

巴戟天与常见混伪品的 rDNA-ITS 序列分析及其分子鉴定

丁 平, 方 琴

(广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510405)

摘要:目的 比较巴戟天与常见混伪品之间的 rDNA-ITS 碱基序列的差异及其规律, 同时为巴戟天及混伪品的指纹图谱鉴别提供分子标记。方法 对巴戟天及其常见混伪品的 rDNA-ITS 进行了 PCR 扩增、测序, 并运用 CLUSTAL X、MEGA 软件对该区进行序列分析。结果 测定了巴戟天及其混伪品的 rDNA-ITS 区序列, 包括 ITS1、5.8S 和 ITS2 全长序列以及 18S、26S 部分序列。巴戟天与假巴戟天、羊角藤在 ITS1 和 ITS2 区的差异性分别为 2.9%~5.8% 和 2.9%~4.2%, 而与虎刺在 ITS1 和 ITS2 区的差异性则为 21.2% 和 18.9%。根据 ITS 序列特征构建的系统树, 混伪品假巴戟天与羊角藤首先聚类, 然后与巴戟天聚在一起, 而虎刺则单独聚为一支。结论 rDNA-ITS 序列可作为巴戟天与混伪品的一种较好的分子指纹图谱的标记方法。

关键词:巴戟天; 混伪品; 核糖体 DNA 内转录间隔区

中图分类号:R282.710.3

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2005)06-0908-04

Ribosomal DNA-ITS sequence analysis and molecular identification of *Morinda officinalis* and its counterfeit species

DING Ping, FANG Qin

(College of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

Abstract: Objective To compare the rDNA-ITS differentiation and its regulation between *Morinda officinalis* and its counterfeit species, and provide DNA molecular markers for the fingerprint identification of them. **Methods** The rDNA-ITS regions of *M. officinalis* and its counterfeit species were amplified and sequenced, then analyzed by means of CLUSTAL X and MEGA softwares. **Results** The internal transcribed spacers (ITS) including ITS1, 5.8S, ITS2, and partial 18S and 26S were determined. In DNA DIST analysis, the range of diversity among *M. officinalis* and *M. shughuaensis*, *M. umbellata* was 2.9%—5.8% and 2.9%—4.2% based on ITS1 and ITS2; the range of diversity between *M. officinalis* and *Damnacanthus indicus* was 21.2% and 18.9% based on ITS1 and ITS2. Phylogenetic tree based on ITS and 5.8S sequence data indicated the *M. umbellata* and *M. shuanghuaensis* were closely related then with *M. officinalis*, while *D. indicus* was monophyletic group. **Conclusion** The rDNA-ITS sequence is a better molecular marker for identification of *M. officinalis* and its counterfeit species.

Key words: *Morinda officinalis* How; counterfeit species; ribosomal DNA-internal transcribed spacers (rDNA-ITS)

巴戟天别名鸡肠风(广东、广西)、鸡眼藤、黑藤钻、糠藤、三角藤(广西)、兔儿肠、兔仔肠、猫肠筋(福建)。巴戟天为常用中药, 是著名的“四大南药”之一。《中华人民共和国药典》收录的巴戟天来源于茜草科巴戟天属植物巴戟天 *Morinda officinalis* How 的根, 具有补肾壮阳、强筋骨、祛风湿之功效。其主要活性成分为蒽醌、环烯醚萜类、低聚糖、多糖等^[1]。巴戟天属(*Morinda* Linn.) 植物在全世界约有 100 种, 分

布于热带、亚热带和温带地区, 尤以亚洲和大洋洲最多, 美洲和非洲有少数。我国产约 26 种、6 变种, 分布于西南部到东南部, 以及台湾和香港地区^[2]。由于近几年巴戟天有效成分的深入研究, 巴戟天作为药食两用的资源得到了广泛的开发和利用。但由于栽培与种植仍满足不了目前的需求, 市场上屡屡出现混伪品, 如假巴戟天、羊角藤、虎刺等, 这些药材和原植物在外形上与巴戟天极为相近, 尤其是同属的假

收稿日期: 2004-06-08

基金项目: 广东省科技计划项目(2003C34401); 广东省自然科学基金项目(04010057)

作者简介: 丁 平(1965—), 女, 河南汝南人, 研究员, 博士, 主要从事中药资源及中药质量标准的研究。Tel: (020) 39358063

巴戟天、羊角藤,更是容易以假乱真,因此,解决中药材的来源问题仍是目前急需解决的问题,也是中药走向现代化的瓶颈问题。而近几年分子生物学中 DNA 分子遗传标记技术的研究则为解决该问题提供了客观而有效的手段。DNA 分子标记技术用于中药材鉴定和品质评价等方面的研究已有很多的报道,关于植物核糖体 DNA 中的内转录间隔区(ITS)序列测定已广泛用于中药材近缘属间,属内以及种内居群间的差异性研究^[3,4]。但在巴戟天属植物中尚未见有这些方面的研究,因此本研究通过对 rDNA-ITS 序列差异分析,对巴戟天及其近缘植物和常见混伪品的遗传关系作深入的研究,并为制定巴戟天分子指纹图谱以及准确进行巴戟天及混伪品的鉴别提供客观依据。

1 材料与方法

1.1 材料:材料来源见表 1,所有材料均为新鲜叶片,以硅胶干燥,笔者经形态鉴定确定其学名。

1.2 DNA 提取和检测:参照 Plant DNA Isolation Kit 实验步骤改进,具体如下:植物叶片经蒸馏水洗净后剪碎,在钵体中用液氮冷却碾碎成细粉。取 100 mg 加入 6 倍预热至 60 ℃ 的 CTAB 提取缓冲液,10 μL 蛋白酶 K,4 μL 核糖核酸酶 A 及 10 μL 2-ME 水浴温育 30 min。加入等体积抽提液氯仿-异丙醇(24:1)抽提,15 000×g 离心 10 min。取上清液加 2/3 体积的异丙醇及 1/10 体积的 3 mol/L NaAc,完全混匀,0 ℃ 放置 20 min,以 10 000×g 离心 10 min,弃上清液,用 80% 和 70% 乙醇洗 DNA 两次,室温干燥 30 min,加适量 TE 缓冲液溶解 DNA,存于 4 ℃ 待用。取 5 μL 提取的 DNA 于 0.8% 琼脂糖凝胶(含 1 μg/mL EB)上,用 0.5×TBE 电泳缓冲液在 10 V/cm 电泳 1 h 后,琼脂糖凝胶外的 DNA 谱带通过 EB 染色后,在紫外光(254 nm)下观察抽提结果。

1.3 ITS1 和 ITS2 的扩增、纯化和测序:扩增 ITS 序列引物依据文献设计^[5,6]。引物序列为:正向 AGA AGT CGT AAC AAG GTT TCC GTA GG,反向 TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC。ITS 整段扩

增,或分别扩增 ITS1 和 ITS2,分别扩增时使用 1 对内引物,分别为:正向 GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC,反向 GAT GCG AGA GCC GAG ATA TCC GTT。取约 10 ng 样品 DNA,加入 0.2 mmol/L dNTPs,0.2 μmol/L 引物,1.5 mmol/L MgCl₂,1 U Taq DNA 聚合酶(上海生工公司)及 1× 缓冲液,加入 ddH₂O 使总体积为 20 μL,置于 PE480 型 PCR 扩增仪中,94 ℃、1 min 45 s 后,按下列参数进行 40 个循环:94 ℃、30 s,45 ℃、30 s,72 ℃、30 s,最后 72 ℃、7 min。用 1.5% 琼脂糖凝胶(含 1 μg/mL EB)电泳检测 PCR 扩增产物。在胶中回收、纯化 PCR 扩增片段(胶回收试剂盒,上海生工公司)或 PCR 产物直接纯化(PCR 产物纯化试剂盒,上海生工公司)后,用四色荧光标记的双脱氧链中止法测序(PE-ABI 377 全自动测序仪,上海鼎安生物科技有限公司),为保证序列的准确性,用 2 次 PCR 产物测序或用反向引物再测。

1.4 序列分析和系统发育树构建:所得序列用 CLUSTAL X(Version 1.8)同源对齐,必要时用手工排序;ITS1 和 ITS2 的位置参照其二级结构和文献确定^[6]。用 MEGA(Version 2.1)分别计算各样品 ITS 序列的差异性(Kimura 2-parameter),用最大简约法(maximum parsimony,MP)和邻接法(neighbor-joining,NJ)构建系统发育树,并以 bootstrap 作 100 次可信度分析。将序列鉴定结果与形态鉴定结果核对,确认后在 GenBank 登记注册,其注册登记号见表 1。

2 结果

本研究测得巴戟天属 3 种植物和虎刺属一种常见混伪品的片段包括 ITS1,5.8S 和 ITS2 全长序列以及 18S,26S 部分序列,长度为 691~700 bp。从图 1 中可见,部分 18S,26S 序列长度分别为 61 和 68 bp,5.8S 全长为 131 bp,编码区序列严格保守,而 ITS1 和 ITS2 序列长度和碱基组成随种类不同而有差异,ITS1 和 ITS2 长度和 GC 含量详见表 1 和图 1。

本研究中巴戟天及其常见混伪品的 ITS1 和

表 1 巴戟天及其 3 种混伪品 ITS1 和 ITS2 序列 G+C 含量、长度及在 GenBank 的注册登记号

Table 1 G+C contents and lengths of ITS1 and ITS2 of *M. officinalis* and three counterfeit species and their registered numbers in GenBank

名 称	凭证标本	产 地	采集期	ITS1		ITS2		注册登记号
				长度/bp	G+C/%	长度/bp	G+C/%	
巴戟天 <i>M. officinalis</i>	2001	广东德庆	2003-08-20	181	69.61	255	69.02	AY514063
假巴戟天 <i>M. shuanghuaensis</i>	2501	广东从化	2003-07-25	180	70.00	255	69.02	AY514062
羊角藤 <i>M. umbellata</i>	2601	广州华南植物所	2003-09-26	180	70.55	260	69.62	AY514060
虎刺 <i>D. indicus</i>	2602	广州华南植物所	2003-09-26	181	62.98	250	68.80	AY514061

	*18S	*ITS1
2601	AGAAGTCGTA ACAAGGTTTC CGTAGGTGAA CCTGCGGAAG GATCATTGTC GAATCCTGCC CGA-CGAACG ACCGCGAACC	
2501	AGAAGTCGTA ACAAGGTTTC CGTAGGTGAA CCTGCGGAAG GATCATTGTC GAATCCTGCC CGA-CGAACG ACCGCGAACC	
2001	AGAAGTCGTA ACAAGGTTTC CGTAGGTGAA CCTGCGGAAG GATCATTGTC GAATCCTGCC CGAACAAACG ACCGCGAACA	
2602	AGAAGTCGTA ACAAGGTTTC CGTAGGTGAA CCTGCGGAAG GATCATTGTC GAATCCTGCC CTAGCAGACC ACTGCGAACA	
	CGTTGA-ACA ACCGCCGGGC GCGGCGGGC GCGGGAGACC CGCCCGTCG GCTGCCCGAG CCCAACTTAA CTCGCCGGGC	
	CGTTGA-ACA ACCGCCGGGC GCGGCGGGC GCGGGAACC CTGCCCGTCG GCTGCCCGAG CCCAACTTAA CTCGCCGGGC	
	CGTTGA-ACA ACTGCCGGGC GCGGCGGGC GCGGGAACC CGCCCGCCG GCTGCCCGAG CCCAACCTAA CTCGCCGGGC	
	CGTTAACGAA ACTGCCGGAC GCGGCGGGC GCGGGAACC ACGCCCGTCG GCTCCCCA- CAAAACCAA CTATCGGCAC	
	GGAATGCGCC AAGGAATACT CAAACGGATG GCGGCGGCC CTGCGGCTTC CGCGGGCGA GCGAGCGTC TGATCGTTTA	
	GGAATGCGCC AAGGAATACT CAAACGGATG GCGGCGGCC CGCGGCTTC CGCGGGCGA GCGAGCGTC TGATCGTTTA	
	GGAATGCGCC AAGGAATACT CAAACGGATG GCGGCGGGC CGCGGCTTC CGCGGGCGA GCGAGCGTC TGATCGTTTA	
	GGAATGTGCC AAGAAATACT CAAACGGACC GTGCGGCTCC TCGCGGCTTC CGCGGGGGC GCGTGCCTC TGATCGCTTA	
	*5.8S	
	ACCAAAACGA CTCTCGGCAA CGGATATCTC GGCTCTCGCA TCGATGAAGA ACGTAGCGAA ATGCGATACT TGGTGTGAAT	
	ACCAAAACGA CTCTCGGCAA CGGATATCTC GGCTCTCGCA TCGATGAAGA ACGTAGCGAA ATGCGATACT TGGTGTGAAT	
	ACCAAAACGA CTCTCGGCAA CGGATATCTC GGCTCTCGCA TCGATGAAGA ACGTAGCGAA ATGCGATACT TGGTGTGAAT	
	ACAAACGA CTCTCGGCAA CGGATATCTC GGCTCTCGCA TCGATGAAGA ACGTAGCGAA ATGCGATACT TGGTGTGAAT	
	*ITS2	
	TGCAGAATCC CGTGAACCAT CGAGTTTTG AACGCAAGTT GCGCCCGAAG CCATTAGGCC GAGGGCACGT CTGCCTGGGC	
	TGCAGAATCC CGTGAACCAT CGAGTTTTG AACGCAAGTT GCGCCCGAAG CCATTAGGCT GAGGGCACGT CTGCCTGGGC	
	TGCAGAATCC CGTGAACCAT CGAGTTTTG AACGCAAGTT GCGCCCGAAG CCATTAGGCT GAGGGCACGT CTGCCTGGGC	
	TGCAGAATCC CGTGAACCAT CGAGTTTTG AACGCAAGTT GCGCCCGAAG CCATCAGGCC GAGGGCACGT CTGCCTGGGC	
	GTCACGCATC GCGTCGCCG CCCCTCCTCG CCTAGAAAT TCGACGGAC GGGGGTGAAG GAAGTTGGCC TCCGTGCCC	
	GTCACGCATC GCGTCGCCG CCCCTCCTCG CCTAGAAAT TCGACGGAC GGGGGTGAAG GATGTTGGCC TCCGTGCCC	
	GTCACGCATC GNGTCGCCG CCCCTCCTCG CCTAGGAAT TCGACGGG GGGGGTGAAG GATGTTGGCC CCGGTGCCC	
	GTCACGCACC GCGTCGTAC CCCC—CA CGTCCGGTC ACGGGCGAC GGGGATGAAG GATATTGGCC TCCGTGCCC	
	TCGCGGCGG GCGGCCTAA ACGCGAGTCC CCGGCCGGG ACGTCAAGAC GAGTGGTGGT TGAACCTTC AACTCGAGAG	
	CCGCGGCGG GCGGCCTAA ATGCGAGTCC TCGGCCGGG ACGTCAAGAC GAGTGGTGGT TGAACCTTC AACTCGAGAG	
	TCGCGGCGG GCGGCCTAA ATGCGAGTCC TCGGCCGGG ACGTCAAGAC GAGTGGTGGT TGAACCTTC AACTCGAGAG	
	CCGTGGCGG GCGGCCTAA ACGCGAGTTC CCGGACGGG ACGTCAAGAC GAGTGGTGGT TGAAGTCTC AACACGATTG	
	*26S	
	CCGTGAGAC GACGCCGAC GGGGAACCTT AACGACCTA GGGCTATCG CCCCTCTCG AGAGGAGCG CGAGCCTTCG	
	CCGTGAGAC GACGCCGAC GGGGAACCTT NACGACCTA GGGCTATCG CCCC—G AGAGGAGCG CGAGCCTTCG	
	CCGTGAGAC GACGCCGAC GGGGAACCTT AACGACCTA GGGCTGTCG CCCC—G AGAGGAGCG CGAGCCTTCG	
	CTGTGCGAC GACGCCGAC GGGGA-CTCT ACGGACCTA GAGACGAG CCCC—G AAAGGAGTCA CGATCCTTCG	
	ACCGGACCC CAGGTCAGG GGGATTACC GCTGAGTTTA AGCATATCAA TAAGCGGAGG AA	
	ACCGGACCC CAGGTCAGG GGGATTACC GCTGAGTTTA AGCATATCAA TAAGCGGAGG AA	
	ACCGGACCC CAGGTCAGG GGGATTACC GCTGAGTTTA AGCATATCAA TAAGCGGAGG AA	
	ACCGGACCC CAGGTCAGG GGGATTACC GCTGAGTTTA AGCATATCAA TAAGCGGAGG AA	

图 1 巴戟天及其常见混伪品的 ITS 序列排列

Fig. 1 Aligned ITS sequences of *M. officinalis* and its counterfeit species

ITS2 区序列差异性见表 2。表中 ITS1 和 ITS2 的差异性范围分别为 2.9%~26%, 2.9%~18.9%, 差异最小的均为 2 601 与 2 501 之间, 差异最大的出现在 2602 与其他 3 种之间。

表 2 巴戟天及其混伪品 rDNA-ITS 序列的差异
Table 2 Diversity of rDNA-ITS sequence between *M. officinalis* and its counterfeit species

标本	2601	2501	2001	2602
2601		0.029	0.042	0.183
2501	0.029		0.029	0.189
2001	0.058	0.052		0.189
2602	0.260	0.251	0.212	

* 下三角为 ITS1 的差异性, 上三角为 ITS2 的差异性

* down triangle is diversity of ITS1, up triangle is diversity of ITS2

根据序列特征用几种方法构建的系统发育树结果一致, bootstrap 可信度分析在 82% 以上(图 2)。混伪品假巴戟天与羊角藤首先聚类, 然后与巴戟天聚在一起, 而虎刺则单独聚为一支, 这与传统分类结果相一致, 巴戟天与混伪品假巴戟天、羊角藤均为巴戟天属植物。而虎刺为虎刺属植物, 与巴戟天的亲缘关系最远。

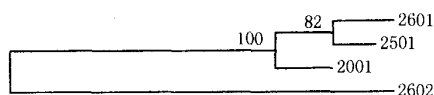


图 2 巴戟天及其常见混伪品的系统发育树
(分支上数值为靴带可信度)

Fig. 2 Dendrogram of *M. officinalis* and its counterfeit species (Numbers above branch are bootstrap percentages values by replication)

3 讨论

在本研究中, 由于巴戟天含有较多的植物多糖成分, 在 DNA 提取过程中存在一定的困难, 笔者改进方法, 用多种极性大的溶剂去除糖分, 从新鲜植物叶片中提取到了较高质量的总 DNA。利用通过引物进行 PCR 扩增, 可得到预期的 rDNA-ITS 片段。同时因高等植物 rDNA-ITS 区的拷贝数极多, 在使用过程中不易受材料总 DNA 降解的影响, 因此利用该方法较易提取到稳定的 DNA 产物。

经过 rDNA-ITS 基因测序表明, ITS1 和 ITS2 区的长度分别为: 巴戟天 181、255 bp, 假巴戟天 180、255 bp, 羊角藤为 180、260 bp, 虎刺为 181、250

bp。因所见混伪品中假巴戟天、羊角藤为巴戟天同属的植物, 差异较小(ITS1: 2.9%~5.8% 和 ITS2: 2.9%~4.2%)。而虎刺则为虎刺属(*Damnacanthus* Gaerth. f.) 的植物, 差异较大(ITS1: 21.2%~26% 和 ITS2: 18.3%~18.9%)。根据 rDNA-ITS 的序列比较可看出, 巴戟天及其以上几种常见的混伪品在 rDNA-ITS 序列中存在较大的差异, 且这种差别具有较好的稳定性, 并且通过以嫩叶反复测定后得到验证, 结果准确可靠。通过这些序列差异比较表明, rDNA-ITS 序列能较好地反映出巴戟天及其混伪品种间的差异, 因此可利用该方法找出一种较好的分子指纹图谱鉴别标记特征, 以用于巴戟天及其常见混伪品的准确鉴定。在应用过程中可将以上序列作为一个标准对照, 输入计算机库中, 利用巴戟天以其伪品的序列数据库及遗传分析软件, 通过待检药材的 rDNA-ITS 区序列测定, 与计算机数据库中巴戟天及其常见混伪品的 rDNA-ITS 区全序列进行分析比较, 只要所测基因序列与已知对照序列相一致, 就可以成功鉴别巴戟天及其混伪品的品种。

虽然 DNA 测序技术操作复杂, 但稳定性好, 准确性高, 且具有较好的重现性, 因此作为中药材真伪鉴别的指纹图谱分子标记方法, 具有客观和实用的特点, 并且随着 DNA 测序成本的降低, 此方法将会进一步得到推广和应用。

References:

- [1] Yoshikawa M, Yamaguchi S, Nishisaka H, et al. Chemical constituents of Chinese natural medicine, *Morinda Radix*, the dried roots of *Morinda officinalis* How: Structures of morindolide and morofficaloside [J]. *Chem Pharm Bull*, 1995, 43(9): 1462-1465.
- [2] Delectis Florae Reipublicae Popularis Sinicae, Agendae Academiae Sinicae Edita. *Flora Reipublicae Popularis Sinicae* (中国植物志)[M]. Tomus 71(2). Beijing: Science Press, 1999.
- [3] Zao Z L, Zhou K Y, Dong H, et al. Characters of nrDNA ITS region sequences of fruits of *Alpinia galanga* and their adulterants [J]. *Planta Med*, 2001; 67-68.
- [4] Ding X Y, Wang Z T, Xu H, et al. Database establishment of the whole rDNA ITS region of *Dendrobium* species of "Fengdou" and authentication by analysis of their sequences [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2002, 37(7): 567-573.
- [5] Takaiwa T J, Oono K, Sugiura M. Nucleotide sequence of the 17S-25S spacer region from rice rDNA [J]. *Plant Mol Biol*, 1985, 4: 355-359.
- [6] White T J, Bruns T, Lee S, et al. *Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics* [M]. California: Academic Press, 1990.