

# 分子生物学技术 在中药鉴定中的应用

□ 杨光明 蔡宝昌 王明艳 潘 扬

(南京中医药大学 南京 210029)

**摘 要:**本文总结了近年来分子生物学技术在中药鉴定,包括在动、植物药材鉴定方面的应用,并简述这些技术的原理和方法。将应用的分子生物学技术分为3类:电泳技术、生物免疫技术和DNA分子遗传标记技术(1. 基于PCR反应的方法,包括随机扩增多态DNA、任意引物聚合酶链反应、微卫星DNA、扩增片段长度多态和毛细管PCR;2. 限制性片段长度多态和PCR产物的RFLP分析;3. DNA测序;4. 高特异性PCR鉴别;5. DNA芯片或基因芯片鉴别)。本文可供中医药工作者作参考。

**关键词:**分子生物学 中药鉴定 电泳 免疫 DNA分子遗传标记

中药传统上是用经典的形态分类学和解剖学特征,从基原、性状、显微及理化等方面进行药材品种的鉴别。性状鉴别是利用感官对完整的药材或饮片进行鉴别,具有简单明了的特点;显微鉴别是利用显微镜来观察药材的组织构造、细胞形状以及内含物的特性,它对性状相似的中成药的鉴定有独到之处;理化鉴别利用物理或化学的方法,对药材及其制剂所含的主要化学成分进行鉴定,如薄层层析法、荧光法、紫外、红外光谱法等。这些方法简便易行,对于植物药、矿物药和大多数以整体入药而保持其

分类学性状特征的药物药的鉴定确实是行之有效的,所以一直沿用至今。然而一些局部入药的动物药材或经过多道工序炮制加工后的药材或是道地药材,有的失去其原本性状而难辨真伪,有的难以分辨品质优劣,尤其是道地药材和贵重的动物药材,如熊胆、鹿鞭、牛黄等,由于传统的鉴别方法难以很好地鉴别,造假问题尤其严重,以假乱真,以次充好,致使假药、劣药长期困扰中药材市场,阻碍着中药的发展,这一矛盾亟待解决。

分子生物学是从分子水平研究生物体的生命活动及其规律的一门

科学,是当今世界生命科学领域中最活跃和最具前途的学科。它带动了生物学乃至整个科学的发展。近10年来,分子生物学技术在农业、生物工程、环境保护、畜牧水产等领域都得到了广泛的应用,为中药材鉴别提供了一个崭新的研究思路。分子生物学研究发现,生物物种的多样性是其基因多态性的结果,而基因多态性可以在不同的水平上进行检测,包括传统的器官水平(形态学、分类学特征)、组织水平(解剖学特征)、染色体水平(细胞学特征)、化学水平和分子水平。分子水平一般有蛋白质图谱(生物化学特征)、

同功酶谱(酶学特征)以及 DNA 指纹图谱(分子生物学特征)。中医药工作者以分子生物学为武器,在动、植物药材的鉴别,包括道地药材的鉴别方面做了许多工作。

### 一、电泳技术 (Electrophoresis, EP)

带电荷的粒子在电场中随缓冲液定向泳动称为电泳。药材中含有多种组分,如有机酸、蛋白质、多肽、氨基酸、生物碱和酶等,其电荷性质、电荷数和分子量各不相同。在同一电场作用下,经一定时间,各组分泳动的方向、速度和距离也不相同,结合谱带条数和染色不同而达到鉴别的目的。电泳技术目前已广泛应用于药材鉴别中。

赵华英等<sup>[1]</sup>应用聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)技术,对 6 种外形很相似的苋科种子类药材青箱子、牛膝子、鸡冠花子、皱果苋子、苋子、反枝苋子进行了可溶性蛋白的电泳分析,图谱显示各种间谱带特征明显,可比性强,能起到准确鉴别苋科种子药材的目的。

张林碧<sup>[2]</sup>也用此法对家鸡、斑鸠、孔雀、白鹇、鸽等 5 种动物的内金进行了电泳谱带数目、谱带泳动率、染色程度、薄层扫描图谱的比较,结果表明,不同种动物内金的电泳图谱及其薄层扫描图谱差异明显,不仅可作为内金类药材的鉴别特征,还可作为动物种的鉴别依据。

何玲<sup>[3]</sup>针对种子中可溶性蛋白质可能存在的差异,利用等电聚焦电泳(IFE)技术和激光扫描图谱的

比较,证明了混淆品四籽野豌豆和硬毛果野豌豆的种子与王不留行中的可溶性蛋白质具有较明显的差异,可藉此作出准确鉴定。

陈振江等<sup>[4]</sup>则对金钱白花蛇可溶性蛋白进行了 3 种凝胶电泳研究,根据聚丙烯酰胺凝胶电泳谱带的位置和数目进行品种鉴别,清晰可见正品只有一个明显的主带;用改进的 12 烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)测定其主要蛋白质成分分子量;用等电聚焦电泳测定其主要蛋白质成分的等电点(PI)。清晰的电泳谱带及相应的数据为商品蛇真伪鉴别提供了科学依据。

中药材鉴别也可以以药材细胞中普遍存在的受遗传基因控制的蛋白多肽分子为指标加以区分。如许重远等<sup>[5]</sup>采取高效毛细管电泳技术(HPCE)对生药狗脊、制狗脊及其混淆品黑狗脊的酸性、中性、碱性 3 种提取液分别进行蛋白多肽电泳检测,黑狗脊与狗脊在 3 种提取液检测所得图谱中都存在显著差异,生狗脊与制狗脊也可从酸性提取液的图谱中加以区别。陈振德等<sup>[6]</sup>也对国产榧属植物种子蛋白进行了高效毛细管电泳分析,电泳图谱区分了榧子、云南榧子、巴山榧子、香榧子、九龙山榧子、长叶榧子、日本榧子等,差异明显,可作为中药榧子的鉴别方法之一。

### 二、免疫技术 (Immunity)

电泳技术对于不同种属动、植物药间的鉴别具有一定的专属性。

免疫技术则适用于动物药材的鉴别,尤其是亲缘关系比较接近的动物药间的鉴别。免疫技术的依据是不同种的动物均含有特异性蛋白质,这些蛋白质的表面氨基酸都有一小部分决定或控制抗原、抗体特异性反应的抗原决定基,也就是具有免疫特异性。利用免疫反应可以鉴别出动物药的基原。郭月秋等<sup>[7]</sup>根据这一技术原理,制备了抗鹿及其伪品动物血清,与颗粒化处理了的样品进行免疫凝集实验,结果抗梅花鹿血清与不同来源的鹿心组织不发生凝集(阴性)反应。样品于 80℃ 以下加热处理后仍能作出鉴别,此方法快速而准确。

冯振波等<sup>[8]</sup>利用虎的血清蛋白对家兔进行免疫,制备抗虎血清,抗虎血清再与虎骨蛋白进行免疫学特异血清反应,由于抗原和抗体在接触界面产生沉淀物,所以很快便出现肉眼可见的白色环带,经交叉反应和对照实验,抗虎血清和不同科的动物熊、牛、猪、羊等的骨质蛋白不发生反应,而且和狮、豹、猞猁、原猫等同科动物的骨质蛋白也不发生沉淀反应,唯独和虎的蛋白发生反应。抗虎血清效价高,稳定性好,具有专一的种属特异性,所以利用抗虎血清可以对虎骨进行准确鉴别。双向琼脂扩散反应鉴别虎骨效果一致。

免疫鉴别还可采用酶标法和单克隆抗体法进一步深入研究。

### 三、DNA 分子遗传标记技术 (DNA molecular genetic marker)

DNA 分子是由 G、A、C、T 4 种

碱基构成的,4种碱基排列组合形成不同的排列顺序,生物体的遗传信息就是通过这变化万千的碱基排列顺序来贮存的。DNA分子作为遗传信息的直接载体,既不象化学成分一样受土壤、气候等外界因素的影响,也不象形态、血清学特征一样受生物体发育阶段和器官组织差异的影响,而是每一个体的任一细胞均含有相同的遗传信息。经历数千年遗留下来的古代人骨骼中仍然可以提得微量DNA<sup>[9]</sup>;王亚明等<sup>[10-11]</sup>也从保存9年以上的药材龟板和鳖甲中提取出DNA;经高温高压蒸煮过的鳖甲和骨骼中也可以提得较高质量的DNA,并用作模板进行PCR扩增,再对其特定的DNA片段进行研究。由此可见,DNA分子信息量大,稳定性好,可以以此作为药材鉴别的依据。

另外,道地药材从生物学内涵讲是生物学上的居群,它的形成是由基因型和环境饰变共同作用的结果,所以道地药材的一个重要特征就是遗传特征,它应看成一个具有共同基因库的由交配和亲缘关系联系起来的同一物种的个体群<sup>[12]</sup>。也就是说,道地药材除了与特定的生态环境和采收加工技术有关外,还与这一物种的地方种群或居群中遗传的特殊性有关,所以也可以用DNA分子遗传标记技术来鉴别。

### 1. 基于PCR反应的方法

包括随机扩增多态DNA(Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD)、任意引物聚合酶链反应(Arbitrarily Primed PCR, AP-PCR)、微卫星DNA、扩增片段长度

多态(Amplified) Fragment Length Polymorphism, AFLP)和毛细管PCR(Capillary PCR)。

RAPD或AP-PCR是利用一系列不同的随机排列的寡核苷酸链作为引物,对研究对象的基因组DNA进行PCR扩增,这样可以对其基因组DNA进行地毯式扫描,比较DNA的多态性,从而区分药材的不同基原。

黄璐琦等<sup>[13]</sup>应用RAPD技术对来源于13个种3个变种的天花粉及其类似品进行鉴别研究,用8个扩增多态性好的引物分别扩增,得到清晰、稳定的条带共计83条,并采用聚类分析方法分析结果,把天花粉正品与类似品有效地分成三大类,他们认为在实验时采取设对照组、对结果采用聚类分析等方法,RAPD技术鉴别药材具有一定的可靠性和实用价值,这为解决粉末及破碎药材的鉴别提供了新的方法。

王义权等<sup>[14]</sup>选用了两种引物对8种共11件蛇类药材样品的DNA进行了随机扩增反应,观察到由同种原动物制成的蛇类药材,特别是在亮度较高的主扩增带上多相同,而不同种原动物所制成的蛇类药材间,两引物的扩增带型均有较大的差异,表明RAPD方法具有较高的种的特异性,可准确检出乌梢蛇和金钱白花蛇的混淆品和伪品。

曹晖等<sup>[15]</sup>采用AP-PCR和RAPD方法扩增菊科植物地胆草、白花地胆草和假地胆草以及商品药材苦地胆的基因组DNA,获得可靠的DNA指纹图谱,根据凝胶显示的DNA带型差异可鉴别苦地胆和其

混淆品,同时,根据DNA指纹图谱的相似度指数值计算,证实了商品药材苦地胆的基原为菊科植物地胆草。他们又应用这两种方法扩增了蒲公英及其6种土公英混淆品的基因组DNA,前者所用引物为20-24个核苷酸,后者为10个,都获得了清晰可靠的DNA指纹图谱,显示蒲公英和6种土公英之间存在着明显的DNA指纹差异,利用这些差异可鉴别蒲公英及其混淆品<sup>[16]</sup>。研究中可以看出,RAPD方法所需基因组DNA量仅为AP-PCR的1/10左右,且更快速、有效、微量。

张荣等<sup>[17]</sup>用50个随机引物对云南木蓝属8种植物进行PCR扩增,其中8个引物扩增成功,有的引物扩增结果种间差异明显,可以有效地对木蓝属植物进行鉴别。研究中所用材料为晒干材料,而不是新鲜植物,极近似实际应用的生药状态,又一次证明了RAPD分析法作为鉴别植物类生药是可行的。

马小军等<sup>[18]</sup>用RAPD标记法对7个来源地不同的野山参和1个栽培人参(园参)进行遗传多样性检测和遗传分析,用14个10-mer寡聚核苷酸引物共检测111个位点,其中多态位点76个,占67.6%,远大于园参内的遗传变异;聚类分析表明,山参之间及其与园参之间的遗传变异没有超出与近缘种西洋参之间的遗传差异。

黄丰、王培训等<sup>[19、20]</sup>采用随机引物对西红花及其伪品进行扩增,根据DNA指纹图谱的差异,可进行鉴别;还对来自不同产地的西洋参样品进行多态性分析,结果显示大



部分引物能扩增出清晰的 DNA 指纹图,西洋参真伪品之间的指纹图谱差别较大,而各地产西洋参 DNA 指纹图谱基本一致。同时,发现个别产地样品的指纹图有不同程度的改变,考虑有变异的可能。

马小军等<sup>[21]</sup>用毛细管 PCR 法扩增人参 RAPD 指纹并将其与西洋参一起鉴别,与普通 PCR 相比,毛细管 PCR 的优点在于反应体系小,扩增 DNA 指纹灵敏,仅用纳克级的样品即可完成一次反应,毛细玻璃管管壁比普通 Eppendorf 管感温灵敏、传热快,反应介质与反应环境相对接触面积大,提高了 Taq 酶的功效,而且反应时间仅为普通 PCR 的 1/3,所以更适于作药材鉴别用。

## 2. 限制性片段长度多态性 (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) 和 PCR 产物的 RFLP 分析 (PCR-RFLP)

RFLP 方法用来检测限制性片段长度的多态性,须经酶切、电泳、Southern 转移、与探针杂交、放射自显影等步骤。PCR-RFLP 集 RFLP 和 PCR 二者之长,先通过 PCR 扩增出 1-1.5Kb 以下的 DNA 片段,再经限制性内切酶消化,进行多态性酶切位点的分析,以达到鉴别的目的。吴平等<sup>[22]</sup>从 5 种海马干标本中提取 DNA,用 PCR 技术扩增 12S rRNA 和细胞色素 b 基因片段,对扩增产物进行了 RFLP 分析。用 5 种限制性内切酶消化,此方法可以鉴别其中 2 种海马。从研究中 PCR-RFLP 的结果可以看出,12S rRNA 基因较细胞色素 b 基因保守,从细胞色素 b 基因片段的 RFLP

获得的遗传信息比从 12S rRNA 基因片段的大得多。故在用 PCR-RFLP 方法进行中药材的分子鉴定研究时,应选择进化速率较快的基因。

马小军等<sup>[23]</sup>将毛细管 PCR 扩增的人参 RAPD 反应产物进行限制性内切酶消化并有效地进行了酶切位点分析,结果证明 PCR-RFLP 是筛选药材特异 DNA 分子标记的一种简单易行的方法,尤其对那些因扩增条带太少,在 RAPD 分析中本欲摒弃的引物加以再利用,有效地提高了 DNA 指纹的使用效率。

## 3. DNA 测序

DNA 测序是用 Sanger 的双脱氧链终止法等手段对药材特定的基因片段进行精确的 DNA 序列分析,并加以比较,从而达到鉴别药材的目的。

12S rRNA 基因属于线粒体基因组中的非蛋白编码基因,在线粒体基因组中相对保守,Cyt b 基因是线粒体上一个编码蛋白质的基因,也有一定的保守性。他们都在种内高度保守,而在种间序列差异较大,常用作药材鉴别的基因片段。

吴平等<sup>[24]</sup>从乌龟和其它 20 种龟类的组织材料中提取 DNA 扩增约 110bp 的线粒体 12S rRNA 基因片段序列数据库。再利用龟甲检口中残存的 DNA 用 PCR 扩增相同的基因片段,与乌龟和其它龟的序列进行比较,区分正品和混淆品。用同样的方法,他们又对中华鳖和山瑞鳖的同一基因片段进行扩增、测序,结合从 Genbank 中检索到的缘板鳖的序列,构建了 3 种鳖的 12S

rRNA 基因片段序列数据库,并以此为依据鉴定了鳖甲检品<sup>[25]</sup>。对从海马里提取的 DNA,他们用 PCR 技术扩增约 450bp 的 12S rRNA 和约 490bp 的 Cyt b 基因片段,对扩增产物除了进行 RFLP 分析,还作了 DNA 序列分析,与 PCR-RFLP 只能鉴别 2 种海马相比,DNA 序列分析法不仅可以检测到所有 5 种海马药材扩增产物间的差异,而且有很好的重复性,可作为其它动物药材干样品鉴定的参考<sup>[22]</sup>。

王义权等<sup>[26]</sup>扩增了乌梢蛇及其混淆品 7 种共 12 件标本的 DNA 约 308bp 的 Cyt b 基因片段,以 Sanger 终止法测得 DNA 序列,测序结果经对位排列后得到 246bp 的 DNA 序列,种间该片段序列差异至少大于 11.84%,而种内差异不大于 5%。通过比较蛇的 Cyt b 基因 246bp 的同源 DNA 序列,可以准确区分乌梢蛇及其混淆品。

王建云等<sup>[27]</sup>采用微量 DNA 提取技术,从梅花鹿血、毛、鹿鞭、鹿茸、牛鞭、驴鞭中提取 DNA,以线粒体 DNA Cyt b 通用引物 L14841 和 H15149 扩增约 307bp 的 DNA 片段,扩增产物纯化后用双脱氧链终止法测定其序列,结果梅花鹿毛、血、鹿鞭的 DNA 序列完全一致,证明其来源确是梅花鹿,而来源不详的鹿茸与其有较大差异,提示不是梅花鹿的鹿茸,牛、驴比段序列与梅花鹿明显不同,用所测序列以简约法 PAUP3.1.1 程序构建的分子系统树与传统分类系统相吻合,说明提取微量 DNA 并测定其序列鉴定鹿鞭和鹿茸是可行而准确的。他们

还用这一方法提取并扩增了鸡内金、鸭内金线粒体 DNA Cyt b 约 307 bp 的片段,测定其序列,证明鸡内金的 DNA 序列与鸭内金的有明显差异,以此能准确区分鸡、鸭内金。

rDNA 是编码核糖体 RNA 的基因,是由一些高度重复序列组成的多基因家族。一般认为 rDNA 在真核生物中是高度保守的,其编码区(18S, 5.8S, 26S)的序列具有很高的同源性,在系统学上主要用于属以上的系统学研究。而非编码区(ITS1, ITS2)序列常用于种间及种下等级的研究,可用于种间鉴别。

马小军等<sup>[29]</sup>用银染 DNA 测序法测定了 4 个山参的 ITS1 和 2 个山参的 ITS2,测得人参属的 ITS1 有 220-221 个碱基 ITS2 有 222-224 个碱基,其中 ITS1 在人参种内非常稳定,但 ITS2 有部分变异。与 Genbank 中西洋参的序列比较,发现人参与其近缘种西洋参之间具有人参种内变异更稳定的遗传差异。

#### 4. 高特异性 PCR 鉴别

中药材高特异性 PCR 鉴别是根据特定区域的 DNA 序列数据,设计有高度特异性的某种正品药材的鉴别引物,它只能对来自正品药材的 DNA 模板中特定的区域进行有效的扩增,而对来自伪品、混淆品或其它生物的 DNA 模板中的该区域不能进行扩增,当有样品待鉴定时,从待鉴定样品中提取少量 DNA,以此为模板,用高特异性的鉴别引物在适当的条件下进行 PCR 扩增,然后电泳检测扩增结果,如为阳性,则为正品药材,否则即非

正品药材。这一方法简便、准确、重现性好。但它不能区分个体的发育阶段和同种的器官组织的差异。

王义权等<sup>[30]</sup>在对 Cyt b 基因片段序列分析的基础上,设计了金钱白花蛇 PCR 鉴别的一对高度特异性引物 BuL-1 和 BuH-1,结果表明,该对引物在鉴别中用 60℃-65℃ 复性温度,可以 100% 检出金钱白花蛇,误检率和漏检率为 0,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。

刘中权等<sup>[31]</sup>也进行了中药材龟甲及原动物的高特异性 PCR 的鉴别研究。他们根据 22 种亚洲产龟类的线粒体 12S rRNA 基因片段序列,设计了一以专用于龟甲原动物乌龟的鉴别引物,IT-L01 和 IT-H01 用该对引物在 72℃ 的复性温度下进行 PCR,4 个乌龟的模板 DNA 均得到约 180bp 的阳性扩增带,而其它各龟的模板 DNA 在同样条件下无扩增产物。用这对鉴别引物经一次 PCR 反应便可准确地鉴定受试原动物是否为乌龟,结果与性状鉴定和 DNA 序列分析鉴定结果完全一致。

#### 5. DNA 芯片 (DNA chip) 或基因芯片 (Gene chip) 鉴别

近年来,DNA 及寡聚核苷酸的微型阵列芯片(又称 DNA 芯片或基因芯片)在生物学和医学领域发展很快。基因芯片是生物芯片的一种,它是将大量的 DNA 片段固定在硅片上,这些 DNA 片段叫做探针,用另一些有针对性的 DNA 片段来作用这些探针,从作用结果中获得基因信息。在芯片上集成的成千上

万的密集排列的基因探针,具有高速度、分析自动化和高度并行处理能力,能够在同一时间内分析大量的基因。

利用基因芯片高效、高通量分析生物信息的优势可快速进行中药材的鉴别。先找到所需鉴定中药材的特异性 DNA 片段,再以这段特异性的碱基序列作为探针,用原位合成法或合成点样法将探针固定到支持物上,将经过提取、扩增和标记的药材样品与芯片进行杂交,最后用激光共聚焦显微扫描技术等手段对杂交结果进行检测,得到药材真伪的结论。

这种鉴别芯片可以采用密度较低,集 PCR、杂交、检测于一体的 PCR 芯片。这类芯片成本低,应用广泛,可推广到各地中药材站、医院的药材科、海交,以及众多的中药科研机构,前景十分广阔。目前,这种用于药材鉴别的基因芯片仍处在研究阶段,已有人对贝母进行特异性序列和鉴别芯片的实验研究,相信不久的将来基因芯片就会广泛应用于中医药领域。

分子生物学的飞速发展已经为古老而年轻的中医药事业注入了新鲜的血液,今后一定会有更多更先进的分子生物学技术为中医药增添新的生机与活力。

#### 参考文献

- 1 赵华英,陈永林. 苋科 6 种种子类药材的蛋白电泳鉴别. 中国中药杂志, 2000, 25 (1): 52.
- 2 张林碧,肖凤英. 五种动物内金的 PAGE 鉴别. 中药材, 2000, 23(1): 22.

- 3 何玲. 王不留行及其混淆品的等电聚焦电泳鉴定方法. 天津药学, 1999, 11(4): 52.
- 4 陈振江, 陈科力, 王曦等. 金钱白花蛇可溶性蛋白凝胶电泳图谱的研究. 中草药, 2000, 31(5): 374.
- 5 许重远, 陈振德, 刘建武等. 狗脊及其混淆品蛋白多肽高效毛细管电泳法鉴别. 中药材, 1999, 22(7): 337.
- 6 陈振德, 陈志良, 侯连兵, 等. 榧子蛋白高效毛细管电泳法鉴别. 中草药, 2000, 31(5): 377.
- 7 郭月秋, 陈代贤, 刘辉, 等. 鹿心及其伪品的免疫凝集试验鉴别探讨. 中医药学报, 2000, 28(1): 62.
- 8 冯振波, 乔宛虹, 郭柏, 等. 应用免疫学方法进行虎骨鉴别的研究. 中国中药杂志, 1992, 17(4): 196.
- 9 Hagelberg E, Sykes B. Ancient bone DNA amplified. Nature, 1989, 342: 485.
- 10 王亚明, 周开亚, 吴平, 等. 中药材龟板和鳖甲中 DNA 的提取与扩增. 药学学报, 1996, 31(6): 472.
- 11 刘中权, 王义权, 周开亚. 从高温高压蒸煮过的中华鳖甲和骨骼中提取及扩增 DNA. 中草药, 2000, 31(5): 343.
- 12 黄璐琦, 张瑞贤. "道地药材"的生物学探讨. 中国药理学杂志, 1997, 32(9): 563.
- 13 黄璐琦, 王敏, 杨滨, 等. 用随机扩增多态 DNA(RAPD) 技术鉴别中药材天花粉及其类似品. 药物分析杂志, 1999, 19(4): 233.
- 14 王义权, 周开亚. 蛇类药材分子遗传标记鉴别的初步研究. 药学学报, 1997, 32(5): 384.
- 15 曹晖, 毕培曦, 邵鹏柱. 中药材苦地胆的 DNA 指纹鉴定. 中药材, 1996, 19(12): 608.
- 16 曹晖, 毕培曦, 邵鹏柱. 香港市售蒲公英及其混淆品土公英的 DNA 指纹鉴别研究. 中国中药杂志, 1997, 22(4): 197.
- 17 张荣, 张步振, 叶浩. 用 RAPD 分析法鉴定木蓝属生药. 中国中药杂志, 1997, 22(2): 72.
- 18 马小军, 汪小全, 孙三省, 等. 野生人参 RAPD 指纹的研究. 药学学报, 1999, 34(4): 312.
- 19 黄丰, 王培训, 周联, 等. 西红花的 RAPD 鉴别研究. 中药新药与临床药理, 1999, 10(4): 226.
- 20 王培训, 黄丰, 周联, 等. 商品西洋参 DNA 指纹图谱鉴别. 中药新药与临床药理, 1999, 10(6): 367.
- 21 马小军, 汪小全, 邹喻苹, 等. 人参 RAPD 指纹鉴定的毛细管 PCR 方法. 中草药, 1998, 29(3): 191.
- 22 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. 药学学报, 1998, 33(3): 226.
- 23 马小军, 汪小全, 肖培根, 人参 RAPD 产物的限制性内切酶消化. 中草药, 1998, 29(9): 625.
- 24 吴平, 周开亚, 徐珞珊, 等. 中药材龟甲的分子鉴定研究. 药学学报, 1998, 33(4): 304.
- 25 吴平, 周开亚, 徐珞珊, 等. 用聚合酶链反应产物直接测序技术鉴定中药材鳖甲. 中国药科大学学报, 1998, 29(1): 28.
- 26 王义权, 周开亚, 徐珞珊, 等. 中药材乌梢蛇及其混淆品的 DNA 序列分析鉴别. 药学学报, 1999, 34(1): 67.
- 27 王建云, 何广新, 付文, 等. 鹿鞭的微量 DNA 提取及序列鉴定. 中国中药杂志, 1997, 22(10): 579.
- 28 王建云, 王文, 宿兵, 等. DNA 序列分析技术鉴定鸡内金的方法学研究. 中国药科大学学报, 1996, 27(8): 471.
- 29 马小军, 汪小全, 肖培根, 等. 野山参与栽培参 rDNA 内转录间隔区(ITS)序列比较. 中国中药杂志, 2000, 25(4): 206.
- 30 王义权, 周开亚, 徐珞珊, 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. 药学学报, 1998, 33(12): 941.
- 31 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. 药学学报, 1999, 34(12): 941.

(责任编辑: 许有玲)

## 中医药网站网址选录

中国中医药信息网  
<http://www.cintcm.ac.cn>  
 中国传统医药网  
<http://www.medicinechina.com>  
 当代中医网  
<http://www.tcmtoday.com>  
 导医网国医堂  
<http://www.daoyi.com/tcm/>  
 东方医网  
<http://www.echinahealth.com>  
 医药空间  
<http://www.drugsky.com>  
 中国医药报  
<http://www.cntcm.com.cn>  
 二十一世纪中医药网络教育中心  
<http://www.itcmdu.net>  
 汉唐中医药电子商务网  
<http://www.chinesemedicines.net>  
 龙庆商务网  
<http://www.lqonline.com>  
 天药网  
<http://www.healthsky.com>  
 中华医药皇——中医药全球商务网  
<http://www.sinoking.net.cn>  
 中药商场  
<http://www.tcmmarket.com>  
 中国中药信息网  
<http://www.china-herbs.com.cn>  
 北中医信资源  
<http://www.bcmir.com>  
 上海市中医药信息公众网  
<http://www.scictcm.stn.sh.cn>  
 全球中药材信息网  
<http://www.istcm.com.cn>  
 本草纲目数据库系统  
<http://hg-www.hb.cninfo.net/medicine/>  
 中国中药材网  
<http://www.gmzy.net.cn>  
 中华人民共和国国家中医药管理局  
<http://www.satcm.gov.cn>  
 国家中药品种保护审评委员会  
<http://www.zybh.gov.cn>  
 中国中医研究院  
<http://www.cintcm.ac.cn/catcm>  
 台湾行政院卫生署中医药委员会  
<http://www.ccmp.gov.tw>  
 台湾国立中国医药研究所  
<http://www.nricm.edu.tw>  
 美国国立医学研究院替代医学研究中心(nccam)  
<http://altmed.od.nih.gov>

combination with the development in this field, the authors suggest to establish an artificial intelligence system for quality evaluation of Chinese medicinal materials. This system uses the characteristic fingerprinting of multi - data (macroscopic, microscopic, and genetic fingerprinting as well as qualitative fingerprinting for the analysis of chemical components of Chinese medicinal material plus computer image recognition technology and expert system to achieve digital and automatic control of their quality.

**Key words:** Chinese medicinal materials Characteristic fingerprinting of multi - data Artificial intelligence quality evaluation

### **Analysis of TCM Injection Fingerprinting**

*Cao Jin ,Rao Yi ,Shen Qun ,Wang Yiming ,Luo Guo'an*

*School of Life science and engineering, Tsinghua University, Beijing*

Starting from the four aspects of the significance, stage and details as well as the promotion of TCM industry of TCM injection fingerprinting, this article expounds the role of fingerprinting in the improvement of TCM quality as well as the feasibility and operability of the establishment of fingerprinting and therefore, it is an inevitable trend to establish fingerprinting in TCM modernization, as indicated above.

**Key words:** TCM fingerprinting HPLC

### **Opinion on the Innovation of the Theory of TCM — To Analyze the Critical Problem of the Research on the Basic Theory of TCM**

*Li Jingbo Chen Xiaoyin Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510405*

At present, how to give the play to the advantages and characteristics of TCM, and explore a new situation of the research with the features of Chinese culture and scientific ideology on the basic theory of TCM are the critical problem of TCM basic theory research. For this cause, we should clarify the following questions in the process of studying the basic theory of TCM, i. e. the guiding idea of TCM, the distinction between the modern medicine and TCM, the special ways of diagnosis and treatment of TCM, and the status of TCM in the medical and healthy care in the future. By analyzing and thinking over these questions, we can revise the unreasonable research direction and supply some new idea for the innovation of the research on the basic theory of TCM.

**Key words:** the basic theory of TCM modern research academic exploration clue and method comparison between the modern medicine and TCM

### **The International Standardization of the Writing in the prescription of the Traditional Chinese Clinical Soupy Medicaments in Common Use**

*Liao Jun Liu Hui*

To solve the long - term suspecting problem - different names for the same medicinal plant in TCM and one name shared by different herbs, we worked at the way of an international standard for the TCM prescriptions for its popularity in the world. Method: The key research lies in the international standard of the herb's names as the standardization of the dosage has been achieved, which combined with the herb's names makes the clinical prescription in TCM. Our modal proves practical that is made up of two parts - "Latin word of the medicinal part of the plant" + "Latin word of the plant's source". Solution: The prescriptions written by Latin modal should be added to the "China Pharmacopoeia" and the national textbook "TCM Formula"(the 6th publication). Conclusion: Latin modal for TCM prescription in clinic proves necessary and feasible as well.

### **Application of Molecular Biological Technology in Identification of Traditional Chinese Medicine**

*Yang Guangming Cai Baochang Wang Mingyan Pan Yang*

*Nanjing University of Traditional Chinese Medicine Nanjing, 210029*

We summarized the application of molecular biological technology in identification of TCM in recent years, including the identification of animal and plant medicine. We also described in brief the principles and methods of the molecular biological techniques. These techniques applied are divided into three parts, Electrophoresis, Immunity and DNA Molecular Genetic Marker. The third one includes 1) techniques based on Polymerase Chain Reaction, which includes



Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), Arbitrarily Primed PCR (AP-PCR), Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) and Capillary PCR etc.; 2) Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) and PCR-RFLP; 3) DNA sequencing; 4) highly specialized PCR; 5) DNA chip or gene chip. This paper can be used for reference for those who are engaged in research of TCM

**Key words:** molecular biological technology identification of TCM electrophoresis immunity DNA molecular genetic marker

### Investigative Methodology and Technology for Pharmacodynamic Material Basis of Compound Prescription of Traditional Chinese Medicine

9: ; \*, 0 9\*-\$ <\$, 0=\*, >\*- , 0 9\*, ?\*-\$

Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences Dalian 116011

The key of the modernization of Traditional Chinese Medicine is to clarify chemical material basis and to found pharmacological model. This article indicates that many complex components extracted from Chinese herbal medicines are systematically separated and analyzed by high performance chromatography and coupling techniques, while their major effective constituents or components are enucleated by pharmacological experiments. Furthermore, their pharmacological data are tested and verified and their compatibleness is optimized by preparative HPLC.

**Key words:** compound prescription of TCM material basis chromatography coupling technique preparative HPLC pharmacology test

### Determination of Soil and Herbal Selenium in the Areas of Endemic Diseases Related to Selenium Background

<: (/ \*&\*, @+, 0 9: +6+, 0 A-, 0 >\*-, B:

C, 85%5: 5+ \$6 7/\*, +8+ 3-5+%- 3-'\*)-0 7/\*, - E)-' +?1 \$6 7/\*, +8+ .%- '5\*\$, -& 3+'\*)\*, +0 F+\*B, 0 GHIIHH

**Objective** To know the levels of selenium in both soils and herbals from the areas of endemic diseases related to selenium for providing new data to quality control and clinical use of the herbals. **Methods** Hydride Atomic Fluorescence Spectrophotometry. **Results** The levels of selenium in soils and herbals from the places in poor background of selenium of the and the content difference of selenium among the species are also obvious. **Conclusions** The selenium content in herbals mainly depends on geochemical background and some of them may produce better effects, or even a new indication.

**Key words:** Selenium Geo - herbals Endemic diseases

### Present Status of Study on Gecko Used as Traditional Chinese Medicine

7/+ , 3\*, 0

J+K-%?+, 5 \$6 L/-%?-)1 , @: B-, 7\$&&+0+ \$6 .%- '5\*\$, -& 7/\*, +8+ 3+'\*)\*, + , @: 4/\$: "MHHH"

<: -, 0 N-, /-, 0

3+'\*)\*, -& 3-5+%-& 7\$K\$%-5\*\$, \$6 @: B-, L%\$0\*, )+, @: 4/\$: "MHHH"

In recent years, Gecko used as traditional Chinese medicine has shown definite effects on many difficult and complicated diseases, such as malignant tumors, osteomyelitis, tuberculosis and fistula, which has attracted general attention in medical circle and related research achievements of it are often published in various journals. This paper reviews the recent research on textual criticism, resources, chemical constituents, preparation, pharmacological action and related development of clinic research of Gecko and has a discussion on the determination of Gecko strains and its preparation methods.

**Key words:** Gecko Present status of study Development

### Preliminary Discussion on the Sense of Innovation of the Application of New Techniques in Traditional Chinese Medicine

A-, 0 3\*, 0 <: 9\*-\$?+\* >: ; \*- , 0

(\*)+, )+ -, ' 5+ )/, \$&\$01 ' +K-%?+, 5 \$6 7/+ , 0': P, \*0+%\*51 \$6 . 73

It is the problem of how to turning TCM achievement into industry products and how to choose the reasonable quantity, quality, scale and efficiency of industrialization that has become an important factor which is impeding the shift in the mode of economy increase and the optimization of industry structure. To bring new ideas (also known as innovation) is the

{#%\$% ( )+, )+ -, ' .+ )/, \$&\$012 3\$' +%, \*4-5\*\$, \$6 .%- '5\*\$, -& 7/\*, +8+ 3+'\*)\*, + J !"