

## 基于 ITS2 序列的杜仲及其主要混伪品的鉴定

彭梓<sup>1,2</sup>, 朱金国<sup>2</sup>, 谭建锡<sup>2</sup>, 王利兵<sup>1,2\*</sup>

1. 湖南农业大学, 湖南 长沙 410128

2. 湖南出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 湖南 长沙 410004

**摘要:** **目的** 分析杜仲及其混伪品的 ITS2 条形码序列, 探讨杜仲及其混伪品鉴定的新方法, 为杜绝市售商品药材混乱现象提供技术支撑。**方法** 提取样品 DNA, 利用 PCR 方法对样品进行核基因 ITS2 片段扩增, 采用 DNA 克隆测序技术对 ITS2 基因进行双向测序, 所得序列经 Seqman 程序拼接后, 用软件 MEGA 4.1 进行相关数据分析, 并构建邻接(Nighbor-joining, NJ)树。利用网站已建立的 ITS2 数据库预测 ITS2 二级结构。**结果** 杜仲种内最大 K2P 遗传距离远远小于其与混伪品的种间最小 K2P 遗传距离; 由构建的系统聚类树图可以看出, 不同来源的杜仲样品聚成一支, 表现为单性系, 并与其他混伪品明显分开; 比较 ITS2 二级结构发现, 杜仲与其混伪品在 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 条形码可以有效地鉴别杜仲及其混伪品, 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:** 杜仲; 混伪品; ITS2; DNA 克隆; 二级结构

**中图分类号:** R282.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)21-3042-06

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.21.019

## Identification of *Eucommia ulmoides* and its adulterants based on ITS2 sequences

PENG Zi<sup>1,2</sup>, ZHU Jin-guo<sup>2</sup>, TAN Jian-xi<sup>2</sup>, WANG Li-bing<sup>1,2</sup>

1. Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China

2. Hunan Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Changsha 410004, China

**Abstract: Objective** To identify *Eucommia ulmoides* and its adulterants using ITS2 barcode, to discuss the feasibility of this new method, and to provide the technical support for the prevention against the confusion of commercial medicinal materials. **Methods** DNA was extracted from each sample as template, the ITS2 region was amplified by PCR technology and sequenced bidirectionally using DNA cloning sequencing method. The sequence assembly and consensus sequence generation were performed using the Seqman program. Phylogenetic study was performed by MEGA 4.1, and the Nighbor-joining (NJ) dendrogram was constructed. The ITS2 secondary structure was predicted using the ITS2 website. **Results** The maximum Kimura-2-parameter (K2P) genetic distance of *E. ulmoides* was far lower than the minimum K2P genetic distance of the adulterants. In the cluster dendrogram, *E. ulmoides* samples from various sources showed the monophyletic and simultaneously distinguished from the adulterants. To compare the ITS2 secondary structure, it could be noticed that ITS2 secondary structure could distinguish *E. ulmoides* from its adulterants in terms of numbers, sizes, positions of loop, and the angles of helix exertion in four helix regions. **Conclusion** ITS2 barcode could be used to distinguish *E. ulmoides* from its adulterants effectively, and provide the important molecular evidence for the identification of germplasm resources and clinic safety in medicinal use.

**Key words:** *Eucommia ulmoides* Oliv.; adulterants; ITS2; DNA cloning; secondary structure

杜仲为杜仲科杜仲属杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliv. 的干燥树皮, 是名贵的中药材和提取天然橡胶的工业原料<sup>[1-2]</sup>, 为我国特有的珍稀濒危第二类保护

植物。因国内外对杜仲的需求急剧增加, 原有的“道地药材”货源不足, 各地曾一度出现混淆品, 少数不法分子掺伪作假、以伪乱真, 兜售假药以牟取暴

收稿日期: 2013-07-05

基金项目: “十二五”国家科技支撑计划课题(2012BAK01B07)

作者简介: 彭梓(1981—), 女, 博士研究生, 研究方向为功能产品研究与评价。E-mail: pz\_penny81@aliyun.com

\*通信作者 王利兵 E-mail: Wanglb@126.com

利,有些参与中药流通的人员缺乏必要的鉴别知识或经验不足,使一些杜仲混用品、代用品及伪品,进入商品流通渠道,严重影响了药材质量和临床疗效。目前市场上常见杜仲伪品主要涉及4科,其中以卫矛科最多,如冬青卫矛 *Euonymus japonicus* Thunb.、扶芳藤 *E. fortunei* (Turcz.) Hand.-Mazz.、白杜 *E. maackii* Rupr. 等;夹竹桃科次之,包括紫花络石 *Trachelospermum axillare* Hook.f.、毛杜仲藤 *Parabarium huaitingii* Chun et Tsiang 等,另有大风子科梔子皮 *Itoa orientalis* Hemsl.及紫草科粗糠树 *Ehretia dicksonii* Wall.<sup>[3-5]</sup>。

对于杜仲,以往研究大都以树皮、叶片等形态差异和解剖学特征,有时结合理化分析来鉴别<sup>[3-6]</sup>,非长期从事该工作的专家不能胜任原植物和药品的鉴定工作,不仅费时费力,且准确鉴定存在一定难度。近年来,随着分子生物学技术的发展,体现物种遗传本质的DNA分子已成为物种鉴定的有效分析手段。虽然目前已有通过DNA分子特征对杜仲进行分类学鉴定的研究报道<sup>[7-9]</sup>,但皆只单独以杜仲为研究对象,未对杜仲伪品进行DNA分子研究,

缺少真伪品的核苷酸差异比较信息,不能提供可靠的分子鉴别数据。

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<sup>[10-13]</sup>。DNA条形码技术具有操作简便、准确、快速的优势,不受样品发育阶段(叶片、种子、花等)、药材形态(原药材或粉末)以及研究者的专业水平限制,具有较强的通用性<sup>[14]</sup>。目前,对于植物来说,通用的DNA条形码序列仍未最终确定,但作为DNA候选序列的ITS2片段因其具有较强引物通用性、扩增高效性以及足够的序列变异性,而被大家广泛关注<sup>[15-19]</sup>。本研究利用ITS2序列对杜仲源植物及其多种混伪品进行DNA条形码鉴别研究,旨在为该药材的准确鉴定提供分子依据,同时为研究和建立满足生物资源查验的技术体系打下基础。

## 1 材料

杜仲及其主要混伪品采集自湖南农业大学、广西、浙江、云南等地,并经笔者鉴定确认。实验材料及GenBank登录号见表1。

表1 样品来源

Table 1 Sources of samples

材料	拉丁学名	采集地	GenBank号
杜仲	<i>Eucommia ulmoides</i>	湖南农业大学耘园	KC999842
杜仲		广西南宁	KC904097
杜仲		未知	JF755927
杜仲		未知	JF755926
杜仲		未知	AY650005
杜仲		未知	AY649997
扶芳藤	<i>Euonymus fortunei</i>	广西南宁	KC999833
扶芳藤		广东广州	KC999834
扶芳藤		江苏南京	KC999835
冬青卫矛	<i>E. japonicus</i>	广东广州	KC999836
冬青卫矛		江苏宿迁	KC999837
白杜	<i>E. maackii</i>	云南昆明	KC999830
大果卫矛	<i>E. myrianthus</i>	浙江九龙山	KC999832
紫花络石	<i>Trachelospermum axillare</i>	浙江九龙山	KC999841
毛杜仲藤药材	<i>Parabarium huaitingii</i>	广西玉宁	KC999838
粗糠树	<i>Ehretia dicksonii</i>	广西南宁	KC999831
梔子皮	<i>Itoa orientalis</i>	广西南宁	KC999839
梔子皮		云南昆明	KC999840

## 2 方法

### 2.1 DNA 提取

取 0.5 g 新鲜叶片, 用液氮研磨后, 利用 DNA 提取试剂 (Promega A7943), 参照其产品说明提取总 DNA。对于干燥药材, 挑取无霉变和虫蛀的材料, 使用 70%乙醇擦洗表面, 并用无水乙醇浸泡 5 min, 提取缓冲液采用 3% CTAB, 并添加 6% PVP-40 以及 0.3%的  $\beta$ -巯基乙醇, 提取 DNA 参照文献方法<sup>[20]</sup>。

### 2.2 PCR 扩增

扩增引物正向为 5'-ATGCGATACTTGGTGTG-AAT-3', 反向为 5'-GACGCTTCTCCAGACTACA-AT-3'。PCR 反应体积 25  $\mu$ L, 反应体系及扩增程序参照文献方法<sup>[21]</sup>。

### 2.3 DNA 测序

采用克隆测序, PCR 产物经 Gel Extraction Mini Kit (OMEGA 公司) 纯化后, 与 pMD18-T 载体连接, 转化感受态细胞 JM107, 通过蓝白斑筛选和特异 PCR 鉴定重组质粒。阳性重组质粒交由上海生工公司进行测序, 每个样本检测 3 个以上克隆。各样本采用正、反双向测序, 以确保测序结果的准确性。

### 2.4 数据处理

使用 DNASTar 7.1 软件包中的 Seqman 程序对测序峰图进行序列拼接, 去除载体及引物区, 获得严格一致性序列。实验数据与 GenBank 上下载的 ITS2 序列采用基于隐马尔可夫模型的 HMMer 注释方法去除两端 5.8 S 和 26 S, 获得 ITS2 间隔区序列。通过 MEGA4.1 软件查看序列的碱基组成, 基于 Kimura-2-parameter (K2P) 双参数模型计算序列间的遗传距离, 并用邻接 (Neighbour-joining, 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。根据 Koetschan 等建立的 ITS2 数据库及其网站预测杜仲及其混伪品 ITS2 茎环二级结构<sup>[22]</sup>。

## 3 结果与分析

### 3.1 杜仲及其混伪品 ITS2 序列种内种间比较

实验共获得杜仲及其混伪品 ITS2 序列共 14 条, 从 Genbank 下载序列 4 条。杜仲 ITS2 间隔区 6 条序列之间有 1 个碱基长度差异, 其中 4 条序列长度为 210 bp, 2 条为 211 bp, GC 量为 66.0%, 具有 1 个 polyG 结构, 种内不同来源样品序列比对后, 参照其 consensus 序列, 有七个变异位点, 其中 1 个为碱基缺失/插入, 其他均为单碱基变异 (图 1)。基于 K2P 双参数模型计算遗传距离, 杜仲种内平均

K2P 为 0.013, 种内最大 K2P 为 0.033。

杜仲各混伪品的 ITS2 序列长度为 214~235 bp, 以粗糠树序列为最长。杜仲与其各混伪品种间序列进行比对后, 长度为 259 bp, ITS2 序列间存在较多的变异位点 (图 1)。杜仲与各混伪品种间平均 K2P 距离为 0.651, 种间最小 K2P 距离为 0.408。其中杜仲与粗糠树遗传距离较近, 为 0.431, 而与紫花络石距离较远, 为 0.787。

### 3.2 聚类分析

基于 ITS2 序列, 利用 MEGA4.0 构建的 NJ 系统聚类树 (图 2) 显示, 不同来源的杜仲样品聚在一支, 自展支持率达到 100%, 表现出单系性。同时, 混伪品扶芳藤、冬青卫矛的不同样品各自聚为一支, 分属同一科的不同物种又分别聚集为一支, 且自展支持率均较高, 通过 NJ 树图可以明显看出, 杜仲能够与其混伪品区分开。

### 3.3 杜仲及其混伪品 ITS2 序列的二级结构

杜仲及其混伪品的 ITS2 二级结构预测见图 3。由图 3 可见, 所有样品的二级结构均为一个中心环 (主环) 及 4 个螺旋区 (Helix) 构成, 每个螺旋上有大小不一, 数量不等的茎环 (Loop) 结构。通过比较杜仲与其混伪品的 ITS2 二级结构发现, 它们之间结构差异较大, 其茎环数目、大小、位置以及螺旋发出时的角度均各有不同。因此, 依据 ITS2 二级结构, 可以直观地鉴别杜仲及其混伪品。

## 4 讨论

杜仲是杜仲科杜仲属仅存的第三纪孑遗植物, 其自古以来以皮入药而著称, 具有强筋骨、补肝肾、久服轻身耐老等作用, 为中药上品。而市面上出现的杜仲混伪品其功效与正品相差很大, 甚至功效相反或具有毒副作用, 极大危害患者健康。为了准确鉴定杜仲, 确保其用药安全、有效, 本研究于各地采集了杜仲以及不同科属的混伪品, 并从 GenBank 上下载该物种的相关序列, 利用 DNA 条形码 ITS2 序列片段, 对杜仲及其混伪品进行鉴别研究。结果发现杜仲的 ITS2 条形码序列长度较短, 其种内平均 K2P 距离 0.013 远远小于其与混伪品的种间平均 K2P 距离 0.408, 在基于 NJ 法构建的系统聚类树中, 各物种均表现出了单系性, 而与其他物种明显区分开, ITS2 二级结构所揭示的分子形态学特征又进一步直观显示出杜仲与其混伪品的明显差异。因此, 基于 ITS2 条形码可有效鉴别杜仲及其主要混伪品。该研究



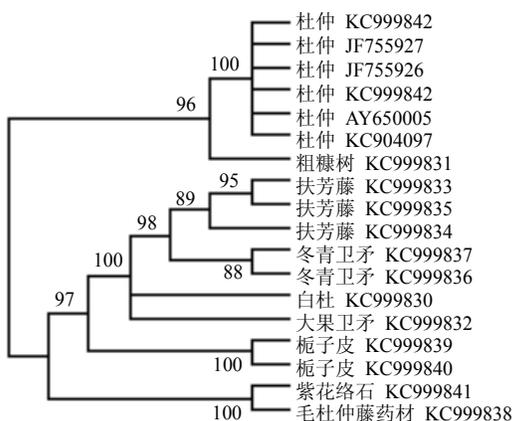


图 2 基于 ITS2 序列构建的杜仲及其混伪品的邻接树  
Fig. 2 NJ dendrograms of *E. ulmoides* and its adulterants based on ITS2 sequences

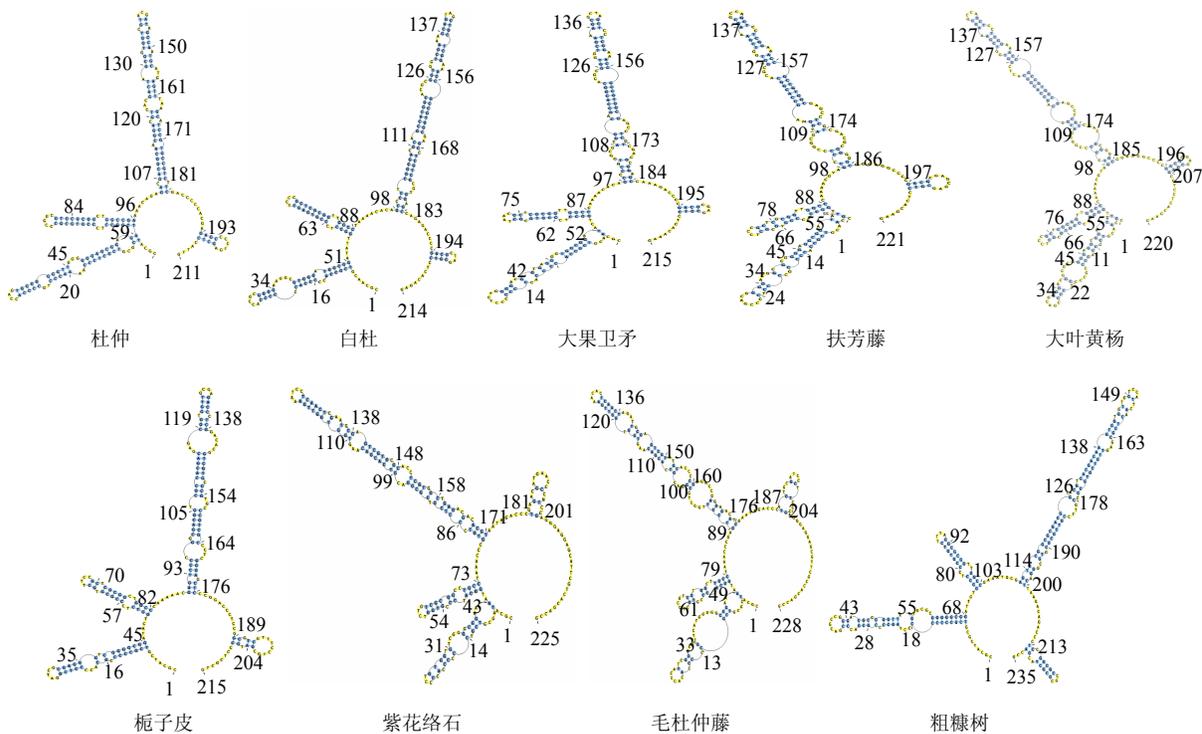


图 3 杜仲及其混伪品的 ITS2 二级结构比较  
Fig. 3 Comparison on ITS2 secondary structure between *E. ulmoides* and its adulterants

具有重要的应用价值，可大大推进杜仲药材的快速准确鉴定。

分子生物学的发展为中药鉴定提供了新的技术和方法，DNA 条形码技术是近些年国际上新发展起来的物种鉴定技术。与其他分子鉴定方法相比，DNA 条形码鉴定具有方法快速、准确、通用性强、可重复性良好、易于推广和标准化等独特优势，克服了传统鉴定方法的局限性。当前中药产业迅速发展，其鉴定需求亦愈来愈大，DNA 条形码技术对于缓解传统鉴定人才缺乏和药材鉴定困难具有重要意义。有研究表明 ITS2 序列可以作为植物鉴定的通用 DNA 条形码序列，其二级结构能够为发现新物种和分类学提供更多的信息<sup>[23]</sup>，在中药鉴定乃至出入境物种资源查验方面将显示出巨大的应用潜力。

参考文献

[1] 张康健, 张 檀. 中国神树——杜仲 [M]. 北京: 经济管理出版社, 1997.  
 [2] Wang J L, Liu E W, Wu S, *et al.* Development of HPLC Method to Evaluate Drug-processing Technique of *Eucommiae Cortex* [J]. *Chin Herb Med*, 2011, 3(3): 221-225.  
 [3] 程志清, 孟 楣, 廖自荣, 等. 杜仲伪品研究概况 [J]. 山东中医杂志, 2000, 19(11): 685-686.  
 [4] 刘筱梅. 杜仲及其伪品的鉴别 [J]. 青海医药杂志, 2000, 30(3): 51.  
 [5] 韦有华. 杜仲及其 32 种混、伪品鉴别 [J]. 河北中医, 2007, 29(1): 61-62.  
 [6] 路国红, 李艳红. 杜仲及其伪品的辨析 [J]. 中国现代

- 药物应用, 2010, 4(2): 219.
- [7] 马玉花, 杨吉安, 贾万忠, 等. 中国不同地区杜仲 rDNA 的 ITS 序列分析 [J]. 西北林学院学报, 2004, 19(4): 16-19.
- [8] 章群. 中药杜仲原植物的分子鉴定 [J]. 生态科学, 2004, 23(2): 141-143.
- [9] Sun Z Y, Chen S L. Identification of cortex herbs using the DNA barcode nrITS2 [J]. *J Nat Med*, 2013, 67(2): 296-302.
- [10] Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L, *et al.* Biological identification through DNA barcodes [J]. *Proc Biol Sci*, 2003, 270(1512): 313-321.
- [11] 刘美子, 宋经元, 罗焜, 等. DNA 条形码序列对 9 种蒿属药用植物的鉴定 [J]. 中草药, 2012, 43(7): 1393-1397.
- [12] Hebert P D, Penton E H, Burns J M, *et al.* Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the Neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(41): 14812-14817.
- [13] 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.
- [14] Sehindl D E, Miller S E. DNA barcoding, a useful tool for taxonomists [J]. *Nature*, 2005, 435: 17.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] 孙稚颖, 陈士林, 姚辉, 等. 基于 ITS2 序列的羌活及其混伪品的 DNA 条形码鉴定 [J]. 中草药, 2012, 43(3): 568-571.
- [20] 崔光红, 唐晓晶, 黄璐琦. 含淀粉及多糖类中药 DNA 的提取方法研究 [J]. 中国中药杂志, 2006, 16(31): 1365-1367.
- [21] 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.
- [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.
- [23] Prasad P K, Tandon V, Biswal D K, *et al.* Phylogenetic reconstruction using secondary structures and sequence motifs of ITS2 rDNA of *Paragonimus westermani* and related species [J]. *BMC Genomics*, 2009, 10(Suppl 3): S25.