

基于 ITS2 序列的 5 种鬼臼类中药材 DNA 条形码鉴定研究

鹿江南¹, 成航¹, 樊佳佳¹, 韩宗贤¹, 高翰¹, 王永红^{2*}, 刘霞^{1*}

1. 武汉理工大学化学化工与生命科学学院, 湖北 武汉 430070

2. 武汉理工大学医院, 湖北 武汉 430070

摘要:目的 通过分析 5 种鬼臼类中药材八角莲、南方山荷叶、桃儿七、小八角莲和六角莲的 ITS2(internal transcribed spacer 2) 条形码序列, 探讨鬼臼类药材鉴定新方法。方法 共收集 26 份样品, 以 ITS2 作为条形码序列, 对各鬼臼类中药材提取基因组 DNA, PCR 扩增 ITS2 序列并进行双向测序。所得序列经 CodonCode Aligner 拼接并剪切后, 采用 MEGA5.1 软件进行序列对比分析, 计算遗传距离, 分析比较种内、种间序列差异, 并构建系统邻接树。结果 5 种药材种间存在明显差异, 各个种的种内最大遗传距离均小于种间最小遗传距离; 构建的系统树各个种不同样本均分别聚在一起, 表现出单系性。结论 ITS2 序列作为 DNA 条形码可较好地用于鬼臼类中药材 DNA 条形码的鉴定研究。

关键词: 鬼臼类中药材; DNA 条形码; ITS2 序列; 药材鉴定; 八角莲; 南方山荷叶; 桃儿七; 小八角莲; 六角莲

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)16-3907-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.16.026

DNA molecular identification of Chinese herbal materials of *Dysosma* by ITS2 barcode sequence

LU Jiang-nan¹, CHENG Hang¹, FAN Jia-jia¹, HAN Zong-xian¹, GAO Han¹, WANG Yong-hong², LIU Xia¹

1. School of Chemistry, Chemical Engineering and Life Sciences, Wuhan University of Technology, Wuhan 430070, China

2. Wuhan University of Technology Hospital, Wuhan 430070, China

Abstract: Objective To explore a new identification method for medicinal materials of *Dysosma*, and analyze the second internal transcribed spacer (ITS2) barcode sequences of *Diphylleia sinensis* and *Dysosma versipellis*, *Sinopodophyllum hexandrum*, *Dysosma difformis* and *Dysosma pleiantha* in five kinds of podophyllum. **Methods** The ITS2 of ribosomal DNA of medicinal materials of podophyllum was amplified and sequenced by bi-directional sequencing of PCR products. Sequence assembly and consensus sequence generation were performed by using CodonCode Aligner. Phylogenetic study was performed using software MEGA 5.1 in accordance with Kimura-2-parameter (K2P) model. Genetic distances were calculated and analyzed and the phylogenetic tree was constructed by using the neighbor-joining (NJ) method. **Results** There were significant differences among five kinds of *Dysosma*. Their maximum intraspecific genetic distance (K2P distance) was far lower than their minimum interspecific genetic distance with the other species. In the cluster dendrogram, all species showed monophyletic. **Conclusion** ITS2 sequence as DNA barcoding technique can be used to identify Chinese herbal materials of *Dysosma*.

Keywords: Chinese herbal materials of *Dysosma*; DNA barcoding; ITS2 sequence; medicinal material identification; *Dysosma versipellis* (Hance) M. Cheng ex Ying; *Diphylleia sinensis* H. L. Li; *Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) Ying; *Diphylleia difformis* (Hemsl. et Wils.) T. H. Wang ex Ying; *Dysosma pleiantha* (Hance) Woods

鬼臼类中药材以干燥根茎及根入药, 主要来源于小檗科(Berberidaceae)鬼臼属 *Dysosma* Woodson、桃儿七属 *Sinopodophyllum* Ying、山荷叶属 *Diphylleia* Michx 及足叶草属 *Podophyllum* L. 这 4 个属 12 种药用植物^[1]。药用历史悠久, 始载于《神农本草经》, 列

为下品, 根据记载“鬼臼味辛温, 主杀蛊毒、鬼疰、精物; 辟恶气不祥, 逐邪, 解百毒”^[2]。临床用于治疗毒蛇咬伤、痈疽肿毒、跌打损伤、风湿疼痛等症^[3-4]。除足叶草属外, 分布在我国有 3 个属, 即山荷叶属(南方山荷叶 *D. sinensis* H. L. Li)、鬼臼属[八角莲

收稿日期: 2018-02-01

基金项目: 国家科技重大专项资助项目子课题(2014ZX09304-307-001-020)

作者简介: 鹿江南(1993—), 硕士研究生。E-mail: lujnan@126.com

*通信作者 王永红, 女, 硕士, 研究方向为内分泌疾病的诊断与治疗。E-mail: wang.qqmm@163.com

刘霞, 女, 博士, 研究方向为中药资源与分子鉴定。E-mail: lrx1125@126.com

D. versipellis (Hance) M. Cheng ex Ying、小八角莲 *D. difformis* (Hemsl. et Wils.) T. H. Wang ex Ying、六角莲 *D. pleiantha* (Hance) Woods、川八角莲 *D. veitchii* (Hemsl. et Wils.) Fu ex Ying、贵州八角莲 *D. majorensis* (Gagnep.) Ying、云南八角莲 *D. aurantiocaulis* (Hand. -Mazz.) Hu 以及西藏八角莲 *D. tsayuensis* Ying] 和桃儿七 [桃儿七 *S. hexandrum* (Royle) Ying] 属, 共 9 个种^[5], 其中鬼臼属为我国多型特有属^[6], 是我国特有的国家级保护植物, 且八角莲与六角莲被列为国家 III 类保护品种^[7], 神农架著名珍稀中药材“四个一”之一“江边一碗水”的 3 种药材来源^[8]——南方山荷叶、八角莲、六角莲。因该类药材的基原植物对生长环境要求苛刻、生长缓慢, 加之人们的任意采挖, 野生资源急剧骤减、药材资源异常短缺、临床应用受到严重限制, 资源保护工作亟待加强^[9]。

DNA 条形码技术是利用标准的、具有足够变异的、易扩增且相对较短的 DNA 片段的特异性和种间的多样性而创建的一种新的生物身份识别技术, 该 DNA 片段具有种间的多样性及特异性,

可实现对物种的快速自动鉴定, 并有望实现自动化^[10-11]。在中药材鉴定中, DNA 条形码鉴定相比于传统中药鉴定方法有着革命性的进步^[12], 国家药典委员会已在《中国药典》2015 年版增补本中列入中药材 DNA 条形码分子鉴定指导原则, 并规定植物类中药材的鉴定以 ITS2 序列为主^[13]。目前, 此技术广泛应用在植物分类、中药材鉴定等方面, 并且在柴胡^[14]、贝母^[15]、冬虫夏草^[16]、枸杞^[17]等药材上已得到验证。

本研究旨在通过 DNA 条形码技术对 5 种鬼臼类中药材进行鉴别, 包括南方山荷叶、桃儿七、八角莲、小八角莲和六角莲, 为解决其供需矛盾、满足人工栽培的需要、解决鬼臼类中药材野生药用植物资源缺乏等问题奠定基础^[12]。

1 材料

本实验共收集 26 份样品, 其中基原植物样本 13 份, 药材样本 13 份。均经武汉大学杜巍副教授鉴定, 凭证标本保存于化学化工与生命科学学院中药资源与分子鉴定实验室。另从 GenBank 中下载 15 条序列。样品信息见表 1 和表 2。

表 1 样品及序列信息

Table 1 Materials used in study

物种名	凭证样本号	部位	GenBank 登录号	产地
南方山荷叶	SNJ149、SNJ356、SNJ295、BSSN01~03	根	KY746321~KY746326	湖北神农架
	SSN133-1~6	叶	KY746327~KY746332	湖北神农架
八角莲	ES370-1、ES370-2、ES008-1、ES008-3、ES358-1	叶	KY701310~KY701314	湖北恩施
	SN286-1~3、SSN110-1	叶	KY701315~KY701318	湖北神农架
桃儿七	XZ01、XZ03~05	叶	KY746333~KY746336	西藏
	BSGX02	根	KY746337	河北安国

表 2 GenBank 下载序列信息

Table 2 Sequence information download from GenBank

物种名	GenBank 登录号
南方山荷叶	KC494673、KC494674、AF328966、DQ478609、KC494678~KC494681
六角莲	KJ734669~KJ734671、KM980518.1、KT290660.1、KT290661.1、KT290662.1
小八角莲	KC494661、KC494660、KT290664.1、KT290665.1

2 方法

2.1 DNA 提取、PCR 扩增和序列鉴定

南方山荷叶、八角莲、桃儿七的干燥叶或根茎均用 75%乙醇擦拭药材表面后, 分别取干燥叶和根茎约 30 mg 和 50 mg, 用高通量组织研磨器研磨 2 min (50 Hz) 后, 水浴 8~12 h。利用植物基因组 DNA 提取

试剂盒方法 (Tiangen Biotech Co., 中国) 提取总 DNA。提取过程中, 氯仿-异戊醇 (24:1) 抽提 2 次, 沉淀 DNA 步骤时, 用-20 ℃预冷的异丙醇沉淀 DNA, 摇匀, 放入-20 ℃冰箱冷冻 30 min, 用 50 μL ddH₂O 洗脱。叶片的 DNA 提取方法按照陈士林^[18]的方法。

PCR 扩增、测序正向引物 P3: 5'-YGACTCT-CGGCAACGGATA-3'; 反向引物 E4: 5'-RGTTTC-TTTTCCTCCGCTTA-3'。PCR 反应体系为 25 μ L, 体系内包含 PCRMix 12.5 μ L, 2.5 μ mol/L 引物各 1 μ L, 模板 DNA 约 20~100 ng。扩增程序: 94 $^{\circ}$ C 变性 5 min; 再进行 35 个循环 (94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min); 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。电泳检查 PCR 扩增情况, 进行双向测序。

2.2 数据处理

测序峰图利用 CodonCode A-linger V 3.7.1 (CodonCode Co., 美国) 校对拼接, 去除引物区。对接后的序列采用基于隐马尔科夫模型的 HMMer 注释方法去除两端 5.8 S 和 28 S 区段即可获得 ITS2 间隔区序列^[19]。所得序列经 BLAST 网站比对均正确。运用软件 MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) 6.0 对所有序列进行分析对比^[20], 并基于 K2P (Kimura 2-Parameter) 模型进行遗传距离分析, 用邻接 (Neibor 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。

3 结果

3.1 种内和种间遗传距离分析

3.1.1 种内遗传距离分析 基于 K2P 模型计算遗传距离, ITS2 序列种内种间平均 K2P 距离见表 3。南方山荷叶种内 K2P 距离为 0, 八角莲种内平均 K2P 距离为 0.005, 种内最大 K2P 距离为 0.013; 小八角莲 4 条 ITS2 序列种内 K2P 距离为 0.008; 桃儿七种内平均 K2P 距离为 0.004, 种内最大 K2P 距离为 0.013; 六角莲 ITS2 序列种内平均 K2P 距离为 0.006, 种内最大 K2P 距离为 0.013。

3.1.2 种间遗传距离分析 南方山荷叶与其他 4 种鬼臼类中药材种间 K2P 距离的范围为 0.075~0.124, 种间最小遗传距离为 0.075, 大于种内最大 K2P 距离 0。小八角莲与其他 4 种鬼臼类中药材种间 K2P 距离的范围为 0.044~0.100, 种间最小遗传距离为 0.044, 大于种内最大 K2P 距离 0.008。桃儿七与其他 4 种鬼臼类中药材种间 K2P 的范围为 0.044~0.095, 种间最小遗传距离为 0.044, 大于种内最大 K2P 距离 0.013。六角莲与其他 4 种鬼臼类中药材种间 K2P 的范围为 0.044~0.119, 种间最小遗传距离为 0.044, 大于种内最大 K2P 距离 0.002。八角莲与其他 4 种鬼臼类药材最小遗传距离为 0.044~0.124, 大于种内最大 K2P 距离

表 3 5 种鬼臼类中药材种内、种间遗传距离

Table 3 Intrapecific and interapacific genetic distance in five kinds of *Dysosma* Chinese herbal medicines

遗传距离	遗传距离范围 (平均值)
南方山荷叶种内	0
八角莲种内	0~0.013 (0.005)
小八角莲种内	0.008
桃儿七种内	0~0.013 (0.004)
六角莲种内	0~0.004 (0.002)
南方山荷叶和八角莲种间	0.109~0.124 (0.118)
南方山荷叶和小八角莲种间	0.090~0.100 (0.095)
南方山荷叶和桃儿七种间	0.075~0.085 (0.078)
南方山荷叶和六角莲种间	0.109~0.119 (0.114)
八角莲和小八角莲种间	0.044~0.067 (0.046)
八角莲和桃儿七种间	0.071~0.095 (0.079)
八角莲和六角莲种间	0.114~0.119 (0.009)
小八角莲和桃儿七种间	0.080~0.095 (0.088)
小八角莲和六角莲种间	0.044~0.067 (0.116 9)
桃儿七和六角莲种间	0.044~0.080 (0.065)

0.013。以上数据显示, 5 种药材的种内最大遗传距离均小于其种间最小遗传距离。

3.2 基于 ITS2 序列的 5 种鬼臼类中药材 NJ 树建立

NJ 树可更直观地显示鉴定结果, 因此本实验基于 ITS2 序列构建了南方山荷叶、桃儿七、八角莲、小八角莲和六角莲 NJ 树图, 如图 1 所示。树图显示, 南方山荷叶、桃儿七、八角莲、小八角莲和六角莲均各自聚为一支。结果表明, ITS2 作为条形码可准确区分南方山荷叶、桃儿七、八角莲、小八角莲和六角莲。

4 讨论

4.1 鬼臼类中药材 DNA 提取与 PCR 扩增

DNA 的提取是开展 DNA 条形码鉴定中药材的第一步, 也是至关重要的一步。桃儿七等根茎类药材取样时应注意刮去外表皮, 避免污染; 并且因为其中含有较多薄壁组织和纤维等物质, 可以适当增加取样量, 延长水浴时间等方法^[21-22], 尽可能提取到足够浓度的 DNA。通过实验, 可发现鬼臼类中药材采用改良过的试剂盒法一般都能成功提取其 DNA。有些样品提取 DNA 浓度较低, 在 PCR 的时候可适当增大 PCR 体系中的 DNA 模板浓度。

4.2 ITS2 序列在 5 种鬼臼类中药材中的鉴定能力

各物种种内最大 K2P 遗传距离均远小于种间



Bootstrap 1 000 次重复, 支上数值仅显示自展支持率 $\geq 50\%$

Bootstrap 1 000 repetitions, the value on the support only shows self-support support rate $\geq 50\%$

图 1 基于 ITS2 序列构建的 5 种鬼臼类中药材的 NJ 树

Fig.1 NJ system clustering tree of podophyllum based on ITS2 sequences

最小 K2P 遗传距离; 从系统邻接树可知, 5 种药材各自聚为一支, 可以很好地区分开。以上结果表明, ITS2 序列能很好地对南方山荷叶、八角莲、六角莲、小八角莲和桃儿七 5 种鬼臼类中药材进行鉴别。基于以上分析, ITS2 序列在鬼臼类中药材物种分子鉴定中具有较大潜力。

4.3 将 DNA 条形码技术在鬼臼类中药材中应用的意义

中药同名异物现象直接影响着中药的质量及临床用药安全, 是目前中药广泛应用于市场必须面临的一大难题^[23]。本研究采用改良的试剂盒法成功提取了 26 份实验样本总 DNA, 以及在 NCBI 网站

下载若干序列,并对所得序列其进行剪切、变异分析、遗传距离分析和构建 NJ 树,通过研究表明,ITS2 序列可对常见鬼臼类药材明显区分。该研究为有效解决中药同名异物现象和保障临床准确用药提供了参考。

参考文献

- [1] 杨显志,郭仕平,张玲琪,等.鬼臼类植物产鬼臼毒素内生真菌的筛选[J].天然产物研究与开发,2003,15(5):419-422.
- [2] 神农.神农本草经[M].合肥:黄山书社,2013.
- [3] 黄晓育.中药鬼臼的应用研究[J].陕西中医,2002,23(10):942-943.
- [4] 马绍宾,胡志浩.小檗科鬼臼亚科的地理分布与系统发育[J].植物分类与资源学报,1997(1):48-56.
- [5] 陈毓亨.我国鬼臼类植物资源的研究[J].药学报,1979(2):101-107.
- [6] 沈显生.神农架药用植物资源[J].中国野生植物资源,1999(1):15-17.
- [7] 张燕,黎斌,李思锋,等.八角莲的濒危成因剖析[J].中国野生植物资源,2012,31(1):62-64.
- [8] 韩腾飞,董浩,程亮,等.江边一碗水的药用研究概况[J].中成药,2012,34(6):1151-1154.
- [9] 何银生,由金文,刘海华,等.恩施州中药资源可持续利用研究[J].湖北农业科学,2011,50(12):2481-2486.
- [10] 任保青,陈之端.植物DNA条形码技术[J].植物学报,2010,45(1):1-12.
- [11] Newmaster S G, Grguric M, Shanmughanandhan D, et al. DNA barcoding detects contamination and substitution in North American herbal products[J]. BMC Med, 2013, 11(1): 222.
- [12] 陈士林,郭宝林,张贵君,等.中药鉴定学新技术新方法研究进展[J].中国中药杂志,2012,37(8):1123-1126.
- [13] 陈士林,姚辉,韩建萍,等.中药材DNA条形码分子鉴定指导原则[J].中国中药杂志,2013,38(2):141-148.
- [14] 王亚丹,韩晓妮,赵玉丹,等.基于ITS2条形码鉴别市售柴胡药材及其混伪品[J].中草药,2017,48(17):3590-3596.
- [15] 俞超,梁孝祺,陈金金,等.DNA条形码技术鉴定贝母属植物[J].中草药,2014,45(11):1613-1619.
- [16] Xiang L, Song J, Xin T, et al. DNA barcoding the commercial Chinese caterpillar fungus[J]. FEMS Microb Let, 2013, 347(2): 156-162.
- [17] Xin T, Yao H, Gao H, et al. Super food *Lycium barbarum*, (Solanaceae) traceability via an internal transcribed spacer 2 barcode[J]. Food ResInter, 2013, 54(2): 1699-1704.
- [18] 陈士林.中药DNA条形码分子鉴定[M].北京:人民卫生出版社,2012.
- [19] Keller A, Schleicher T, Schultz J, et al. 5S-28S rRNA interaction and HMM-based ITS2 annotation[J]. Gene, 2009, 430(1/2): 50-57.
- [20] Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0[J]. Mol Biol Evol, 2013, 30(12): 2725.
- [21] 段中岗,黄琼林,杨锦芬,等.适合中药材DNA条形码分析的DNA提取方法的研究[J].中药新药与临床药理,2009,20(5):480-484.
- [22] 罗焜,马培,姚辉,等.中药DNA条形码鉴定中的DNA提取方法研究[J].世界科学技术—中医药现代化,2012,14(2):1433-1439.
- [23] 谢宗万.中药材名称规范化研究[J].中国实验方剂学杂志,2002,26(S1):725-727.