料性附录)
人参其他信息

A.1 人参常见近似种及其伪混品

近似种:西洋参(*Panax quinquefolius*)、三七(*P. notoginseng*)、疙瘩七(*P. bipinnatifidus*)、竹节参(*P. japonicus*)、假人参(*P. pseudoginseng*)等。

伪混品:轮叶沙参(*Adenophora tetraphylla*)、桔梗(*Platycodon grandiflorus*)、商路(*Phytolacca acinosa*)、紫茉莉(*Mirabilis jalapa*)等。

A.2 人参(*Panax ginseng*) ITS2 基因序列(GenBank accession No. KM036295.1)

CGCATCGCGTCGCCCCCAACCCATCACTCCCTTGCGGGAGTTGAGGCGGAGGGGCGGA
TAATGGCCTCCCGTGTCTCACCGCGCGGTTGGCCCAAATGCGAGTCCTTGGCGATGGACGTC
ACGACAAGTGGTGGTTGTAAAAAGCCCTCTTCTCATGTCGTGCGGTGACCCGTCGCCAGCA
AAAGCTCTCATGACCCTGTTGCGCCGTCTCGACGTGCGCTCCGACCG

A.3 西洋参(*Panax quinquefolius*) ITS2 基因序列(GenBank accession No. GU213487.1)

CGCATCGCGTCGCCCCCAACCCATCACTCCCTTGGCGGGAGTCGAGGCGGAGGGGCGGA
TAATGGCCTCCCGTGTCTCACCGCGCGGTTGGCCCAAATGCGAGTCCTTGGCGATGGACGTC
ACGACAAGTGGTGGTTGTAAAAAGCCCTCTTCTCATGTCGTGCGGTGACCCGTCGCCAGCA
AAAGCTCTCATGACCCTGTTGCGCCGTCTCGACGTGCGCTCCGACCG

附 录 B
(规范性附录)
DNA 提取流程

- B.1** 将样品用球磨仪或研钵液氮冷冻后磨碎,称取 50-100 mg 于 1.5 mL 的灭菌离心管中,加入 700 μ L CTAB 缓冲液,振荡混匀,置于 65 $^{\circ}$ C 温浴 60-90 min,期间不断混匀;
- B.2** 冷却后加入 5 μ L RNA 酶溶液,置 37 $^{\circ}$ C 温浴 30 min;
- B.3** 加入等体积的酚:氯仿:异戊醇(25 : 24 : 1),振荡均匀,12 000 r/min,离心 15 min;
- B.4** 取上清液放入另一 1.5 mL 新管中,加入等体积的异丙醇,轻轻颠倒 3-5 次,置 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中放置 40 min;
- B.5** 12 000 r/min 离心 10 min,弃去上清液;
- B.6** 加入 400 μ L 70%乙醇溶液洗涤,12 000 r/min 离心 1 min,弃上清液,将离心管室温下干燥 15 min;
- B.7** 加入 50~100 μ L TE 或无菌去离子水,置 65 $^{\circ}$ C 水浴 40 min 充分溶解 DNA,测量 DNA 的浓度和纯度后置于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

注:也可使用试剂盒进行 DNA 提取,具体方法按照试剂盒说明书操作。

行业标准信息平台

附 录 C

(规范性附录)

ITS2 序列获得方法

- C.1 登录 ITS2 数据库(The ITS2 Database)网站:<http://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de/>。
- C.2 点击 Tools 任务栏的 Annotae 选项。
- C.3 在 ITS2 Annotation 对话框内输入需处理的序列。
- C.4 点击 Annotation 选项,获得 ITS2 序列。

行业标准信息服务平台

附 录 D

(规范性附录)

序列 BLAST 比对方法

- D.1 登录网站：<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>。
- D.2 点击 Nucleotide BLAST 选项。
- D.3 在 Enter Query Sequence 对话框内输入待比对序列,Database 数据库选择 Others 选项。
- D.4 点击 BLAST 按钮进行比对。
- D.5 根据比对结果,按照 8 判定标准进行结果判定。

行业标准信息平台

参 考 文 献

- [1] Keller A, Schleicher T, Schultz J, et al. 5.8S-28S rRNA interaction and HMM-based ITS2 annotation. *Gene*, 2009, 430 : 50~57.
- [2] Li DZ, Liu JQ, Chen ZD, et al. Plant DNA barcoding in China [J]. *Journal of Systematics and Evolution*, 2011, 49: 165-168.
- [3] Li M, Cao H, But PPH, et al. Identification of herbal medicinal materials using DNA barcodes [J]. *Journal of Systematics and Evolution*, 2011, 49: 271-283.
- [4] Song J Y, Yao H, Li Y, et al. Authentication of family Polygonaceae in Chinese Pharmacopoeia by DNA barcoding technique [J]. *J Ethnopharmacol*, 2009, 124(3): 434.
- [5] Yao H, Song JY, Liu C, et al. Use of ITS2 Region as the Universal DNA Barcode for Plants and Animals. *PLoS ONE*, 2010, 5 (10) : e13102.
- [6] 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.
- [7] 陈士林, 姚辉, 宋经元, 等. 基于 DNA barcoding(条形码)技术的中药材鉴定 [J]. *世界科学技术*, 2007, 9(3): 7-12.
- [8] 徐晓兰, 石林春, 宋经元, 等. 基于 ITS2 条形码序列的山豆根基原植物及其混伪品的 DNA 分子鉴定 [J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 1147-1152.
- [9] 任保青, 陈之端. 植物 DNA 条形码技术 [J]. *植物学报*, 2010, 45(1): 1-12.

行业标准信息平台