

基于 ITS2 序列的羌活及其混伪品的 DNA 条形码鉴定

孙稚颖¹, 陈士林^{2*}, 姚 辉², 宋经元²

1. 山东中医药大学药学院, 山东 济南 250355

2. 中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所, 中草药物质基础与资源利用教育部重点实验室, 北京 100193

摘要: 目的 对羌活及其混伪品进行分子鉴定, 以确保该药材的质量以及临床疗效。方法 利用 PCR 测序法, 对样品进行核基因 ITS2 片段扩增并双向测序, 所得序列经 CodonCode Aligner 拼接后, 用软件 MEGA 4.0 进行相关数据分析, 并构建邻接 (NJ) 树。利用已建立的 ITS2 数据库及其网站预测 ITS2 二级结构。结果 羌活与宽叶羌活 ITS2 序列长度均为 228 bp, 二者种内平均 K2P (Kimura-2-parameter) 遗传距离均远远小于其与混伪品的种间平均 K2P 遗传距离; 由所构建的系统聚类树图可以看出, 羌活与宽叶羌活均表现出了单系性, 而同时又与其他混伪品明显分开; 比较 ITS2 二级结构发现, 羌活基原植物与其混伪品在 4 个螺旋区的茎环数目、大小、位置以及螺旋发出时的角度均有明显差异。结论 ITS2 序列作为 DNA 条形码可以方便快捷地鉴别羌活及其混伪品, 为其种质资源鉴定及临床安全用药提供了重要分子依据。

关键词: 羌活; DNA 条形码; ITS2; 分子鉴定; 遗传距离

中图分类号: R282.12

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2012)03-0568-04

Identification of *Notopterygii Rhizoma et Radix* and its adulterants using DNA barcoding method based on ITS2 sequence

SUN Zhi-ying¹, CHEN Shi-lin², YAO Hui², SONG Jing-yuan²

1. College of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

2. Key Laboratory of Bioactive Substances and Resources Utilization of Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education, Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

Abstract: Objective To discriminate *Notopterygii Rhizoma et Radix* and its adulterants, and secure the quality and clinical curative effect of this medicinal material. **Methods** The second internal transcribed spacer (ITS2) of ribosomal DNA was amplified and sequenced by bidirectional sequencing of PCR products. Sequence assembly and consensus sequence generation were performed by using CodonCode Aligner. Phylogenetic study was performed using software MEGA 4.0 in accordance with Kimura-2-parameter (K2P) model, and the phylogenetic tree was constructed by using the neighbor-joining (NJ) method. The ITS2 secondary structure was predicted using ITS2 web server. **Results** The length of ITS2 sequence of *Notopterygium incisum* and *N. franchetii* was 228 bp. Their mean intraspecific genetic distance (K2P distance) was far lower than their mean interspecific genetic distance with the adulterants. In the cluster dendrogram, both *N. incisum* and *N. franchetii* showed monophyletic, and simultaneously distinguished from their adulterants. To compare the ITS2 secondary structure between the origin plant of *Notopterygii Rhizoma et Radix* and its adulterants, we noticed that it was obviously distinguished from the adulterants in terms of number, size, position of loop, and the angle of helix exertion. **Conclusion** ITS2 barcode could be used to identify *Notopterygii Rhizoma et Radix* and its adulterants effectively, and then provide important molecular evidence for the authentication of germplasm resources and clinic safety of medicinal use.

Key words: *Notopterygii Rhizoma et Radix*; DNA barcoding; ITS2; molecular identification; genetic distance

羌活 *Notopterygii Rhizoma et Radix* 是我国传统中藏羌医药体系中的常用重要药材, 具有解表散寒, 祛风除湿、止痛的功效。用于风寒感冒、头痛项强、风湿痹痛, 肩背酸痛等症。《中国药典》2010 年版记载其来源为伞形科植物羌活 *Notopterygium*

incisum Ting ex H. T. Chang 或宽叶羌活 *N. franchetii* H. de Boiss. 的干燥根茎和根^[1]。羌活与宽叶羌活均为我国高原分布的特有种, 由于近年来羌活野生资源采挖处于无序状态, 致使主要以营养繁殖的羌活野生资源处于严重的威胁之下, 1987 年羌

收稿日期: 2011-07-18

基金项目: 卫生行业科研专项 (200802043); 北京市科技计划项目 (D08080203640901)

作者简介: 孙稚颖 (1971—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为药用植物资源与系统分类。E-mail: szyww@126.com

*通讯作者 陈士林 E-mail: slchen@implad.ac.cn

活与宽叶羌活已被国务院《中国野生药材资源保护管理条例》列为三级保护物种(渐危种)^[2]。目前,应用羌活的中(藏)成药有 200 余种,用药需求量非常大,随着资源的短缺,伪劣药材常有出现,据报道^[3-4]羌活伪品主要为蓼科植物虎杖 *Reynoutria japonica* Houtt. 的干燥根茎和根、蔷薇科植物地榆 *Sanguisorba officinalis* L. 的干燥根、伞形科心叶棱子芹 *Pleurospermum rivulorum* (Diels) M. Hiroe. 及林当归 *Angelica sylvestris* L. 的干燥根或根茎。为了全面控制和提升羌活药材质量,有必要对羌活及其混伪品的鉴别进行深入研究。

关于羌活的鉴别研究,国内外报道较少,仅见性状鉴别和显微鉴别等^[5-6]。DNA 条形码是利用基因组中一段公认标准的 DNA 片段来对物种进行准确鉴定的新技术^[7-8],是当今生物分类和鉴定的研究热点和方向,该技术简便高效,不受样品的形态性状以及研究者的专业水平限制,避免了主观人为的判断和客观条件的影响,能真实地反映中药材的本来面貌,适用于对其进行真伪鉴定^[9-10]。目前,药用植物的 DNA 条形码虽未最终确定,但作为候选序列的 ITS2 片段以其特有的优势被广泛关注^[11-18]。该片段一般较短,有利于对发生降解的样品进行扩增^[19],同时 ITS2 片段在物种水平的变异较快,有更多的突变位点以区分不同的物种^[20],此外,ITS2 序列能够与保守的 5.8 S 和 28 S 区段形成特定的茎环二级结构,从而具有鉴别物种的分子形态特征。

本研究利用 ITS2 条形码对羌活及其混伪品进行了比较研究,旨在为该药材的质量控制、临床安全用药及合理开发利用提供分子依据。

1 材料与方法

1.1 材料

样品经中国医学科学院药用植物研究所林余霖副研究员鉴定,凭证标本保存于中国医学科学院药用植物研究所。实验样品及来自 GenBank 所下载序列,见表 1。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 样品均为硅胶干燥叶片,取样约 10 mg,用 DNA 提取研磨仪(Retsch MM 400,德国)研磨 1 min 后,利用植物 DNA 提取试剂盒(Tiagen Biotech Co., 中国)提取总 DNA。

1.2.2 PCR 扩增及测序 扩增、测序引物一致,正向为 5'-GCGATACTTG GTGTGAAT-3',反向为 5'-GACGCTTCTCCAGACTACAAT-3'。PCR 反应体积为 25 μ L,反应体系及扩增程序参照 Chen 等^[11]的研究方法。PCR 扩增产物经纯化后,使用 ABI 3730XL 测序仪双向测序。

1.2.3 数据处理 测序峰图利用 CodonCode Aligner V 3.0(CodonCode Co., 美国)校对拼接,去除引物区,获得严格一致性序列。对于网上所获得的 ITS 序列,使用基于隐马尔可夫模型的 HMMer 注释方法去除两端 5.8 S 和 28 S 区段获得 ITS2 间隔区序列^[21]。然后,将所有序列用软件 Molecular

表 1 样品来源

Table 1 Source of samples

编号	样品	采集地	标本号	GenBank 号
1	羌活 <i>N. incisum</i>	四川省康定县新都桥镇麦巴村康定(栽培)	PS2005MT01	JF755942
2	羌活 <i>N. incisum</i>	四川省道孚县各卡村(野生)	PS2005MT02	JF755946
3	羌活 <i>N. incisum</i>	四川省康定县折多山(野生)	PS2005MT03	JF755947
4	羌活 <i>N. incisum</i>	未知	未知	DQ278168
5	羌活 <i>N. incisum</i>	未知	未知	EU236180
6	羌活 <i>N. incisum</i>	未知	未知	GQ379335
7	宽叶羌活 <i>N. franchetii</i>	四川省康定县姑咱镇羊厂沟(栽培)	PS1215MT02	JF755943
8	宽叶羌活 <i>N. franchetii</i>	四川省道孚县各卡村(野生)	PS1215MT03	JF755947
9	宽叶羌活 <i>N. franchetii</i>	四川省阿坝州小金县(野生)	PS1215MT04	JF755944
10	宽叶羌活 <i>N. franchetii</i>	未知	未知	GQ379334
11	宽叶羌活 <i>N. franchetii</i>	未知	未知	AY038222
12	心叶棱子芹 <i>Pleurospermum rivulorum</i>	未知	未知	AY038219
13	林当归 <i>A. sylvestris</i>	未知	未知	U78474
14	虎杖 <i>R. japonica</i>	未知	未知	FJ514494
15	虎杖 <i>R. japonica</i>	未知	未知	EU808015
16	虎杖 <i>R. japonica</i>	未知	未知	AF040071
17	地榆 <i>S. officinalis</i>	重庆中药研究院药用植物园	PS1073MT01	GQ434648
18	地榆 <i>S. officinalis</i>	中国医学科学院药用植物研究所	PS1073MT04	GQ434649

Evolutionary Genetics Analysis 4.0 分析比对并基于 Kimura-2-parameter (K2P) 双参数模型进行遗传距离等分析, 用邻接 (NJ) 法构建系统聚类树。利用 bootstrap (1 000 次重复) 检验各分支的支持率。

2 结果与分析

2.1 羌活基原植物与其混伪品 ITS2 序列种内种间比较

羌活基原植物羌活与宽叶羌活 ITS2 间隔区序列长度均为 228 bp, 具有 1 个 PolyG 和 1 个 PolyA 结构, GC 量分别为 59.7% 和 59.2%。羌活种内不同来源样品 6 条序列比对后, 长度为 228 bp, 参照其 consensus 序列, 在 160 bp 位点处, 有 T-C 碱基变异, 其余位点碱基无差异, 基于 K2P 双参数模型计算遗传距离, 羌活的种内平均 K2P 为 0.002; 种内最大 K2P 为 0.004。宽叶羌活 ITS2 序列 5 条, 序列比对后长度为 228 bp, 有两位点碱基差异, 参照其 consensus 序列, 在 44 bp 处, 为 A-C 颠换, 在 144 bp 处, 为 C-G 碱基转换。宽叶羌活的种内平均 K2P 为 0.007, 种内最大 K2P 为 0.018。

羌活基原植物与其各混伪品种间序列进行比对后, 长度为 236 bp, ITS2 序列间存在较多的变异位点。其中基原植物羌活与其余各混伪品种间平均 K2P 距离为 0.497, 种间最小 K2P 距离为 0.221; 宽叶羌活与其余各混伪品种间平均 K2P 距离为 0.504, 种间最小 K2P 距离为 0.202。

2.2 聚类分析

基于 ITS2 序列, 利用 MEGA4.0 构建的 NJ 系统聚类树 (图 1) 显示, 羌活基原植物羌活与宽叶羌活不同来源样品聚在一支, 表现出单系性, 其混

伪品也各自聚为一支, 通过 NJ 树图可以明显看出, 羌活能够与其混伪品区分开。

2.3 羌活及其混伪品 ITS2 序列二级结构

根据 Koetschan 等^[22]建立的 ITS2 数据库及其网站预测羌活及其混伪品的 ITS2 二级结构 (图 2), 由图可以看出, 所有物种的二级结构均为一个中心环 (主环) 及 4 个螺旋区构成, 每个螺旋上又有大大小小、或多或少的茎环结构。通过比较羌活与宽叶羌活的 ITS2 二级结构发现, 二者的差异较小, 主要存在于螺旋 I 区和 IV 区, 羌活比宽叶羌活在这两区均多一茎环。而羌活与宽叶羌活与其混伪品的 ITS2 二级结构差异较大, 除螺旋 II 区各物种较一致外, 在其余 3 个螺旋区, 茎环数目、大小、位置以及螺旋发出时的角度均各有不同, 因此, 依据 ITS2

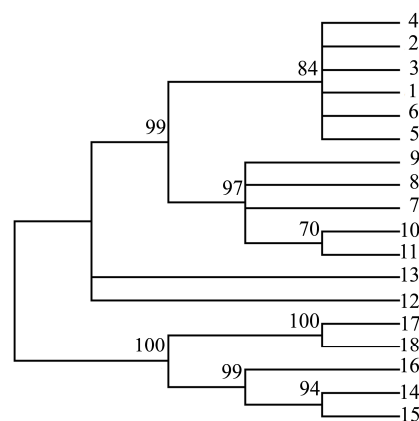


图 1 基于 ITS2 序列构建的羌活及其混伪品的邻接树

Fig. 1 Dendrogram of *Notopterygii Rhizoma et Radix* and its adulterants constructed with ITS2 sequences using NJ method

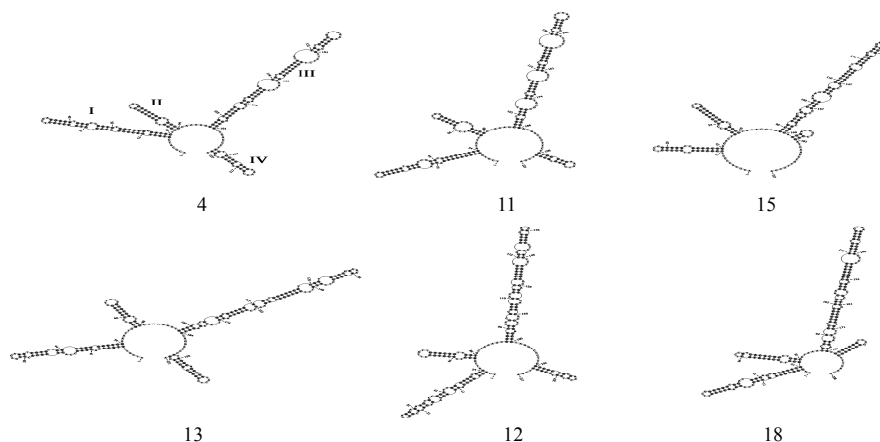


图 2 羌活及其混伪品的 ITS2 二级结构比较

Fig. 2 Comparison on ITS2 secondary structure between origin plants of *Notopterygii Rhizoma et Radix* and its adulterants

二级结构,可以直观地将羌活药材及其混伪品鉴别。

3 讨论

羌活是经济价值较高、市场缺口较大的名贵中药。本研究采集了羌活的正品来源羌活与宽叶羌活以及各地混伪品,又从 GenBank 上下载了这些物种的相关序列,利用目前被广泛认可的 DNA 条形码 ITS2 序列片段,对羌活及其混伪品进行鉴别,发现羌活的基原植物羌活与宽叶羌活的 ITS2 条形码序列长度均为 228 bp,羌活种内平均 K2P 距离(0.002)远远小于其与混伪品的种间平均 K2P 距离(0.497);宽叶羌活种内平均 K2P 距离(0.007)也远远小于其与混伪品的种间平均 K2P 距离(0.504),在基于邻接法构建的系统聚类树中,羌活基原植物均表现出了单系性,而同时又与其他混伪品明显区分开,ITS2 二级结构又进一步显示了羌活基原植物与其混伪品所具有的明显差异,因此,利用 ITS2 序列作为 DNA 条形码,可以有效地鉴定羌活。

目前,羌活药材资源紧缺,由于羌活的生长环境要求严格,生长周期长,随着药材用量的不断增加,野生资源渐趋枯竭。因此,应加强引种栽培技术研究,建立 GAP 基地,野生变家种,实现规范化种植,是满足市场要求,缓解供需矛盾,保护野生生物种资源,保证药材质量的当务之急,其中研究的第一步就是要对其进行种质种源的正确鉴定和筛选,目前羌活与宽叶羌活已在四川阿坝州及康定等地进行了栽培,本研究实验序列既有来自野生种也有栽培种,其 ITS2 序列碱基基本无差异。综上所述,ITS2 条形码不仅可以正确鉴定中药材羌活,而且在其市场流通及引种驯化、栽培过程中也可起到重要的监控作用。

致谢:中国医学科学院药用植物研究所向丽博士为本研究采集样品。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 孙 辉, 蒋舜媛, 周 毅, 等. 药用植物羌活现状及其民族植物学调查 [J]. 世界科技研究与发展, 2004, 26(6): 42-47.
- [3] 徐国钧, 徐珞珊, 王峥涛. 常用中药材品种整理和质量研究 (第3册) [M]. 福州: 福建科学技术出版社, 1995.
- [4] 吴雄明, 袁万淑. 羌活与混用品的鉴别 [J]. 中国医疗前沿, 2007, 1(3): 113.
- [5] 顾 青, 张艳芬. 羌活及其混淆品种的鉴别 [J]. 时珍国医国药, 2001, 12(10): 947.
- [6] 林 丽, 李成义, 杨扶德. 甘肃道地药材—羌活的资源研究 [J]. 甘肃中医学院学报, 2002, 19(3): 58-63.
- [7] 李 妮, 陈士林, 刘义梅, 等. 葫芦科植物通用 DNA 条形码的筛选 [J]. 中草药, 2011, 42(7): 1396-1401.
- [8] 陈士林, 宋经元, 姚 辉, 等. 药用植物 DNA 条形码鉴定策略及关键技术分析 [J]. 中国天然药物, 2009, 7(5): 322-327.
- [9] 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—中医药现代化, 2007, 9(3): 7-12.
- [10] Han J P, Liu C, Li M H, *et al.* Relationship between DNA barcoding and chemical classification of Salvia medicinal herbs [J]. *Chin Herb Med*, 2010, 2(1): 16-29.
- [11] Chen S L, Yao H, Han J P, *et al.* Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species [J]. *PLoS ONE*, 2010, 5(1): e8613.
- [12] 罗 焜, 陈士林, 陈科力, 等. 基于芸香科的植物通用 DNA 条形码研究 [J]. 中国科学 C 辑: 生命科学, 2010, 40(4): 342-351.
- [13] 朱英杰, 陈士林, 姚 辉, 等. 重楼属药用植物 DNA 条形码鉴定研究 [J]. 药学学报, 2010, 45(3): 376-382.
- [14] Gao T, Yao H, Song J, *et al.* Identification of medicinal plants in the family Fabaceae using a potential DNA barcode ITS2 [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 130: 116-121.
- [15] Pang X H, Song J Y, Zhu Y J, *et al.* Applying plant DNA barcodes for Rosaceae species identification [J]. *Cladistics*, 2010, 26: 1-6.
- [16] Yao H, Song J Y, Liu C, *et al.* Use of ITS2 region as the universal DNA barcode for plants and animals [J]. *PLoS ONE*, 2010, 5(10): e13102.
- [17] Gao T, Yao H, Song J Y, *et al.* Evaluating the feasibility of using candidate DNA barcodes in discriminating species of the large asteraceae family [J]. *BMC Evol Biol*, 2010, 10: 324.
- [18] Pang X H, Song J Y, Zhu Y J, *et al.* Using DNA barcoding to identify species within Euphorbiaceae [J]. *Planta Med*, 2010, 76: 1784-1786.
- [19] Kress W J, Wurdack K J, Zimmer E A, *et al.* Use of DNA barcodes to identify flowering plants [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 8369-8374.
- [20] 于华会, 杨志玲, 杨 旭, 等. 药用植物种质资源 ITS 序列研究进展 [J]. 中草药, 2010, 41(3): 491-496.
- [21] Keller A, Schleicher T, Schultz J, *et al.* 5.8S—28S rRNA interaction and HMM-based ITS2 annotation [J]. *Gene*, 2009, 430: 50-57.
- [22] Koetschan C, Förster F, Keller A, *et al.* The ITS2 Database III—sequences and structures for phylogeny [J]. *Nucl Acids Res*, 2010, 38: 275-279.