# 基于 ITS2 条形码的两面针药材及其混伪品的鉴别

陈贝贝[1]，宋经元[2]，姚 辉[2]，韩正洲[1*]，仰铁锤[1]，邢建永[1]

1. 华润三九医药股份有限公司 研发中心，广东 深圳 518110
2. 中国医学科学院北京协和医学院 药用植物研究所，北京 100193

**摘 要：目的** 利用 ITS2 条形码鉴别两面针药材及其混伪品，为两面针药材鉴定提供新方法。**方法** 采用 PCR 法扩增 ITS2（转录第二间隔区）序列，双向测序后运用 CodonCode Aligner、MEGA 软件进行数据处理，构建系统聚类树（NJ 树）。**结果** 两面针药材及其混伪品基因组 DNA 降解明显，但不影响 ITS2 条形码的 PCR 扩增和测序，ITS2 条形码序列分析表明种内与种间遗传距离具有较大差异，基于 ITS2 条形码构建 NJ 树可鉴别两面针药材及其混伪品。**结论** ITS2 条形码适用于两面针药材及其混伪品的鉴别，为两面针药材快速、准确鉴定提供新方法；为两面针基原研究提供重要的分子鉴定证据；同时为 DNA 条形码技术应用于其他根、茎类中药材的鉴定提供了示范作用。

**关键词：** ITS2；两面针；PCR 扩增；DNA 条形码；分子鉴定

**中图分类号：** R282.12 **文献标志码：** A **文章编号：** 0253 - 2670(2013)15 - 2150 - 05

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.15.022

# Identification of *Zanthoxyli Radix* and its adulterants using ITS2 barcoding

CHEN Bei-bei[1], SONG Jing-yuan[2], YAO Hui[2], HAN Zheng-zhou[1], YANG Tie-chui[1], XING Jian-yong[1]

1. Research Center, China Resources of Sanjiu Medical & Pharmaceutical Co., Ltd., Shenzhen 518110, China
2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Science & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

**Abstract: Objective** ITS2 barcoding was used to discriminate *Zanthoxyli Radix* and its adulterants to ensure the quality and clinical safety of this Chinese materia medica. **Methods** The internal transcribed spacer 2 (ITS2) regions were amplified and sequenced bi-directionally. Then the obtained sequences were assembled using the CodonCode Aligner. The ITS2 regions were obtained using the hidden Markov model (HMM)-based annotation methods. The genetic distances of the ITS2 regions were computed in accordance with the kimura 2-parameter (K2P) model and Neighbor-joining (NJ) phylogenetic trees were constructed using MEGA5.0. **Results** The length of ITS2 sequences of the plants in *Zanthoxyli Radix* and its adulterants were between 224 and 227 bp. Their mean intraspecific genetic distance (K2P distance) was lower than their mean interspecific genetic distance with the adulterants. The NJ trees showed that the roots of *Zanthoxyli Radix* could be easily distinguished from its adulterants. **Conclusion** ITS2 barcode could be used to identify the roots of *Zanthoxyli Radix* and its adulterants effectively, and provide the important molecular evidence for the authentication of germplasm resources.

**Key words:** ITS2; *Zanthoxyli Radix*; PCR amplification; DNA barcoding; molecular identification

《中国药典》2010 年版[1]收载两面针来源于芸香科植物两面针 *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC. 的干燥根，两面针为岭南地区常用中药，能行气止痛、活血化瘀、通络祛风，主治跌打损伤、风湿麻痹、牙痛、胃痛、毒蛇咬伤，外用治汤火烫伤。两面针需求量巨大，野生资源逐年减少；同时由于环境、地域的差异，两面针药材来源混杂[2]，混伪品较多、真伪难辨，造成了药材质量不稳定，难以保证临床用药的安全、稳定和有效，很大程度上制约了相关产业现代化的进程，因此建立科学的鉴定方

**收稿日期：** 2012-11-19

**基金项目：** 广东省教育部产学研结合项目（2009B090300202）

***通信作者** 韩正洲（1964—），男，汉族，高级工程师，硕士研究生，研究方向为中药资源可持续开发利用及新药研究。

Tel: (0755)29066805 E-mail: gulf@999.com.cn

法是保证两面针质量亟需解决的问题。

传统的中药鉴定主要采用性状鉴定，该方法简便、直接，但主观性强，其准确性取决于鉴定者的经验。近年来，随着分子生物学技术在中药学领域的渗透与发展，基于 DNA 分子标记技术的分子鉴定方法成为中药 4 大鉴定方法（基原鉴定、性状鉴定、显微鉴定、理化鉴定）的重要补充[3]，得到不断的发展与应用。

目前有关两面针鉴别方面的研究少见报道，鉴别手段主要基于性状及显微鉴别[4-6]，分子鉴定尚未见报道。DNA 条形码（DNA barcoding）是在 DNA 分类学基础上首先由加拿大动物学家 Paul Hebert 提出的，他是利用一段标准 DNA 序列作为标记实现快速、准确和自动化的物种鉴定方法。ITS2 序列是目前首推的作为植物鉴别的 DNA 条形码之一，Chen 等[7]通过对 753 个属 4 800 个种内的 6 600 个药用植物样本的研究表明，ITS2 在种水平的鉴定效率达到 92.7%，因此推荐其作为药用植物的标准条形码。Luo 等[8]以芸香科 72 属 192 种 300 个样本为研究对象，通过对热点候选条形码（*matK*、*rbcL*、*psbA-trnH*、*rpoC1*、*ycf5*、ITS2、ITS）的筛选研究表明，ITS2 条形码具有良好的 PCR 效率和测序成功率，在所考察的序列中具有最大种间变异和最小种内变异，且二者存在显著差异，具有最高的物种鉴定成功率。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

不同产地的两面针 *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC.，其混伪品有毛叶两面针 *Z. nitidum* (Roxb.) DC. var. *tomentosum* Huang、单面针 *Z. dissitum* Hemsl、飞龙掌血 *Toddalia asiatica* Lam.及竹叶花椒 *Z. armatum* DC. 4 个种，两面针样品 12 份，混伪品样品 12 份，共 24 份样品由华润三九医药股份有限公司提供，经广西中医药研究所赖茂祥研究员鉴定，信息见表 1。

**表 1 样品来源**

**Table 1 Sources of samples**

| 编号 | 名称 | 拉丁名 | 采集地 | 部位 | GenBank 号 | 编号 | 名称 | 拉丁名 | 采集地 | 部位 | GenBank 号 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 两面针 | *Zanthoxylum nitidum* | 广西大塘 | 根 | JX393933 | 5 | 毛叶两面针 | *Z. nitidum* var. *tomentosum* | 广西金秀 | 根 | JX393930 |
| | | | | | JX393935 | | | | | | JX393918 |
| | | | | | JX393913 | | | | | | JX393926 |
| 2 | 两面针 | | 广东平远 | 根 | JX393929 | 6 | 飞龙掌血 | *Toddalia asiatica* | 广西崇左 | 根 | JX393931 |
| | | | | | JX393916 | | | | | | JX393917 |
| | | | | | JX393919 | | | | | | JX393921 |
| 3 | 两面针 | | 广东电白 | 根 | JX393934 | 7 | 单面针 | *Z. dissitum* | 湖南麻阳 | 根 | JX393927 |
| | | | | | JX393923 | | | | | | JX393925 |
| | | | | | JX393922 | | | | | | JX393914 |
| 4 | 两面针 | | 广东平远 | 茎 | JX393928 | 8 | 竹叶花椒 | *Z. armatum* | 广西天峨 | 根 | JX393932 |
| | | | | | JX393915 | | | | | | JX393936 |
| | | | | | JX393924 | | | | | | JX393920 |

### 1.2 方法

**1.2.1** DNA 提取　将切制后自然晾干的药材根或茎，用酒精表面消毒后，切成薄片，取约 40 mg 用 DNA 提取研磨仪（Retsch MM400，Germany）研磨 3 min（30 次/s）后，用天根 plant genomic DNA kit [天根生化科技（北京）有限公司] 提取样品 DNA。

**1.2.2** PCR 扩增及测序　PCR 扩增选用通用引物，2F（5’-ATGCGATACTTGGTGAAT-3’），3R（5’-GACCCTTCTCCAGACTACAAT-3’）。PCR 反应体系选用 2×EasyTaq PCR mix（北京全式金生物技术有限公司），体系内含 2×EasyTaq PCR mix 12.5 μL，dd$H_2O$ 5.5 μL，上下游引物各 1 μL（2.5 μmol/L）（北京诺赛基因组研究中心有限公司），总 DNA 5 μL。PCR 扩增程序为：94 ℃、5 min，94 ℃、30 s，56 ℃、30 s，72 ℃、45 s，40 个循环；72 ℃、10 min。PCR 产物送上海美吉生物技术有限公司北京办事处采用 PCR 引物双向测序。

**1.2.3** 序列分析　对测序得到的峰图利用

CodonCode Aligner V4.0.3（CodonCode Co., USA）进行比对和拼接，去除引物区。使用基于隐马尔可夫模型的 HMMer 注释方法去除 5.8 S 和 28 S 区，获得 ITS2 序列。将得到的序列利用 MEGA5.0 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。

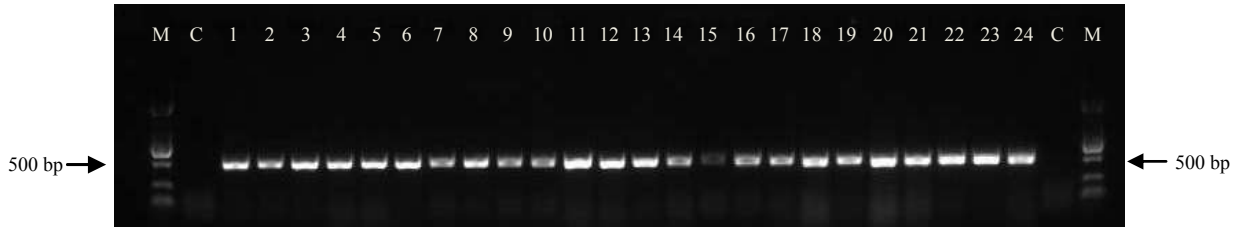
## 2 结果与分析

### 2.1 药材 DNA 提取及 PCR 扩增

两面针药材 DNA 的提取效率较低，电泳结果多呈弥散状，显示根、茎类药材基因组 DNA 降解较明显。尽管如此，各样本 PCR 扩增效率却很高，结果见图 1，两面针药材及其混伪品扩增后均得到了大约 500 bp 大小的片段。这些 PCR 产物双向测序均获成功，经拼接后获得高质量的序列，各序列使用基于隐马尔可夫模型的 HMMer 注释方法去除 5.8 S 和 28 S 区，获得 ITS2 条形码序列，经 MEGA 5.0 分析，各 ITS2 序列的 GC 量为 70%～74%。

### 2.2 种内及种间变异

**2.2.1** 种内变异 两面针种内序列共 12 条，平均 GC 量均为 74%。编号为 4 的两面针 ITS2 条形码序列为 225 bp；编号为 1、2 的两面针的 ITS2 条形码序列为 226 bp，编号为 3 的两面针 ITS2 条形码序列为 227 bp。两面针种内共 7 个变异位点，编号为 4 的两面针变异位点最多。种内最大 K2P 值为 0.032 0，平均 K2P 值为 0.015 9。




M-Marker；C-空白对照；1～3-编号 1 两面针各样本；4～6-编号 2 两面针各样本；7～9-编号 3 两面针各样本；10～12-编号 4 两面针各样本；13～15-毛叶两面针各样本；16～18-飞龙掌血各样本；19～21-单面针各样本；22～24-竹叶花椒各样本

M-Marker; C-blank control; 1－3-samples of No. 1 *Zanthoxyli Radix*; 4－6-samples of No. 2 *Zanthoxyli Radix*; 7－9-samples of No. 3 *Zanthoxyli Radix*; 10－12-samples of No. 4 *Zanthoxyli Radix*; 13－15-samples of *Z. nitidum* var. *tomentosum*; 16－18-samples of *T. asiatica*; 19－21-samples of *Z. dissitum*; 22－24-samples of *Z. armatum*

**图 1 两面针药材及其混伪品 ITS2 条形码 PCR 扩增结果电泳图**

**Fig. 1 PCR amplification results of ITS2 sequence of plants in *Zanthoxyli Radix* and its adulterants**

**2.2.2** 种间变异 两面针混伪品共有 12 条序列，ITS2 条形码在 224～227 bp；毛叶两面针 ITS2 条形码序列平均 GC 量为 71%、飞龙掌血为 74%、单面针为 73%、竹叶花椒为 70%。两面针种间序列共有 24 条，含有 34 个变异位点，其中飞龙掌血变异位点最多。两面针种间最小 K2P 值为 0.030，平均 K2P 值为 0.096。

### 2.3 两面针及其混伪品的 NJ 树

基于 ITS2 条形码，通过邻接法构建 NJ 树。从图 2 中可以看出，不同来源的两面针与其混伪品单面针、毛叶两面针、飞龙掌血以及竹叶花椒各占 1 个分支，表现出了很好的单系性，并且能够明显区分开，可见 ITS2 条形码能够很好鉴定两面针药材及其混伪品。毛叶两面针与编号为 4 的两面针在 NJ 树上显示了较近的亲缘关系，支持率为 52%，但单系性明显，且单系支持率为 97%。

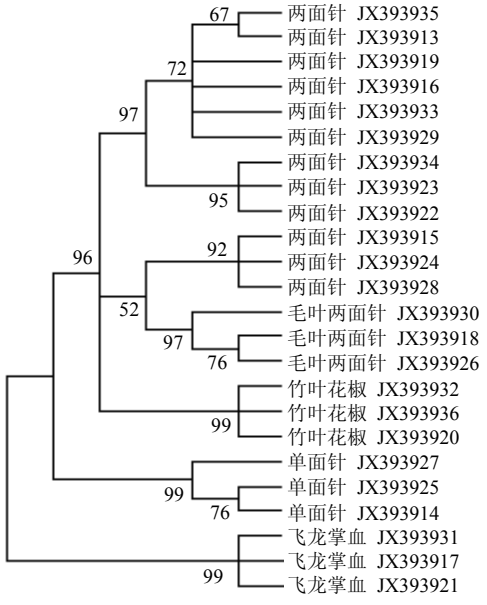



**图 2 基于 ITS2 条形码构建的两面针及其混伪品的 NJ 树**

**Fig. 2 NJ dendrogram of *Zanthoxyli Radix* and its adulterants constructed based on ITS2 sequences**

## 3 讨论

### 3.1 两面针药材 DNA 提取与 PCR 扩增

市售的两面针药材选用的是原植物切制后晾干的根切片。药材在切制、晾晒过程中长时间暴露于自然环境下，温、湿度的差异会直接引起 DNA 内磷酸二酯键的水解，且晾晒过程中由于外界微生物的侵染也加剧了 DNA 的降解。另由于植物根中含有丰富的次级代谢产物，容易与 DNA 结合形成共沉淀，导致提取的 DNA 质量不高。此外，还存在其他多种因素的影响，因此通常情况下药材 DNA 的提取效率较低。ITS2 在植物基因组内属于多拷贝序列，利用本研究的引物扩增出序列大小约为 500 bp，因此较易扩增及测序。本研究中考察 DNA 提取的起始药材样品量分别为 40、20 mg，结果显示 40 mg 起始量得到的 PCR 扩增效率较高，且测序成功率好；20 mg 起始量的研究结果不理想。

两面针为根入药药材，长期生长于土壤环境中，根中常会存在寄生真菌。ITS2 序列在植物及真菌中广泛存在[9-10]，因此在 DNA 提取过程中须对药材进行表面消毒。本研究中扩增得到的 ITS2 序列，均为两面针或其混伪品的序列。

### 3.2 两面针与毛叶两面针的亲缘关系

《中国植物志》[11]中记载两面针有 2 个变种，即两面针与毛叶两面针。其中对原变种两面针根据形态差别分为 3 个类型，不同类型在分布上也有所区别。经赖茂祥研究员鉴定本研究中编号为 04 的两面针属于原变种第 1 类型，该类两面针与毛叶两面针仅在被毛情况上存在一定差异。本研究中毛叶两面针与编号为 4 的两面针在 NJ 树上显示了较近的亲缘关系，且种间的最小 K2P 值（0.030）也产生于这二者之间，提示该类两面针与两面针的变种即毛叶两面针可能具有更为密切的关系。

### 3.3 ITS2 条形码用于两面针药材鉴定

两面针药用历史悠久，临床应用广泛[12-22]。但由于连续大量采挖，致使目前两面针资源紧缺，且《中国药典》及地方标准收载两面针来源复杂[2]，因此混伪现象时有发生。传统两面针鉴定方法多为性状鉴别及显微鉴别。《中国药典》2010 年版对两面针的鉴别项采用的也是显微鉴别与薄层鉴别。DNA 条形码技术操作简便、易于实现，并且鉴定准确性高、重复性好。陈士林课题组通过大量研究工作表明 DNA 条形码候选序列 ITS2 在广泛的植物类群中具有较好的鉴定结果[23-27]。本研究选用 ITS2 条形码对两面针药材及其混伪品进行鉴别研究，研究表明两面针药材及其混伪品的 ITS2 条形码具有较大差异，基于 ITS2 构建的 NJ 树聚类分支明显，均表现出明显的单系性；因此可有效区分两面针与其混伪品。另外，每批样品至少重复 3 次，显示 ITS2 条形码在多样本的基础上，通过多次 PCR 扩增实验均能获得稳定的结果，因此能够为两面针药材的有效鉴定提供依据。

## 参考文献


[1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.

[2] 谈 英. 三九胃泰主要原料“两面针”资源的科学合理开发利用研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2011.

[3] Yip P Y, Chau C F, Mak C Y, *et al*. DNA methods for identification of Chinese medicinal materials [J]. *Chin Med*, 2007(2): 9-27.

[4] 余丽莹, 谭小明, 周雅琴. 两面针变种及类型间的小叶形态比较 [J]. 广西植物, 2009, 29(6): 797-801.

[5] 赖茂祥, 饶伟源, 严克俭, 等. 两面针茎及其伪品的生药鉴别 [J]. 中药材, 1994, 17(3): 18-21.

[6] 陈世文, 赖茂祥. 14 种花椒属药用植物根的生药鉴定 [J]. 药学学报, 1985, 20(8): 598-605.

[7] 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.

[8] Luo K, Chen S L, Chen K L, *et al*. Assessment of candidate plant DNA barcodes using the Rutaceae family [J]. *Sci China Life Sci*, 2010, doi: 10. 1007/s11427-010-0089-1.

[9] 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.

[10] Chen S L, Xu J, Liu C, *et al*. Genome sequence of the model medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* [J]. *Nat Comm*, 2012, 3: 913. doi: 10. 1038/ncomms1923.

[11] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 (四十三卷第二册) [M]. 北京: 科学出版社, 1997.

[12] 林丽珠. 鼻咽癌的中西医结合治疗对策 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2007.

[13] 裴传宝，李树芳，王曦明. 中药扶正联合吡柔比星治疗晚期非小细胞肺癌 [J]. 辽宁中医杂志, 2002, 29(8): 482-483.

[14] 陈兆森, 陈家培, 陆福康, 等. 两面针止痛有效成分初步临床观察 [J]. 中草药, 1982, 13(5): 240-241.

[15] 刘少琼, 付学源. 两面针坐浴洗剂在肛肠病术后的临床观察 [J]. 四川中医, 2005, 23(2): 78-79.

[16] 胡 琳. 宫炎平片治疗急慢性盆腔炎 100 例 [J]. 陕西中医, 2001, 22(6): 334.

[17] 陈见军. 金鸡冲服剂的临床应用 [J]. 广西中医药,

1981(5): 49-50.

[18] 莫小泉. 妇炎净胶囊治疗慢性咽炎 38 例 [J]. 广西中医药, 1993, 16(3): 20.

[19] 龚茂禄. 溃疡丸治疗溃疡病 60 例介绍 [J]. 中医杂志, 1986(2): 39.

[20] 安 娜, 弓艳君, 陈瑞明, 等. 山豆根、两面针治疗 86 例口腔溃疡的临床观察 [J]. 内蒙古中医药, 1999, 18(S1): 21.

[21] 王慧娟. 全国医药产品大全 [M]. 北京: 中国中医药科技出版社, 1988.

[22] 黄燮才. 广西民族药简编 [M]. 南宁: 广西药品检验所, 1980.

[23] Pang X H, Song J Y, Zhu Y J, *et al*. Applying plant DNA barcodes for Rosaceae species identificaion [J]. *Cladistics*, 2011, 27, doi: 10. 1111/j. 1096-0031. 2010. 003281x.

[24] Pang X H, Song J Y, Zhu Y J, *et al*. Using DNA barcoding to identify species with-in Euphorbiaceae [J]. *Planta Med*, 2010, 76: 1784-1786.

[25] 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: 324-330.

[26] Gao T, Yao H, Song J Y, *et al*. Identification of medicinal plants in the family Fabaceae using a potential DNA barcode ITS2 [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 130: 116-121.

[27] 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.