

DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2014.04.024

宋炳舸,杨雪莹,倪萍娅,等. DNA 条形码技术在毒品原植物大麻鉴定中的应用[J]. 广西植物, 2014, 34(4): 552—556

Song BK, Yang XY, Ni PY, et al. Application of DNA barcoding in cannabis identification[J]. Guihaia, 2014, 34(4): 552—556

DNA 条形码技术在毒品原植物大麻鉴定中的应用

宋炳舸¹, 杨雪莹², 倪萍娅³, 裴黎^{2*}, 张颖², 徐小玉²

(1. 中国公安大学, 北京 100038; 2. 公安部物证鉴定中心, 北京 100038; 3. 杭州市公安局上城区分局, 杭州 311200)

摘要: 准确鉴定毒品原植物大麻的种属及品种具有重要的理论和实践意义。为了探讨 DNA 条形码技术用于毒品原植物大麻种属鉴定及品种鉴定的可行性, 该研究以 60 份大麻原植物(分别采自内蒙、黑龙江、陕西延安、陕西榆林 4 个地区的栽培大麻雌雄各 6 株及新疆玛纳斯地区的野生大麻雌雄各 6 株)为材料, 通过从其叶片中提取的 DNA 为模版, 利用核糖体 DNA 基因间隔区的通用引物 ITS2 和叶绿体 DNA 的通用引物 psbA-trnH 进行 PCR 扩增, 对扩增片段进行双向测序, 将测序结果进行人工矫正和比对。结果显示:所有大麻样本的 ITS2 扩增片段序列没有变异完全一致, 但 psbA-trnH 扩增片段变异较大共检测出 8 种 cpDNA 单倍型, 用 MEGE5.1 软件计算种间遗传距离, 并构建 NJ 系统聚类树可以有效把这五个地区的大麻样本区别开来, 因此证明 DNA 条形码技术在毒品原植物大麻的种属鉴定方面具有可行性, 但其用于大麻的种属鉴定的准确性、可靠性及在其来源地鉴定及品种鉴定中的可能性还有待进一步深入地研究。

关键词: DNA 条形码; 大麻; 种属鉴定**中图分类号:** 795 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2014)04-0552-05

Application of DNA barcoding in cannabis identification

SONG Bing-Ke¹, YANG Xue-Ying², NI Ping-Ya³,PEI Li^{2*}, ZHANG Ying², XU Xiao-Yu²

(1. Chinese People's Public Security University, Beijing 100038, China; 2. Institute of Forensic Science, Ministry of Public Security, Beijing 100038, China; 3. ShangCheng District Branch of Hangzhou Public Security Bureau, Hangzhou 311200, China)

Abstract: To study the feasibility of DNA barcoding on cannabis species identification, DNA were extracted from sixty cannabis plants' leaves(cultivated cannabis from Inner Mongolia, Heilongjiang, Shanxi Yan'an and Yulin, wild cannabis from Xinjiang Manas, six male and female cannabis from each region), used ribosomal DNA intergenic region ITS2 universal primers and cpDNA psbA-trnH primer for PCR amplification, then sequenced in both directions, the results compared to manual correction and finally for Blast comparison. ITS2' amplified sequences of all samples were completely consistent, but psbA-trnH' amplified sequences varied greatly, which were detected eight kinds of cpDNA haplotypes. MEGE 5.1 software was used to calculate the genetic distance between species, and build NJ phylogenetic trees which could effectively separate the five regions of cannabis samples. So DNA barcoding on cannabis species identification was proved to have viability, but the accuracy, reliability and possibilities of identification of its origin and species need further research.

Key words: DNA barcoding; cannabis; species identification

收稿日期: 2014-01-19 修回日期: 2014-03-08

基金项目: 公安部物证鉴定中心基本科研业务费专项(2010JB002)

作者简介: 宋炳舸(1987-), 女, 河南禹州市人, 硕士研究生, 主要从事法医遗传学的研究, (E-mail) sbk1987@126.com。

* 通讯作者: 裴黎, 主任法医师, 硕士生导师, 主要从事分子生物学与法医遗传学研究, (E-mail) peili128@sina.com。

大麻(*Cannabis sativa*)为被子植物门双子叶植物纲蕁麻目大麻科大麻属1~2年生雌雄异株的草本植物。大麻属植物包括栽培大麻、印度大麻和野生大麻三个主要品种及在长期生物进化过程中产生的大麻变种和亚种(卢延旭等,2007)。大麻植物所含的四氢大麻酚(THC)具有致幻作用,所以大麻被列为与海洛因、可卡因并列的三大毒品之一(谢幸媚等,2000)。不同品种大麻中 THC 的含量有很大的差别且大麻是许多国家的重要经济作物,包括我国在内的许多国家根据大麻体内 THC 含量的高低,将大麻分为工业大麻、毒品大麻和中间型大麻,其中后两种被列为严厉打击的对象。然而,在高额利润的驱使下,全球范围的大麻种植和非法交易活动屡禁不止。与此同时,在大麻犯罪案件中缴获成批未加工的大麻植物(如整株植物、种子等)的情况也屡见不鲜,在法庭科学中,虽然可用传统的形态学方法对大麻进行鉴定,用理化方法如常规化学法、毛细管电泳法、薄层色谱法等对大麻毒性成分进行测定,但这些方法都有很大的局限性,对检材的要求较高且很难或根本无法区分大麻的品种及来源。为了有效打击大麻毒品犯罪,法庭科学急需寻找快速准确对大麻进行种属鉴定和品种鉴定的新方法。

DNA 条形码(DNA barcoding)这一概念由加拿大分类学家 Paul Hebert 于 2003 年首次提出,随后在世界范围内受到了广泛关注,成为生物学研究新热点。它是通过对一个或多个标准目的基因片段进行序列分析达到物种鉴定目的,是分类学中辅助物种鉴定的新技术。目前该技术已成为生物分类学研究中的一个新方向,在医药、生态、环境、食品等领域有广泛应用(Naciri et al., 2012; Kress et al., 2012)。植物 DNA 条形码筛选区域主要集中在叶绿体和核糖体内转录间隔区,主要包括 rpoB, rpoCl, matK, rbcL, UP, trnH-psbA, atpF-atpH, psbK-psbI 及核基因 ITS 等(Kress et al., 2012; Li et al., 2011; 任保青等,2010)。但目前尚未有获得广泛认同的植物 DNA 条形码。2009 年在墨西哥召开的第三届 DNA 条形码国际学术大会上,与会者达成共识一致建议选择进化速率较快的 ITS 和 trnH-psbA, 探讨它们在陆地植物中的通用性、分辨率和适合程度。ITS 即核糖体 DNA 基因间隔区,组成该片段的不同部分(ITS1、ITS2 和 5.8S)序列变异差别较大,ITS1 片段生物识别率高于 ITS2,但研究发现 ITS2 片段扩增成功率高于 ITS1,而且植物叶绿

体 DNA 属单系遗传(Chen et al., 2010; Yao et al., 2010; Schoch et al., 2012)。通过全面综合考虑,我们最终选择 ITS2 和 psbA-trnH 作为初步研究我国不同地区大麻变异情况的对象,对 DNA 条形码技术在毒品原植物大麻鉴定中的应用可行性进行了初步研究,以期为今后进一步的工作奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

采自内蒙古、黑龙江、新疆玛纳斯和陕西延安、陕西榆林五个地区的大麻样本 60 份,每个地区雌雄各六份,均由公安部物证鉴定中心提供。

1.2 大麻全基因组 DNA 的提取与定量

取干叶 10 mg,利用植物 DNA 提取试剂盒(Tiangen Biotech Co., China)提取大麻全基因组 DNA,用 NanoDrop_ND-2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE) 核酸定量仪进行定量,定量结果见表 1。

表 1 大麻全基因组 DNA 定量结果

Table 1 Quantitative results

样本采集地 Sample collecting zone	OD260/280	平均浓度(ng/μL) Mean concentration
新疆玛纳斯 Manasi Xinjiang	2.01	85.4
内蒙古 Inner Mongolia	1.98	110.2
黑龙江 Heilongjiang	1.75	93.6
陕西延安 Yan'an	1.81	100.1
陕西榆林 Shanxi Yulin	1.87	112.2

1.3 PCR 扩增与琼脂糖凝胶电泳

采用核糖体 DNA 基因间隔区的通用引物 ITS2(朱英杰等,2010)和叶绿体 DNA 的通用引物 psbA-trnH(刘莹等,2013)进行扩增(引物序列见表 2,由上海英潍捷基公司合成),扩增反应在 eppendorf 扩增仪上进行,PCR 反应总体积为 50 μL,内含 2×PCR Master mix 25 μL,正反向引物(10 mmol/L)各 1 μL,去离子水 23 μL,模板 DNA 1 μL。PCR 反应程序为 94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,58 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 45 s,共 30 个循环;72 °C 终延伸 20 min。PCR 产物用 2% 琼脂糖进行凝胶电泳检测。

1.4 扩增产物测序

对扩增产物进行双向测序,测序反应由上海生物工程公司完成。

表 2 ITS2 及 psbA-trnH 通用引物序列

Table 2 The sequences of universal primer ITS2 and psbA-trnH

引物编号	Primer No.	引物序列	Primer sequences
ITS2 psbA-trnH	S2F (正向引物)	ATGCGATACTGGTGTGAAT	
	S3R (反向引物)	GACGCCCTCCAGACTACAAT	
	fwdPA (正向引物)	GTTATGCATGAACGTAATGCTA	
	RevTH (反向引物)	CGCGCAATGGTGGATTACAATCC	

1.5 测序结果的拼接与分析

用 DNAMAN version 6 软件及 Chromas LITE version 2.01 软件完成序列拼接,用 MEGA 5.1 软件进行 60 份大麻样本的序列比对并进行变异位点分析,然后登陆 <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> 网站,将所得序列进行 blast 比对,并利用 MEGA 5.1 进行多重比对,基于 Kimura-2-parameter(K2P)双参数模型计算遗传距离,并用邻接法(neighbour-joining)构建系统聚类树(NJ 树),同时以 bootstrap(自展支持率 1 000 次)重复检验各分支的支持率。

2 结果与分析

2.1 扩增结果

实验结果表明 ITS2 和 psbA-trnH 对 60 份大麻样本的扩增及测序成功率均为 100%。

2.2 测序及序列比对

通过测序得引物 ITS2 和 psbA-trnH 的完整扩增片段 DNA 序列,使用 NCBI 数据库中的 Blast 工具进行搜索,比对后可以确定与该段序列相似度最高的匹配均为大麻核糖体和叶绿体基因,匹配度分别达到 100% 和 99%,序列号分别为 KC292629.1 和 KC578820.1。说明扩增序列即为所需要的大麻核糖体和叶绿体基因的一部分。

2.3 序列变异比较

应用 MEGE5.1 进行序列对比,发现采自 5 个不同地区的 60 份大麻样本的 ITS2 引物扩增区域测序所得的序列长度均为 446 bp,且所有大麻样本的序列完全一致,不含 Poly 结构,未发现变异位点;引物 psbA-trnH 扩增片段的实际长度为 404 bp,共发现 11 个单一多态性变异位点(分别为 1、12、40、47、202、284、330、377、381、391、404),占总分析位点

的 2.72%,由于 cpDNA 常被看作是一个独立的遗传单位,在细胞分裂时不经受重组(Schaal *et al.*, 1998)。故对来自五个地区来源的 60 份大麻样本可定义 8 种 cpDNA 单倍型(表 3),其中新疆玛纳斯地区的 12 份雌雄标本序列完全一致为 HA 型,黑龙江地区的六份雌性标本序列完全一致均为 HA 型、雄性均为 HB 型,内蒙地区的雌性序列完全一致均为 HC 型、雄性均为 HD 型,陕西延安地区的雌性序列完全一致为 HE 型、雄性为 HF 型,陕西榆林地区的六份雌性标本序列完全一致为 HG 型、雄性为 HH 型。分析结果(图 1)。

表 3 大麻的变异位点与单倍型

Table 3 Variation position and haplotype of cannabis sativa

引物序列长度 Length of Primer sequences	H A	H B	H C	H D	H E	H F	H G	H H
1 bp	C	C	C	A	C	A	C	C
12 bp	C	T	C	C	C	C	C	T
40 bp	C	T	C	C	C	C	C	C
47 bp	T	A	T	T	T	T	T	T
202 bp	G	G	G	G	A	G	G	G
284 bp	T	A	T	T	A	T	T	T
330 bp	A	A	C	C	C	A	A	A
377 bp	C	C	C	G	C	C	C	C
381 bp	T	T	T	G	T	T	T	T
391 bp	T	G	G	G	T	T	T	T
404 bp	G	G	G	G	G	T	T	G

!Domain=Data:

```
[ 223333 4]
[ 144083789 0]
[ 1207240711 4]
[ 黑龙江雌性 CCCTGTACTT G
[ 黑龙江雄性 . TTA. A... G .
[ 内蒙雌性 ..... C.. G .
[ 内蒙雄性 A.... CGGG .
[ 新疆雌性 ..... .
[ 新疆雄性 ..... .
[ 延安雌性 .... AA.... .
[ 延安雄性 A..... T
[ 榆林雌性 ..... T
[ 榆林雄性 . T..... .
```

图 1 psbA-trnH 序列的变异位点
(“.”表示与黑龙江雌性碱基相同)

Fig. 1 Variation position of psbA-trnH sequence

2.4 遗传距离分析

将五个地区的大麻序列进行分析,根据碱基变异位点的情况,用 Kimura-2-Parameter 距离模式计算的遗传距离(表 4)。五个地区的大麻样本遗传距

表 4 五个地区大麻遗传距离分析
Table 4 Genetic distance analysis of Cannabis in five regions

	黑龙江雌性 Heilongjiang female	黑龙江雄性 Heilongjiang male	内蒙雄性 Inner Mongolia male	内蒙雌性 Inner Mongolia female	新疆雌性 Xinjiang female	新疆雄性 Xinjiang male	延安雌性 Yan'an female	延安雄性 Yan'an male	榆林雌性 Yulin female
黑龙江雌性 Heilongjiang female	0.0125								
内蒙雌性 Inner Mongolia female	0.005	0.0125							
内蒙雄性 Inner Mongolia male	0.0125	0.0201	0.0075						
新疆雌性 Xinjiang female	0	0.0125	0.005	0.0125					
新疆雄性 Xinjiang male	0	0.0125	0.005	0.0125	0				
延安雌性 Yan'an female	0.005	0.0125	0.01	0.0175	0.005	0.005			
延安雄性 Yan'an male	0.005	0.0175	0.01	0.0125	0.005	0.005	0.01		
榆林雌性 Yulin female	0.0025	0.015	0.0075	0.015	0.0025	0.0025	0.0075	0.0025	
榆林雄性 Yulin male	0.0025	0.01	0.0075	0.015	0.0025	0.0025	0.0075	0.0075	0.005

离在 0.000~0.0201, 平均遗传距离为 0.008。其中黑龙江的雄性大麻与内蒙的雄性大麻最大, 为 0.0201, 新疆的雄性雌性和黑龙江的雌性最小。

2.5 系统发育邻接树分析

从图 2 可以看出, 新疆的野生雌雄大麻与黑龙江的雌性大麻聚为一支, 陕西延安和榆林及黑龙江地区的雄性大麻聚为一支, 内蒙的雌性与雄性大麻聚为一支, 陕西延安和榆林的雌性大麻聚为一支。说明 psbA-trnH 条形码序列可用于不同地域大麻雌雄间的鉴别分析。

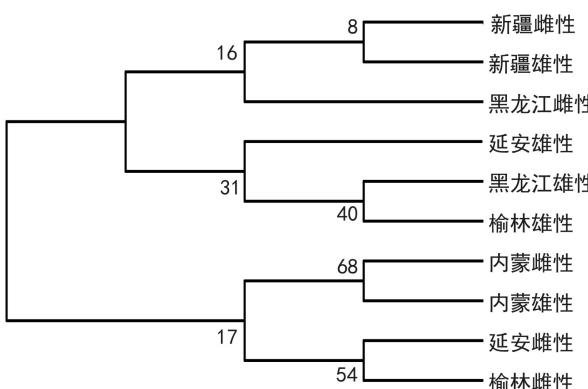


图 2 基于 psbA-trnH 条形码序列构建的五个地区雌雄大麻间的 NJ 系统进化树

Fig. 2 NJ phylogenetic tree of five regions between male and female cannabis based on psbA-trnH barcode sequences

3 讨论

大麻是一种集造纸、纺织、食用、药用等作用于一身的经济价值很高的作物, 具有抑制杂草生长、适应环境能力强等特点, 有利于戈壁滩涂和贫瘠土地的绿化与开发利用。本实验结果表明, 五个地区的大麻样本的 ITS2 引物扩增区域测序所得的序列完全一致, 说明利用核糖体通用引物 ITS2 不能对不同地域来源的大麻种属进行鉴定, 虽然如此, 但通过 blast 比对却可以把大麻鉴定出来; 而采用 psbA-trnH 条形码序列对大麻研究的结果表明, 其不但可以把不同地域来源的大麻鉴定出来还可以把大麻的雌性与雄性、野生大麻与栽培大麻分辨出来。实验结果还表明, 不同地区的雌雄大麻的 cpDNA 单配体不同, 而且由于大麻通常是雌雄异株, 雄性植株的纤维质量高于雌性植株, 而雌性植株的有毒成分高于雄性植株, 雄株比雌株先成熟, 对机械化的收割造成不便; 雌雄株在幼苗时期较难分辨, 只有当其生殖器官原基开始发育时才能正确识别(李仕金等, 2008)。基于此, 本研究一方面可以为大麻犯罪案件中查找毒品来源、铲除毒品种植基地提供线索, 有利于打击个人及集团式的大麻贸易活动; 另一方面也为大麻育种提供了可能, 而且有助于培育出低毒、高纤维利用价值的雌雄同株的大麻新品种, 以造福人类和社会。

4 结论

本实验是在有限的大麻标本中得出的结论,故为了更好更精确地验证DNA条形码技术对毒品原植物大麻的鉴定还需要一方面加大同一地区大麻雌雄植株的采样,另一方面加大更多地区大麻品种的研究;另外也需要进一步深入筛选更多更合适的条形码序列。总的来说,DNA条形码技术有望成为将来毒品案件刑事侦查和检验鉴定的新方法。

致谢 本论文由公安部物证鉴定中心基本科研业务经费项目(2010JB002)资助,并得到了公安部物证鉴定中心法医物证检验处的各位老师的指导和帮助,在此深表感谢!

参考文献:

- Chen SL, Yao H, Han JP, et al. 2010. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species[J]. *PLoS one*, **5**(1):8 613
 Kress WJ, Ericks DL. 2012. DNA Barcodes: Methods and Protocols[M]. Berlin: Springer, 858:3–8
 Li DZ, Liu JQ, Chen ZD, et al. 2011. Plant DNA barcoding in China[J]. *J Syst & Evol.*, **49**(3):165–168
 Li SJ(李仕金), Xin PY(辛培尧), Zhou J(周军), et al. 2008. Progresses on research of sexual differentiation of *Cannabis sativa L.* (大麻性别研究进展)[J]. *Plant Fiber Sci Chin*(中国麻业学), **30**(2):110–113

(上接第 569 页 Continue from page 569)

- Maxim.(狗枣猕猴桃果实发育的解剖学观察)[J]. *Chin Bull Bot*(植物学报), **19**(4):469–476
 Chen YP(陈亚萍), Zhang YC(章英才), Jing HX(景红霞), et al. 2013. The characteristic of photosynthesis and the growth of fruit of *Ziziphus jujuba* Mill cv. lingwuchangzao(灵武长枣光合特性及果实生长发育特征)[J]. *Northern Hortic*(北方园艺), (19): 1–4
 Liu GC(刘国成), Ma HY(马怀宇), Lv DG(吕德国), et al. 2012. Research on the change of ‘Hanfu’ apple fruit anatomic structure and quality during storage(‘寒富’苹果贮藏期果实解剖结构及品质变化研究)[J]. *Northern Hortic*(北方园艺), (15): 1–4
 Wang XL(王勋陵). 1974. A preliminary study of the developmental anatomy of Chinese jujube fruit(枣果发育解剖学的初步观察)[J]. *Acta Bot Sin*(植物学报), **16**(2):161–169
 Xie MH(颉敏华), Zhang HM(张永茂), Li SQ(李守强), et al. 2008. Post harvest fresh-keeping storage characteristics of ‘lingwuchangzao’ (*Ziziphus jujuba* Mill.) (灵武长枣采后保鲜贮藏特性研究)[J]. *Acta Bot Bor-Occ Sin*(西北植物学报), **28**(5): 1 031–1 035
 Yang J(杨军), Zhang YC(章英才), Su WD(苏伟东), et al. 2011. Isolation and assaying of polysaccharide in *Ziziphus jujuba* Mill cv. lingwuchangzao(灵武长枣多糖含量的测定研究)[J]. *Northern Hortic*(北方园艺), (14):35–37

- Lu YX(卢延旭), Dong P(董鹏), Cui XG(崔晓光), et al. 2007. Difference between industrial hemp and marijuana hemp and industrial hempcs use value(工业大麻与毒品大麻的区别及其可利用价值)[J]. *Chin Pharmacol Bull*(中国药理学通报), **23**(8):1 112–1 114
 Liu Y(刘莹), Zhang AS(张安世), Zhao LX(赵利新). 2013. The phylogenetic relationship of some bryophytes based on trnH-PsbA gene(基于 trnH-PsbA 序列的部分苔藓植物亲缘关系分析)[J]. *Hubei Agric Sci*(湖北农业科学), **52**(20):5 057–5 059
 Naciri Y, Caetano S, Salamin N. 2012. Plant DNA barcodes and the influence of gene flow[J]. *Mol Ecol Resour*, **12**(4):575–580
 Ren BQ(任保青), Chen ZD(陈之端). 2010. DNA barcoding plant life(植物 DNA 条形码技术)[J]. *Chin Bull Bot*(植物学报), **45**(1):1–12
 Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, et al. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi[J]. *PNAS*, **109**(16):6 241–6 246
 Schaal BA, Hayworth DA, Olsen KM, et al. 1998. Phylogeographic studies in plants: problems and prospects[J]. *Mol Ecol*, **7**(4): 465–474
 Xie XM(谢幸媚), Wu KL(吴坤龙), Li JY(李俊亿), et al. 2000. The application and evaluation of plant DNA testing in criminal investigations(植物 DNA 鉴定在犯罪侦查上之应用与评估)[J]. *Foren Sci*(刑事科学), **49**:1–7
 Yao H, Song J, Liu C, et al. 2010. Use of ITS2 Region as the universal DNA Barcode for plants and animals [J]. *PLoSone*, **5**:13 102
 Zhu YJ(朱英杰), Chen SL(陈士林), Yao H(姚辉), et al. 2010. DNA barcoding the medicinal plants of the genus *Paris*(重楼属药用植物 DNA 条形码鉴定研究)[J]. *Acta Pharm Sin*(药学学报), **45**(3):376–382
 Yang SJ(杨淑娟), Zhang YC(章英才), Zheng GQ(郑国琦). 2010. Comparative study on dissected structures of normal fruit and cracking ones of Lingwu Long-jujube(灵武长枣正常果与裂果解剖结构的比较研究)[J]. *Northern Hortic*(北方园艺), (22): 15–18
 Yang SJ(杨淑娟), Zheng GQ(郑国琦), Zhang YC(章英才). 2011. Ultracytochemical localization of Ca^{2+} in the normal fruits and cracking ones of Lingwu Long-jujube(灵武长枣正常果及裂果中 Ca^{2+} 的细胞化学定位研究)[J]. *Acta Bot Bor-Occ Sin*(西北植物学报), **31**(1):0084–0088
 Yu JF(喻菊芳), Wei TJ(魏天军), Chen WJ(陈卫军). 2008. The research of germplasm resources and the study on variety selection of *Ziziphus jujuba* Mill cv. lingwuchangzao(灵武长枣种质资源调查和品种选优研究)[J]. *Chin Fruits*(中国果树), (1): 56–57
 Yu JF(喻菊芳), Zhu LC(朱连成), Wei TJ(魏天军). 2004. Ningxia (Lingwu) Long-jujube textual research(宁夏(灵武)长枣考证)[J]. *Ningxia J Agric For Sci Technol*(宁夏农林科技), (5):31–32
 Zhang YC(章英才), Su WD(苏伟东), Yang J(杨军). 2012. The store localization characteristics of polysaccharide in *Ziziphus jujuba* Mill cv. lingwuchangzao(灵武长枣多糖积累分布特征研究)[J]. *Northern Hortic*(北方园艺), (21):7–11