

柴胡及其伪品的 DNA 条形码鉴定研究

韩晓伟, 严玉平, 吴兰芳, 王红芳, 宋军娜, 王 乾, 郑玉光*
河北中医学院, 河北 石家庄 050200

摘要: 目的 鉴定河北中药材市场柴胡的真伪。方法 对从河北中药材市场采购的 28 份柴胡药材的 ITS2 序列进行 PCR 扩增, 同时从 GenBank 下载 7 个样本序列。采用 CodonCode Aligner 软件进行序列拼接, 采用软件 MEGA 6.0 分析比对, 计算其种间、种内的 K2P 距离以及各序列的变异位点并进行聚类分析。结果 28 份样品中有 21 份为柴胡, 3 份为黑柴胡, 4 份为伪品。结论 ITS2 序列能够作为柴胡药材鉴别的有效方法之一, 对药材市场的规范和临床用药安全具有重要意义。

关键词: 柴胡; ITS2 序列; 药材; 鉴别; 条形码

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)09-1583-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.09.023

Identification of *Bupleuri Radix* and its adulterants by DNA barcoding

HAN Xiao-wei, YAN Yu-ping, WU Lan-fang, WANG Hong-fang, SONG Jun-na, WANG Qian, ZHENG Yu-guang
Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050200, China

Abstract: Objective To identify the authenticity of *Bupleuri Radix* in the market of Hebei province. **Methods** In this research, the ITS2 sequence of 28 samples of *Bupleuri Radix* that were bought from the market in Hebei province was amplified by PCR, and the sequence of seven samples was downloaded from GenBank. Aligner CodonCode software was used for sequence alignment, the MEGA6.0 analysis was used to calculate the K2P distance, and the mutation sites of each sequence was analyzed. **Results** Among the 28 *Bupleuri Radix* samples, there were 21 samples for *Bupleurum chinense*, 3 for *B.smithii*, and 4 for the false. **Conclusion** ITS2 sequence can be used as an effective method to identify the authenticity of *Bupleuri Radix*, it is great value to the medicine market standard and the clinical medication safety.

Key words: *Bupleuri Radix*; ITS2 sequence; Chinese medicinal materials; identification; barcoding

柴胡 *Bupleuri Radix* 属于伞形科 (Umbelliferae) 植物, 有约 200 种^[1], 《中国药典》2015 年版中规定的正品柴胡为伞形科植物柴胡 *Bupleurum chinense* DC. 或狭叶柴胡 *B. scorzonifolium* Wld. 的干燥根。前者俗称“柴胡”, 后者俗称“南柴胡”, 是我国常用大宗中药材之一^[2]。柴胡是河北省的道地药材之一, 每年的用量巨大。但是, 由于市场上的柴胡药材来源复杂, 品种较多^[3], 加之还有一些掺杂使假的现象, 使得柴胡的临床用药安全受到很大的威胁。利用传统的理化鉴别和性状鉴别的方法不能准确鉴别柴胡药材的来源和种属, 因此, 需要有更科学更准确的方法来鉴别柴胡药材。

DNA 条形码技术是近年来生物物种鉴定的

新技术, 陈士林等^[4-5]提出了以 ITS2 作为药用植物鉴定的通用序列, 其稳定性已在多种药用植物的种属鉴定上得到肯定^[6-8]。目前, 已经有利用 ITS 和 ITS2 序列对柴胡进行鉴定的报道^[9-11]。本实验是利用 ITS2 序列, 对河北中药材市场的 28 份柴胡药材样品进行检测, 从而为 ITS2 序列进入柴胡药材鉴定实践领域提供理论基础, 为临床用药安全提供依据。

1 材料

28 份柴胡药材样本全部购自河北省中药材市场, 经河北中医学院郑玉光教授鉴定, 凭证样本保存于河北中医学院药学院, 其余 7 个样本来源于 GenBank。样品来源见表 1。

收稿日期: 2016-03-01

基金项目: 河北省中医药管理局课题 (2015081); 河北中医学院博士科研启动基金 (BSZ2015003); 河北省教育厅青年基金 (QN2015073); 河北省现代农业技术体系中药材创新团队项目 (7000120081); 河北中医学院中药学重点学科

作者简介: 韩晓伟 (1978—), 女, 博士, 讲师, 研究方向为植物系统发育和抗逆生理。Tel: 13091020121 E-mail: hanxiaowei2015@126.com

*通信作者 郑玉光 (1973—), 男, 硕士生导师, 教授, 研究方向为中药质量标准。Tel: 13931856956 E-mail: zyg314@163.com

表 1 样品来源
Table 1 Sources of samples

编号	样品	拉丁名	药材来源	凭证样本号	GenBank 登录号
1	柴胡	<i>B. chinense</i>	河北省邯郸市涉县	YC2015AG23	KT362157
2	柴胡		河北省邯郸市涉县	YC2015AG21	KT362158
3	柴胡		山西省	YC2015AG07	KT362159
4	柴胡		河北省邯郸市涉县	YC2015AG08	KT362160
5	柴胡		河北省邯郸市涉县	YC2015AG19	KT362160
6	柴胡		河北省邯郸市涉县	YC2015AG32	KT362160
7	柴胡		河北省邯郸市涉县	YC2015AG33	KT362160
8	柴胡		山西省	YC2015AG24	KT362161
9	柴胡		河北省张家口市小五台	YC2015AG01	KT362162
10	柴胡		河北省邯郸市涉县	YC2015AG02	KT362162
11	柴胡		河北省邯郸市涉县	YC2015AG10	KT362162
12	柴胡		河北省邯郸市涉县	YC2015AG14	KT362162
13	柴胡		河北省邯郸市涉县	YC2015AG20	KT362162
14	柴胡		河北省邯郸市涉县	YC2015AG22	KT362162
15	柴胡		河北省邯郸市涉县	YC2015AG26	KT362162
16	柴胡		河北省邯郸市涉县	YC2015AG27	KT362162
17	柴胡		河北省邯郸市涉县	YC2015AG28	KT362162
18	柴胡		河北省邯郸市涉县	YC2015AG29	KT362162
19	柴胡		河北省邯郸市涉县	YC2015AG31	KT362162
20	柴胡		河北省张家口市小五台	YC2015AG05	KT362163
21	柴胡		河北省张家口市小五台	YC2015AG06	KT362163
22	黑柴胡	<i>B. smithii</i>	河北省张家口市小五台	YC2015AG03	KT362164
23	黑柴胡		河北省张家口市小五台	YC2015AG04	KT362165
24	黑柴胡		河北省张家口市小五台	YC2015AG13	KT362166
25	苦参	<i>Sophora flavescens</i>	河北省邯郸市涉县	YC2015AG25	KT362167
26	龙芽草	<i>Agrimonia pilosa</i>	河北省邯郸市涉县	YC2015AG11	KT362168
27	龙芽草		河北省邯郸市涉县	YC2015AG12	KT362168
28	石竹	<i>Dianthus chinensis</i>	甘肃省	YC2015AG34	KT362169
29	柴胡	<i>B. chinense</i>	GenBank		GQ434690
30	柴胡		GenBank		AY551293
31	柴胡		GenBank		HM114229
32	窄竹叶柴胡	<i>B. marginatum</i> var. <i>stenophyllum</i>	GenBank		DQ285466
33	窄竹叶柴胡		GenBank		DQ285468
34	报茎柴胡	<i>B. longicaule</i> var. <i>amplexicaule</i>	GenBank		DQ285469
35	当归	<i>Angelica sinensis</i>	GenBank		GQ434694

2 方法

2.1 仪器与试剂

Eppendorf 梯度 PCR 仪；电泳仪为北京六一仪器厂 DYY-6D 电泳系统；美国伯乐 Bio-Rad GelDoc XR System 凝胶成像系统；DNA 提取试剂盒购自全式金生物技术（北京）有限公司，引物由上海 Invitrogen 公司合成。

2.2 DNA 提取、PCR 扩增和测序

取柴胡药材样本 20 mg，液氮研磨，利用植物基因组提取试剂盒提取柴胡药材的全基因组 DNA。对所提取的 DNA 的进行 PCR 扩增，所采用引物为

通用引物 ITS2，引物序列为 ITS2F：5'-ATGCGATA-CTTGGTGTGAAT-3'；ITS2R：5'-GACGCTTCTCC-AGACTACAAT-3'，扩增反应体系为 50 μL。反应体系：含有 Taq PCR Mix Master 25 μL，正、反向引物各 1.5 μL，DNA 5 μL，加 ddH₂O 至 50 μL。扩增程序：94 °C 预变性 5 min，94 °C 变性 30 s，56 °C、30 s，72 °C、45 s，40 个循环，循环结束后 72 °C 再延伸 10 min，4 °C 保存。1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 反应结果，每份样品 30 μL PCR 产物直接测序，由深圳华大基因公司北京测序部完成。每份样品均进行 3 次生物学重复。

2.3 数据处理

利用 CodonCode Aligner 软件对测序的序列进行校对拼接, 去除引物及低质量区, 同时利用隐马尔可夫模型的 HMMer 注释方法去除两端 5.8 S 和 28 S 区域^[12-13]。将所测得的序列用软件 MEGA 6.0 分析比对, 基于 K2P 模型进行遗传距离的计算并建立邻接 (NJ) 树, 根据 Schultz 等^[14-15]建立的 ITS2 数据库及其网站预测 ITS2 的二级结构。

3 结果

3.1 柴胡样品 DNA 提取和 PCR 扩增结果

柴胡药材样品提取 DNA 后, 利用 ITS2 引物进行 PCR 扩增, 利用琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 发现 28 份样品均能扩增出单一明亮条带, 对检测后的 PCR 产物进行测序。

3.2 序列的比对与提交

将扩增的 ITS2 的序列经 CodonCode Aligner 软件校对拼接后, 将序列在 NCBI 网站上进行 Blast 比对, 结果发现 28 条序列中有 4 条序列与柴胡的序

列差别很大, 分别与苦参、龙芽草和石竹的序列相似度较高。重新取样、提取 DNA 并测序后结果仍是如此。因此认为柴胡药材中混入了其他的种类。将 28 条序列提交到 NCBI 数据库并获得登录号 (表 1)。

3.3 序列的分析

柴胡实验样本的 ITS2 序列长度变化范围为 173~223 bp, 柴胡种间有 5 个变异位点, 位置分别为 50、102、105、154、170 bp, 分为 7 种单倍型 (表 2), 说明柴胡样品的种间变异很小。而黑柴胡与柴胡相比变异位点有 14 个, 苦参、龙牙草和石竹的序列与柴胡样本序列相比几乎完全不同 (图 2)。

3.4 柴胡及其混伪品的种内种间遗传距离分析

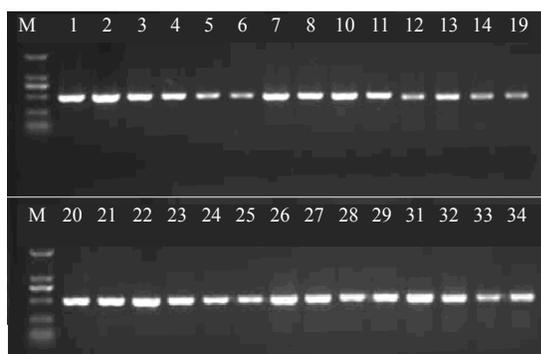
基于 K2P 模型计算柴胡与其混伪品 K2P 距离, 柴胡种内 K2P 平均为 0.004, 种内最大 K2P 遗传距离为 0.009。柴胡与其混伪品的种间遗传距离最小为 0.041, 远远大于柴胡的种内最大遗传距离, 表明 ITS2 能够准确区分柴胡及其混伪品。

3.5 柴胡及其混伪品的聚类分析

基于得到的 28 条 ITS2 序列, 并从 GenBank 下载 7 条序列, 利用 NJ 法构建系统的聚类树。从所构建的 NJ 树中可以看到柴胡序列单独聚为一支, 黑柴胡单独聚为一支, 从 GenBank 下载的柴胡伪品聚为一支, 而鉴定出的苦参、龙牙草、石竹和作为对照的当归聚为一支, 说明这些植物的科属与柴胡相差较远 (图 3)。

3.6 柴胡及其混伪品的二级结构比较

通过柴胡及其混伪品二级结构 (图 4) 比较可以看出, 柴胡与黑柴胡的二级结构差别也是很大的, 其保守区以及 4 个螺旋臂都有较大差异; 苦参与柴胡的保守区和螺旋臂 III 有一些相似, 但是柴胡的茎环较苦参的要大, 因此二者在分子水平差异也很明显。龙牙草和石竹与柴胡在螺旋臂 III 稍有一些相



M-Marker 1~8-YC2015AG01~YC2015AG08 10~14-YC2015AG10~YC2015AG14 19~29-YC2015AG19~YC2015AG29 31~34-YC2015AG31~YC2015AG34

图 1 柴胡样品的 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of PCR product from *Bupleuri Radix*

表 2 柴胡种内变异

Table 2 Intraspecific variation of *Bupleuri Radix*

单倍型	条数	变异位点/bp				
		50	102	105	154	170
KT362160	4	T	T	C	C	A
KT362161	1	A	T	C	C	G
KT362162	11	A	T	C	G	G
KT362163	2	A	T	C	C	G
KT362157	1	A	A	C	C	G
KT362158	1	A	T	T	C	G
KT362159	1	A	T	C	C	A

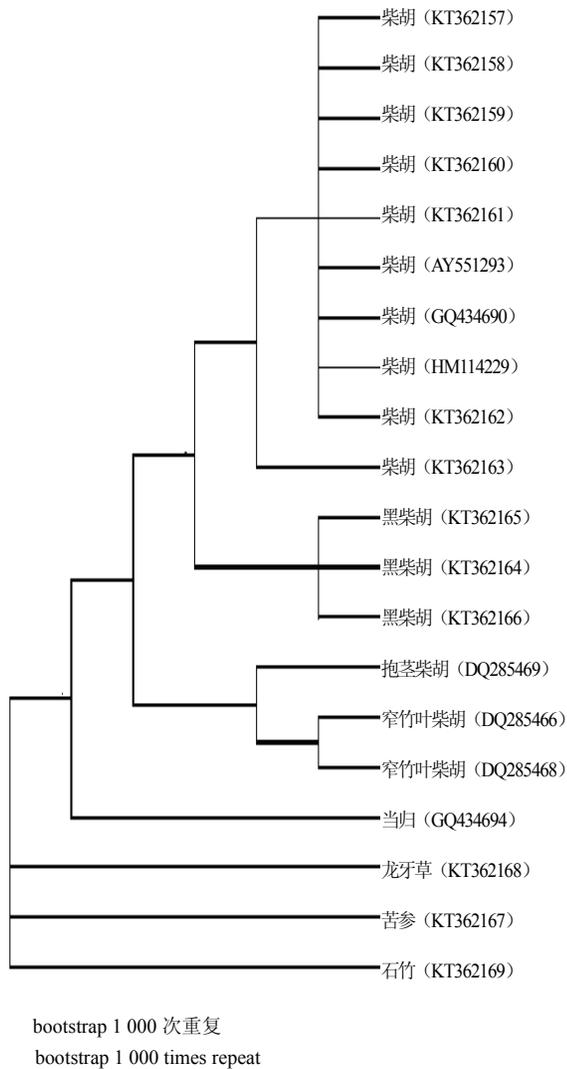


图 3 基于 ITS 序列构建柴胡及其混伪品 NJ 树
Fig. 3 NJ dendrogram in *Bupleuri Radix* and its adulterants based on ITS2 sequences

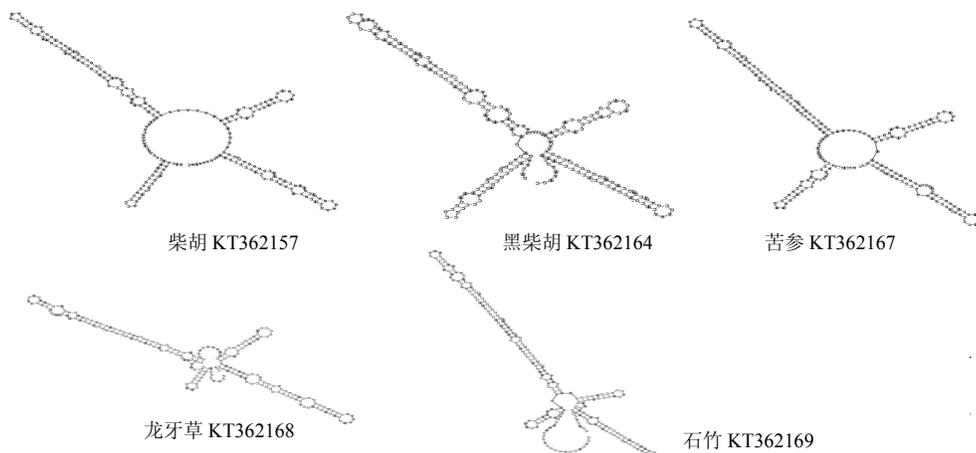


图 4 柴胡及其混伪品 ITS2 二级结构
Fig. 4 Secondary structures in *Bupleuri Radix* and its adulterants

似，但是茎环的差别很明显。因此，通过二级结构的分子形态差异可以区别柴胡及其混伪品。

4 讨论

我国的中药资源蕴藏量巨大，种类繁多，但是由于经济利益驱使，中药材掺假时有发生。《中国药典》2015 年版中对每一种药材的鉴别方法已经达到了 3 种以上，DNA 条形码技术也被药典列为了药材鉴定的方法之一。柴胡属作为伞形科最大的属，其作为商品流通的柴胡种类达到 12 种之多^[16]，利用传统的生药鉴定的方法已经难以满足现代物种鉴定的需求^[17]。本研究证实了利用 DNA 条形码技术鉴定市场药材柴胡真伪的可行性。

在实验过程中，由于柴胡的药材是干燥的根，因此在 DNA 提取过程中应首先将其清洗干净，避免污染，其次要保证提取的 DNA 的浓度和纯度符合下一步 PCR 反应的要求。通过延长提取步骤中的水浴的时间，使干燥的柴胡根细胞充分裂解，从而达到提取较高浓度 DNA 的要求。本实验中涉及的 28 种柴胡的药材利用通用 ITS2 引物均有很好的扩增效率，PCR 产物电泳呈现明亮单一的条带。基于 K2P 距离建立的 NJ 树以及二级结构的预测都能够很好的将柴胡及其伪品区分开来。28 份市场药材中正品 21 份，伪品 7 份，正品率为 78.6%，需要提及的是，伪品中检测出了苦参、龙芽草和石竹，在 NJ 树中和作为对照的当归聚为一支。苦参、龙芽草和石竹与柴胡在植物学上的亲缘关系较远，在原植物形态是很容易辨认的，但是在药材中，如果没有丰富的药材辨认经验是不容易将三者区分开的，而且这三者的药性相差甚远，一旦作为柴胡入药，严重威胁到临床用药的安全。

综上所述,利用 ITS2 序列能够准确鉴定柴胡药材及其伪品,本实验所鉴定的 28 份柴胡药材与药材鉴定专家鉴定的结果一致,说明了利用 DNA 条形码技术能够准确、快速地完成中药材鉴定工作,在今后的药材的流通以及市场管理、临床用药等实际应用中具有极大的价值。

参考文献

- [1] Xu N, Shi Y N, Zhong X, *et al.* A new saikongenin from the roots of *Bupleurum bicaule* [J]. *Chin J Nat Med*, 2014, 12(4): 305-308.
- [2] 中国药典. [S]. 一部. 2015.
- [3] 雷天莉, 任宇豪, 李 敬, 等. 北柴胡地上茎不同分枝对根中皂苷类成分量及根产量的影响 [J]. *中草药*, 2014, 45(13): 1920-1923.
- [4] 陈士林. 中药 DNA 条形码分子鉴定 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012.
- [5] 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.
- [6] Chen X C, Liao B S, Song J Y, *et al.* A fast SNP identification and analysis of intraspecific variation in the medicinal *Panax* species based on DNA barcoding [J]. *Gene*, 2013, 530(1): 39-43.
- [7] Gu W, Song J Y, Cao Y, *et al.* Application of the ITS2 region for barcoding medicinal plant of Selaginellaceae in Pteridophyta [J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e67818.
- [8] Hou D Y, Song J Y, Yao H, *et al.* Molecular identification of *Corni Fructus* and its adulterants by ITS/ITS2 sequences [J]. *Chin J Nat Med*, 2013, 11(2): 121-127.
- [9] 南小洁, 郝媛媛, 赵良贵, 等. 柴胡药材干根 DNA 提取及 RAPD 分析 [J]. *中草药*, 2009, 40(3): 447-451.
- [10] 周 琳, 迟 莹, 张丽华, 等. 柴胡与四种伪品的 DNA 指纹研究 [J]. *北华大学学报: 自然科学版*, 2013, 14(1): 46-49.
- [11] 迟 莹, 周 琳, 张丽华, 等. 柴胡及其常见伪品的 DNA 指纹鉴定 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(15): 143-146.
- [12] Keller A, Schleicher T, Schultz J, *et al.* 5.8s-28s rRNA interaction and HMM-based ITS2 annotation [J]. *Gene*, 2009, 430(1/2): 50-57.
- [13] Schultz J, Muller T, Ahtzinger M, *et al.* The internal transcribed spacer 2 database-a web server for (not only) low level phylogenetic analyses [J]. *Nucl Acids Res*, 2006, 34(3): 704-707.
- [14] Selig C, Wolf M, Müller T, Dandekar T, *et al.* Homology modelling RNA structure for molecular systematics [J]. *Nucl Acids Res*, 2008, 36(12): 377-380.
- [15] Koetschan C, Förster F, Keller A, *et al.* The ITS2 Database III-sequences and structures for phylogeny [J]. *Nucl Acids Res*, 2010, 38(6): 275-279.
- [16] 赵香妍, 刘长利, 薛文峰, 等. 北京地区野生柴胡种质资源的 ISSR 研究 [J]. *中国现代中药*, 2015, 17(10): 1008-1013.
- [17] 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): 1393-1396.