

• 药材与资源 •

基于 DNA 条形码技术的民族药紫丹参及其近缘种鉴定研究

段宝忠¹, 李 巍², 邓海星^{1,3*}, 兰竹慧⁴, 吴中相⁴, 罗晓芳⁵, Leslaw. Mleczko⁵

1. 大理大学药学院, 云南 大理 671000

2. 拜耳医药保健有限公司, 上海 200127

3. 滇虹药业集团有限公司, 云南 昆明 650000

4. 拜耳(中国)有限公司, 上海 200127

5. Bayer AG, Leverkusen 有限公司, 德国 51368

摘要:目的 探讨 DNA 条形码技术在民族药紫丹参及其近缘物种鉴定中的应用, 为紫丹参药材鉴定提供参考。方法 建立紫丹参及其混伪品 DNA 条形码参照数据库, 通过比对序列、分析变异位点、计算遗传距离和构建邻接树等分析数据, 并应用该数据库对市场药材进行鉴定。结果 DNA 条形码技术可有效鉴别紫丹参及其混伪品。结论 ITS2 序列可作为紫丹参及其混伪品的鉴定条形码, 该技术在民族药物种基原鉴定、标准制定和市场监管等实际应用中具有重要的应用价值。

关键词: 民族药; 紫丹参; DNA 条形码; 标准序列; ITS2

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)05-1204-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.05.026

Identification of ethnic medicine *Salvia yunnanensis* and its closely related species based on DNA barcode techniqueDUAN Bao-zhong¹, LI Wei², DENG Hai-xing^{1,3}, LAN Zhu-hui⁴, WU Zhong-xiang⁴, LUO Xiao-fang⁵, Leslaw. Mleczko⁵

1. College of Pharmaceutical Science, Dali University, Dali 671000, China

2. Bayer Healthcare Co. Ltd., Shanghai 200127, China

3. Dihon Pharmaceutical Group. Co., Ltd., Kunming 650000, China

4. Bayer (China) Limited, Shanghai 200127, China

5. Bayer AG, Leverkusen 51368, Germany

Abstract: Objective To explore the application of DNA barcode technology in identification of ethnic medicine *Salvia yunnanensis* and its related species, so as to provide reference for identification of *S. yunnanensis*. **Methods** A DNA barcode database of *S. yunnanensis* and its adulterants was successfully constructed. Data were analyzed by aligning sequences, analyzing variation sites, calculating genetic distances, and establishing Neighbor-Joining trees. The database was used to identify 45 *S. yunnanensis* decoction piece samples purchased from drug stores. **Results** The results showed that the ITS2 barcodes can be used to identify *S. yunnanensis* and its adulterants. **Conclusion** The use of DNA barcoding for market supervision can broaden the application of this technology and provide an excellent inspection method for the supervisory institutions. This study substantially contributes to the protection of public health worldwide.

Key words: ethnic medicine; *Salvia yunnanensis* C. H. Wright; DNA barcode; standard sequence; ITS2

紫丹参, 又名云南鼠尾草、滇丹参等, 为唇形科植物云南鼠尾草 *Salvia yunnanensis* C. H. Wright 的干燥根, 主产于云南、四川等地, 为《云南省中

药材标准》收载品种, 具有祛瘀止痛、活血通经、清心除烦的功效, 用于月经不调、经闭痛经、癥瘕积聚、胸腹刺痛、热痹疼痛、疮疡肿痛、心烦不眠、

收稿日期: 2018-09-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31460084); 云南省中青年学术技术带头人后备人才项目(2015HB058); 大理大学-四川滇虹药业合作项目(CDDC2017087); 大理大学博士启动基金资助项目(KYBS201737)

作者简介: 段宝忠, 博士, 副教授, 研究方向为中药资源与鉴定。Tel: (0872)2257411 E-mail: bzduan@126.com

*通信作者 邓海星, 高级工程师, 研究方向为药物质量控制。E-mail: haixing.deng@bayer.com

肝脾肿大、心绞痛等症^[1]。其在云南民间具有悠久的用药历史,始见于《滇南本草》记载“一味可抵四物汤补血之功”,成方制剂丹莪妇康煎膏、紫丹活血片等多个成药以其为君药^[2-3],具有较高的开发利用价值。其主要成分为丹参酮 I、II_A、II_B,隐丹参酮、丹酚酸、丹参醇、维生素 E 等,具有抑制血小板聚集、增加冠脉血流等多种药理作用^[4-5]。近年来,由于过度采挖,使得紫丹参资源日益稀缺,甚至面临濒危。目前市场上出现了较多的混伪品,经文献和市场调研,除其他科药材牛蒡容易混淆,尚有多种鼠尾草属植物在民间充当紫丹参使用,主要涉及丹参 *S. miltiorrhiza* Bunge、戟叶鼠尾草 *S. bulleyana* Diels、三叶鼠尾草 *S. trijuga* Diels、甘西鼠尾草 *S. przewalskii* Maxim.、荞麦地鼠尾草 *S. kiaometiensis* Lévl.、毛地黄鼠尾草 *S. digitaloides* Diels、橙色鼠尾草 *S. aerea* Lévl.、栗色鼠尾草 *S. castanea* Diels 等多种^[6]。目前已有应用性状、显微、理化(红外光谱、薄层色谱)和指纹图谱等方法对同属植物丹参及其混伪品进行鉴别^[7-10]的报道,由于紫丹参的混伪品基原复杂,这些方法易受到生物体生长发育、外在环境变化及主观因素等影响^[11],无法实现有效鉴别,对临床用药安全造成极大威胁。

DNA 条形码(DNA barcode)技术是当前生物学研究热点之一,已广泛用于中药材(不含矿物)的基原鉴定及其混伪品的鉴别,并取得了良好的效果^[11-13]。陈士林等^[14]对大量样本的研究表明,ITS2 序列是鉴定药用植物及其混伪品的理想条形码。已有学者采用 DNA 条形码技术对丹参、甘肃丹参和牛蒡的鉴别进行了研究,表明该技术可有效鉴别 3 类药材^[15],由于该研究仅选择了 3 类样品,且未包含紫丹参样品,无法用于紫丹参及其混伪品的鉴定。鉴于此,本研究采用 DNA 条形码技术,对紫丹参及其近缘种的鉴别进行了研究。在此基础上,对 45 批标签为紫丹参和丹参的市售药材进行了鉴定,以期对紫丹参的用药安全及质量控制提供科学参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

1-14K 型高速冷冻离心机(Sigma 公司);6670 型植物组织研磨仪(SPEX SamplePrep 公司);Biometra Tone PCR 仪;DYY-8C 型电泳仪(北京市六一仪器厂);JY04S-3C 型紫外凝胶成像分析仪(北京君意东方电泳设备有限公司);各种量程的微量移液器(Eppendorf 公司)。

1.2 试剂

植物基因组提取试剂盒(Tiagen Biotech Co., 中国);DL2000 DNA marker 购自天根生化科技(北京)有限公司;三氯甲烷、异戊醇、无水乙醇、异丙醇等购自北京化工厂,均为分析纯;引物由上海生工生物技术服务公司合成。

1.3 材料

27 份植物样本,包括云南鼠尾草 *Salvia yunnanensis* C. H. Wright、丹参 *S. miltiorrhiza* Bunge、戟叶鼠尾草 *S. bulleyana* Diels、三叶鼠尾草 *S. trijuga* Diels 4 个物种,经笔者根据植物性状鉴定。同时从 GenBank 下载紫丹参常见伪品的 ITS2 序列 19 条,包括甘西鼠尾草 *S. przewalskii* Maxim.、荞麦地鼠尾草 *S. kiaometiensis* Lévl.、毛地黄鼠尾草 *S. digitaloides* Diels、橙色鼠尾草 *S. aerea* Lévl.、栗色鼠尾草 *S. castanea* Diels、荔枝草 *S. plebeia* R. Br. 等 6 个物种,见表 1。上述 10 个物种共 46 条 ITS2 序列用于构建紫丹参及近缘种的标准条形码数据库。23 批紫丹参和 22 批丹参药材购于市场,经大理大学夏从龙教授和笔者根据性状鉴定,两人鉴定结果一致时保留该样本,不一致时舍弃(表 2)。

2 方法

2.1 DNA 提取

药材使用 75%乙醇清洁表面后,置于 75%乙醇中浸泡 3 min,晾干后取 40~50 mg 加液氮研磨;植物新鲜叶片采集后,用变色硅胶干燥,使用时取叶片约 30 mg,用植物组织研磨仪研磨 2 min。总 DNA 提取按植物组织提取试剂盒操作步骤进行,部分步骤进行了调整,在组织研磨后,使用核分离缓冲液(100 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0; 20 mmol/L EDTA, pH 8.0; 0.3 mmol/L NaCl; 2% PVP40; 2% β-巯基乙醇)抽提 2 次;水浴温度为 56 °C,水浴时间 10 h;水浴后,使用氯仿-异戊醇(24:1)抽提 2 次。DNA 沉淀时,沉淀剂改为-20 °C 预冷的异丙醇。

2.2 PCR 扩增及测序

ITS2 序列扩增引物,以及 PCR 条件参照文献进行^[16],引物合成由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。有条带的 PCR 产物送上海美吉生物医药科技有限公司进行双向测序。

2.3 数据处理

DNA 序列数据用 CodonCode Aligner 5.1.5 (CodonCode Co., 美国)进行组装拼接。基于隐马尔夫模型的 HMMer 注释方法将所得序列及 GenBank

表 1 样品信息

Table 1 Information of samples

序号	中文名	拉丁名	标本号 (采集地点)	GenBank 下载序列
1	云南鼠尾草	<i>S. yunnanensis</i>	YN1825MT25 (云南省宾川县) YN1825MT26 (云南省宾川县) YN1825MT27 (云南省宾川县) YN1825MT35 (云南省漾濞县) YN1825MT36 (云南省漾濞县) YN1825MT43 (云南省洱源县) YN1825MT44 (云南省洱源县) YN2551MT03 (云南省大理市) YN2551MT05 (云南省大理市) YN2551MT06 (云南省巍山县) YN2551MT08 (云南省大理市) YN2551MT11 (云南省巍山县) YN2551MT12 (云南省巍山县)	KJ397258.1、DQ132866.1、 EF014344.1
2	丹参	<i>S. miltiorrhiza</i>	YN1825MT59 (云南省漾濞县) YN1825MT60 (云南省漾濞县) YN1825MT61 (云南省漾濞县) YN1825MT62 (云南省漾濞县) YN1825MT63 (云南省漾濞县) YN1825MT64 (云南省漾濞县) YN1825MT65 (云南省弥渡县)	DQ132863.1、MF096713.1、 MF096716.1、KJ397256.1
3	戟叶鼠尾草	<i>S. bulleyana</i>	YN2522MT01 (云南省大理市) YN2522MT02 (云南省大理市) YN1825MT86 (云南省宾川县) YN1825MT87 (云南省宾川县)	无
4	三叶鼠尾草	<i>S. trijuga</i>	YN2325MT01 (云南省宾川县) YN2325MT02 (云南省鹤庆县) YN1825MT88 (云南省鹤庆县)	DQ132870.1
5	甘西鼠尾草	<i>S. przewalskii</i>	未知	KJ397260.1、KC473271.1、 KC473268.1、KC473272.1、 KC473270.1
6	荞麦地鼠尾草	<i>S. kiaometiensis</i>	未知	KC473239.1
7	毛地黄鼠尾草	<i>S. digitaloides</i>	未知	DQ132869.1、KJ397259.1
8	橙色鼠尾草	<i>S. aerea</i>	未知	KC473229.1
9	栗色鼠尾草	<i>S. castanea</i>	未知	KC473231.1
10	荔枝草	<i>S. plebeia</i>	未知	LC060738.1

表 2 市场药材信息

Table 2 Information of medicinal materials in market

样本号	产地	性状鉴定结果	部位	样本号	产地	性状鉴定结果	部位
HMS-01	云南省红河州	紫丹参	根	HMS-24	河南省南召县崔庄乡	丹参	根
HMS-02	云南省楚雄州	紫丹参	根	HMS-25	河南省南阳市伏牛山	丹参	根
HMS-03	云南省曲靖市	紫丹参	根	HMS-26	山东省潍坊市临阳县	丹参	根
HMS-04	云南省红河州	紫丹参	根	HMS-27	河南省南阳市	丹参	根
HMS-05	云南省曲靖市	紫丹参	根	HMS-28	河南省南召县南河店镇	丹参	根
HMS-06	云南省大理州	紫丹参	根	HMS-29	河南省南阳市	丹参	根
HMS-07	不详	紫丹参	根	HMS-30	河南省南召县伏牛山	丹参	根
HMS-08	不详	紫丹参	根	HMS-31	四川省中江市	丹参	根
HMS-09	不详	紫丹参	根	HMS-32	山东省莱芜市	丹参	根
HMS-10	不详	紫丹参	根	HMS-33	四川省中江市	丹参	根
HMS-11	不详	紫丹参	根	HMS-34	山东省莱芜市	丹参	根
HMS-12	不详	紫丹参	根	HMS-35	云南省文山市	丹参	根
HMS-13	不详	紫丹参	根	HMS-36	四川省中江市	丹参	根
HMS-14	不详	紫丹参	根	HMS-37	云南省红河州	丹参	根
HMS-15	不详	紫丹参	根	HMS-38	四川省中江市	丹参	根
HMS-16	不详	紫丹参	根	HMS-39	四川省中江市	丹参	根
HMS-17	不详	紫丹参	根	HMS-40	云南省漾濞县	丹参	根
HMS-18	不详	紫丹参	根	HMS-41	大理三月街药材市场	丹参	根
HMS-19	云南省大理市	紫丹参	根	HMS-42	大理三月街药材市场	丹参	根
HMS-20	云南省大理市	紫丹参	根	HMS-43	大理三月街药材市场	丹参	根
HMS-21	云南省巍山县	紫丹参	根	HMS-44	大理三月街药材市场	丹参	根
HMS-22	云南省巍山县	紫丹参	根	HMS-45	大理三月街药材市场	丹参	根
HMS-23	云南省巍山县	紫丹参	根				

序列, 除去 5.8 S 和 28 S 区段, 获得 ITS2 序列。剪切好的序列提交到美国国家生物技术信息中心 (NCBI, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 和中药材 DNA 条形码数据库 (TCM Barcode, <http://www.tcmbarcode.cn/china>) 进行比对校验。采用 MEGA 6.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) 构建 NJ (neighbor-joining) 树, Kimura 2-Parameter (K2P) 法计算遗传距离。

3 结果与分析

3.1 测序结果分析

27 批植物样本包括 4 个鼠尾草属物种, 其叶片 DNA 扩增和测序成功率均为 100%; 23 批紫丹参药材中, 有 18 批扩增成功, 测序成功率为 100%。经对未能成功扩增的 5 批药材进行分析, 失败的原因可能是由于紫丹参药材主要为野生资源, 多为民间少量采集, 其干燥方式多样化, 此 5 批药材在干燥过程中, 可能采用了较高的温度进行烘烤, 破坏了药材的 DNA。而 22 批丹参药材其测序和扩增成功

率均为 100%, 由于丹参为人工种植, 其加工方式规范, 亦从侧面证实了上述推测。

3.2 ITS2 序列种内种间遗传距离分析

用于构建参照数据库的 46 条 ITS2 序列 (27 条植物样本序列, 19 条 GenBank 下载序列) 长度范围为 228~230 bp, GC 含量为 62.28%~68.85%。紫丹参种内 13 个样本间的遗传距离为 0~0.018, 与其他近缘种间的 K2P 距离为 0.027~0.132。丹参种内 7 个样本间为 0~0.009, 与其他近缘种间的 K2P 距离为 0.027~0.132。紫丹参及丹参的种内遗传距离均小于种间遗传距离, 表明 ITS2 序列可用于紫丹参和丹参及其混伪品的鉴别。

3.3 聚类分析

基于 46 条含 10 个物种的 ITS2 序列, 构建的 NJ 系统聚类树 (图 1) 显示, 10 种鼠尾草属植物被分为 4 支, 其中云南鼠尾草 (紫丹参) 和丹参、荔枝草 3 个物种各单独聚为一支, 能与其他近缘种明显区分; 其他 7 个物种甘西鼠尾草、荞麦地鼠尾草、

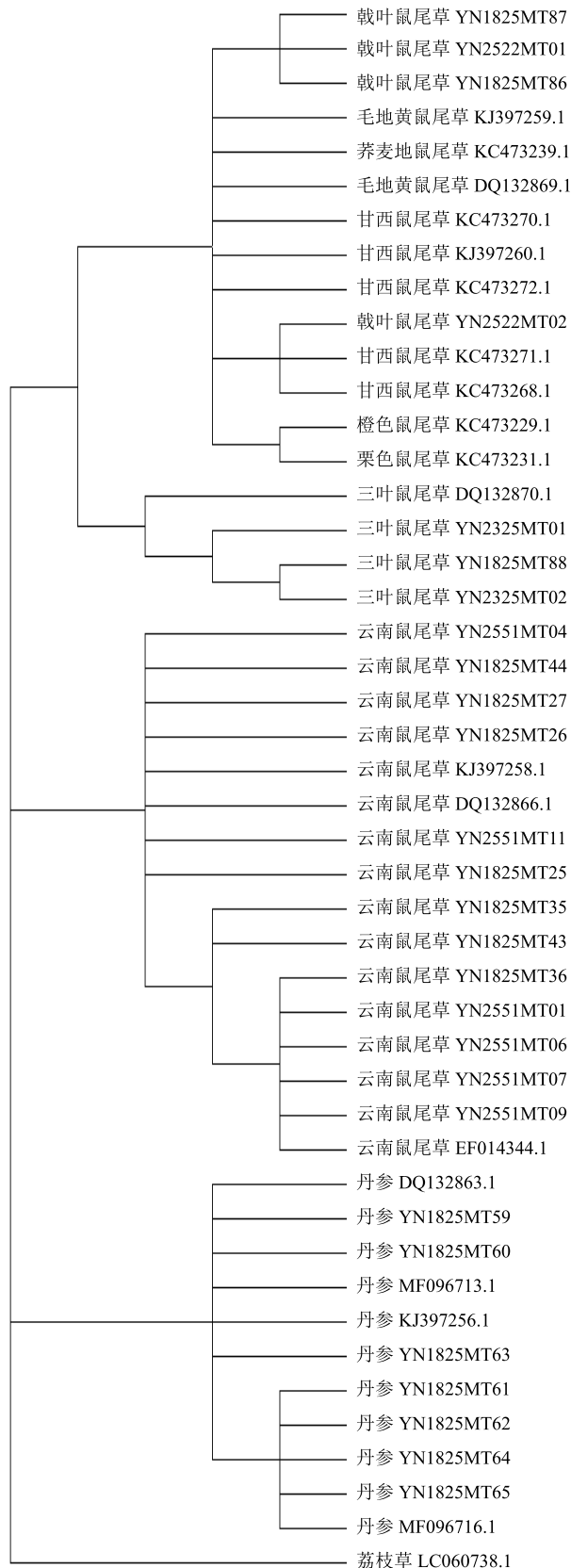


图 1 基于 ITS2 序列紫丹参及近缘种 NJ 树

Fig. 1 Neighbor-Joining tree of *S. yunnanensis* and its closely related species based on ITS2 sequences

毛地黄鼠尾草、橙色鼠尾草、栗色鼠尾草、三叶鼠尾草、戟叶鼠尾草聚为一枝，表明上述 7 个物种亲缘关系较近，采用 ITS2 序列无法对上述物种进行区分。通过 NJ 树可看出，ITS2 条形码能有效鉴别紫丹参、丹参及其混伪品。

3.4 紫丹参药材鉴定能力分析

将 45 批经两位专家根据性状鉴定的药材（编号 HMS-01~45），提取 DNA 后测序，将获得的 ITS2 序列分别在 NCBI 数据库（NCBI, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>）和中药材 DNA 条形码鉴定系统（TCM-DBS, <http://www.tcmbarcode.cn/china/>）进行相似性搜索，DNA 条形码比对结果见表 3。从表 3 可看出，40 批紫丹参和丹参药材 DNA 鉴定结果与专家性状鉴定结果一致。

将 40 批药材 ITS2 序列与上述 46 条参照样本 ITS2 序列构建 NJ 树（图 2）。从图 2 可看出，紫丹参及丹参与参照植物样本各自聚为一支；其中样品 HMS-02~12 和 HMS-16、HMS-17、HMS-19~23 与紫丹参聚为一支；样品 HSM24~45 与丹参聚为一支，呈现明显的单系性。混伪品则各聚为一支，能够与紫丹参及丹参明显区分。因此，ITS2 序列可作为紫丹参及其混伪品的鉴别，是紫丹参鉴定理想的 DNA 条形码。

3.5 紫丹参 DNA 条形码标准序列分析

参照《中国药典》2015 年版 DNA 条形码指导原则，选取紫丹参药材和植物样本共 30 条序列，比对后长度为 228 bp，有 4 个变异位点，分别为 31 位点 A-T 变异，38 位点 G-T 变异，170 位点 T-C 变异，204 位点 C-T 变异。主导单倍型序列特征见图 3。基于开源代码 PHP QR Code 的编码方式将紫丹参基原物种拉丁名和 ITS2 主导单倍型序列进行编码，获得紫丹参二维 DNA 条形码图片（图 3）。将上述 40 批药材样品与紫丹参 DNA 条形码标准序列（YN1825MT27）比较计算遗传距离，可见以紫丹参种内最大遗传距离 0.018 为界限，可明显区分丹参与紫丹参药材，结果见图 4。

4 讨论

4.1 ITS2 可作为紫丹参及其混伪品的 DNA 条形码

DNA 条形码鉴定技术为药材基原物种的鉴定提供了强有力的科技支撑^[16]，其不受环境因素、样品形态和材料部位的限制，已成为中药原植物和药材品种鉴别的有效手段^[17]。本研究将该方法用于民族药紫丹参及其混伪品的鉴定，结果显示

表 3 市售药材 BLAST 及 TCM-DBS 鉴定结果

Table 3 Molecular identification results using sequence database of TCM-DBS and GenBank BLAST search engines

样品号	长度/bp	BLAST			TCM-DBS		
		鉴定结果	序列相似性/%	登录号	鉴定结果	序列相似性/%	登录号
HMS-01	—	—	—	—	—	—	—
HMS-02	228	<i>S. yunnanensis</i>	99	KJ397258.1	<i>S. yunnanensis</i>	99.1	DQ132866
HMS-03	228	<i>S. yunnanensis</i>	100	KT210251.1	<i>S. yunnanensis</i>	100.0	EF373615
HMS-04	228	<i>S. yunnanensis</i>	99	KJ397258.1	<i>S. yunnanensis</i>	99.1	EF373617
HMS-05	228	<i>S. yunnanensis</i>	100	KJ397258.1	<i>S. yunnanensis</i>	99.6	DQ132866
HMS-06	228	<i>S. yunnanensis</i>	100	KJ397258.1	<i>S. yunnanensis</i>	99.6	DQ132866
HMS-07	228	<i>S. yunnanensis</i>	99	KJ397258.1	<i>S. yunnanensis</i>	98.7	DQ132866
HMS-08	228	<i>S. yunnanensis</i>	99	KJ397258.1	<i>S. yunnanensis</i>	97.8	EF373615
HMS-09	228	<i>S. yunnanensis</i>	99	KJ397258.1	<i>S. yunnanensis</i>	97.8	EF373617
HMS-10	228	<i>S. yunnanensis</i>	100	KJ397258.1	<i>S. yunnanensis</i>	100.0	EF373617
HMS-11	228	<i>S. yunnanensis</i>	99	JQ934164.1	<i>S. yunnanensis</i>	99.6	EF373617
HMS-12	228	<i>S. yunnanensis</i>	99	KJ397258.1	<i>S. yunnanensis</i>	99.6	DQ132866
HMS-13	—	—	—	—	—	—	—
HMS-14	—	—	—	—	—	—	—
HMS-15	—	—	—	—	—	—	—
HMS-16	228	<i>S. yunnanensis</i>	99	KJ397258.1	<i>S. yunnanensis</i>	99.1	DQ132866
HMS-17	228	<i>S. yunnanensis</i>	99	KJ397258.1	<i>S. yunnanensis</i>	99.1	DQ132866
HMS-18	—	—	—	—	—	—	—
HMS-19	228	<i>S. yunnanensis</i>	100	MG824292.1	<i>S. yunnanensis</i>	100.0	EF373617
HMS-20	228	<i>S. yunnanensis</i>	100	MG824249.1	<i>S. yunnanensis</i>	99.6	DQ132866
HMS-21	228	<i>S. yunnanensis</i>	100	MG824292.1	<i>S. yunnanensis</i>	100.0	EF373617
HMS-22	228	<i>S. yunnanensis</i>	100	MG824292.1	<i>S. yunnanensis</i>	100.0	EF373617
HMS-23	228	<i>S. yunnanensis</i>	100	MG824292.1	<i>S. yunnanensis</i>	100.0	EF373617
HMS-24	228	<i>S. miltiorrhiza</i>	100	MF096715.1	<i>S. miltiorrhiza</i>	100.0	YC0030MT15
HMS-25	228	<i>S. miltiorrhiza</i>	100	MF096713.1	<i>S. miltiorrhiza</i>	100.0	YC0030MT15
HMS-26	228	<i>S. miltiorrhiza</i>	100	MF096716.1	<i>S. miltiorrhiza</i>	100.0	YC0030MT11
HMS-27	228	<i>S. miltiorrhiza</i>	100	MF096715.1	<i>S. miltiorrhiza</i>	100.0	YC0030MT11
HMS-28	228	<i>S. miltiorrhiza</i>	100	MF096713.1	<i>S. miltiorrhiza</i>	100.0	YC0030MT15
HMS-29	228	<i>S. miltiorrhiza</i>	99	MF096715.1	<i>S. miltiorrhiza</i>	100.0	YC0030MT15
HMS-30	228	<i>S. miltiorrhiza</i>	99	MF096715.1	<i>S. miltiorrhiza</i>	100.0	YC0030MT15
HMS-31	228	<i>S. miltiorrhiza</i>	99	MF096716.1	<i>S. miltiorrhiza</i>	100.0	YC0030MT11
HMS-32	228	<i>S. miltiorrhiza</i>	100	MF096715.1	<i>S. miltiorrhiza</i>	100.0	YC0030MT11
HMS-33	228	<i>S. miltiorrhiza</i>	100	MF096716.1	<i>S. miltiorrhiza</i>	100.0	YC0030MT11
HMS-34	228	<i>S. miltiorrhiza</i>	100	MF096716.1	<i>S. miltiorrhiza</i>	100.0	YC0030MT11
HMS-35	228	<i>S. miltiorrhiza</i>	100	MF096716.1	<i>S. miltiorrhiza</i>	100.0	YC0030MT11
HMS-36	228	<i>S. miltiorrhiza</i>	100	MF096716.1	<i>S. miltiorrhiza</i>	100.0	YC0030MT11
HMS-37	228	<i>S. miltiorrhiza</i>	100	MF096715.1	<i>S. miltiorrhiza</i>	100.0	YC0030MT15
HMS-38	228	<i>S. miltiorrhiza</i>	100	MF096715.1	<i>S. miltiorrhiza</i>	100.0	YC0030MT11
HMS-39	228	<i>S. miltiorrhiza</i>	100	MF096715.1	<i>S. miltiorrhiza</i>	100.0	YC0030MT15
HMS-40	228	<i>S. miltiorrhiza</i>	100	MF096715.1	<i>S. miltiorrhiza</i>	100.0	Y1304034
HMS-41	228	<i>S. miltiorrhiza</i>	100	MG824232.1	<i>S. miltiorrhiza</i>	100.0	YC0030MT15
HMS-42	228	<i>S. miltiorrhiza</i>	100	MF096716.1	<i>S. miltiorrhiza</i>	100.0	YC0030MT11
HMS-43	228	<i>S. miltiorrhiza</i>	100	MF096716.1	<i>S. miltiorrhiza</i>	100.0	EF373611
HMS-44	228	<i>S. miltiorrhiza</i>	100	MG824232.1	<i>S. miltiorrhiza</i>	100.0	KC473277
HMS-45	228	<i>S. miltiorrhiza</i>	100	MG824232.1	<i>S. miltiorrhiza</i>	100.0	YC0030MT15

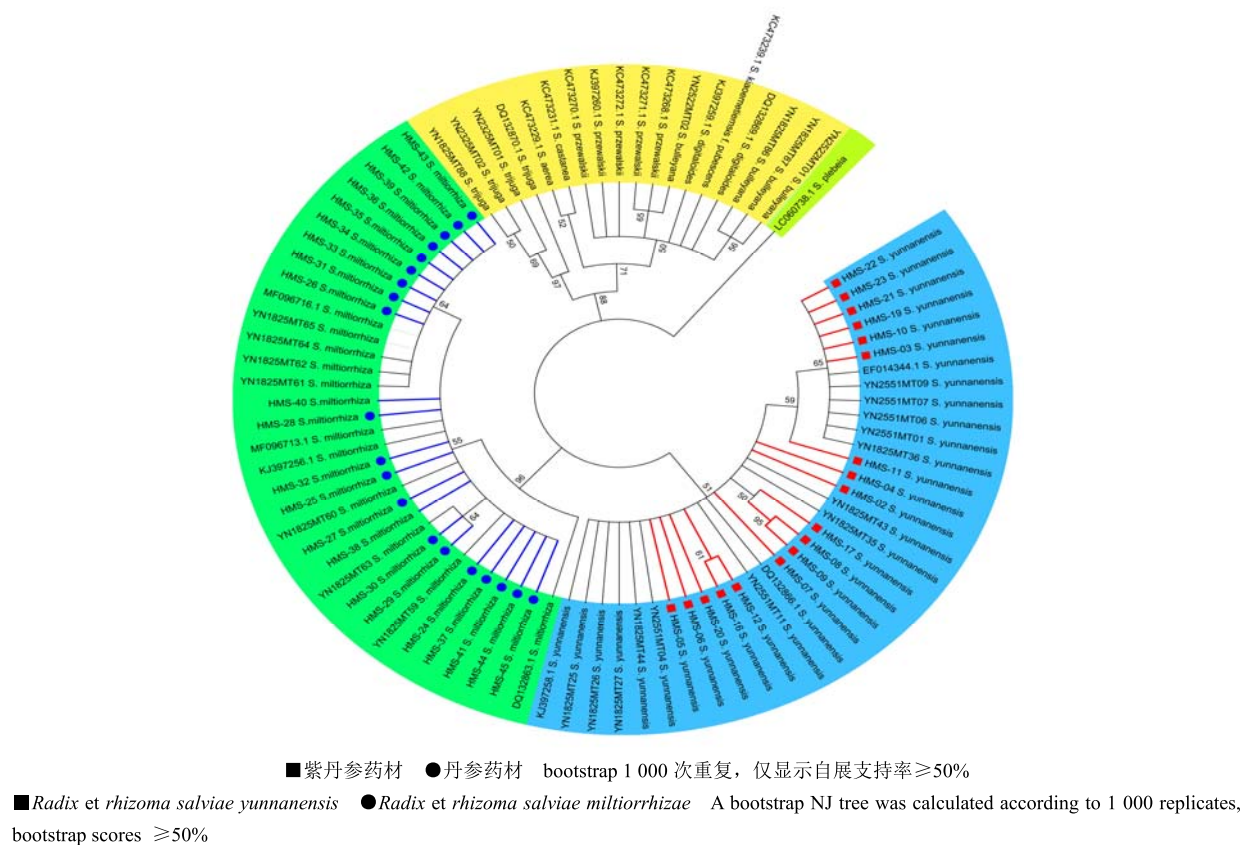


图 2 基于 ITS2 序列的市场药材及其混伪品 NJ 树

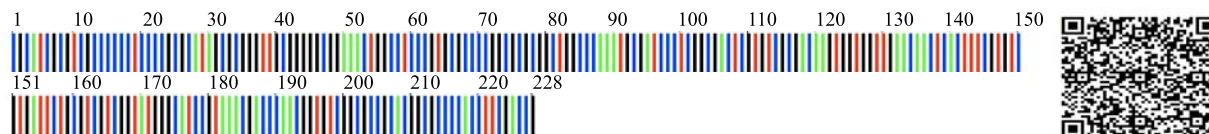
Fig. 2 Phylogenetic tree of *S. Yunnanensis* and their adulterants constructed with ITS2 sequences using NJ method

图 3 紫丹参 DNA 条形码及二维 DNA 条形码

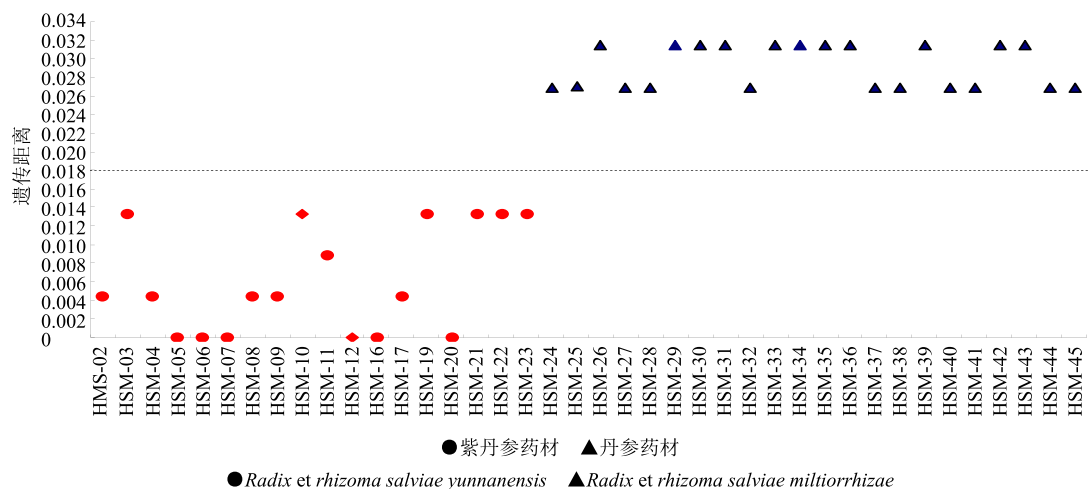
Fig. 3 DNA barcode and two-dimensional DNA barcode of *S. yunnanensis*

图 4 40 批药材与紫丹参标准序列比较遗传距离计算结果分布

Fig. 4 Distribution map of genetic distance between 40 batches of medicinal materials and standard sequence of *S. Yunnanensis*

紫丹参种内平均 K2P 遗传距离小于与近缘种的种间平均 K2P 遗传距离;此外,由构建的 NJ 树可以看出,紫丹参单独聚为一支,并与其他近缘种基原植物明显区分开。对 40 批药材的鉴定结果显示, DNA 条形码结果与专家性状鉴定结果一致。因此, ITS2 序列可作为鉴别紫丹参基原植物及近缘种的 DNA 条形码。

4.2 DNA 条形码标准序列对民族药鉴定的意义

正确的药材基原是保证药材质量和疗效的前提。药材的鉴定方法贯穿于种植、加工、生产等各个环节,传统的性状、显微和理化在中药材的物种鉴定上有一定的局限性^[16],难以满足医院、海关等各行业快速、标准的鉴定需求。《中国药典》2015 年版已将 DNA 条形码 ITS2 及 psbA-trnH 序列作为候选序列收录^[18-19]。本研究构建了紫丹参的标准 DNA 条形码系列,并将其用于 40 批药材的鉴别,结果显示鉴别效果良好。相比中药材,民族药多来源于民间贸易,且鉴别可参考资料有限,临床应用时不易区分,具有潜在的隐患。构建常用民族药材 DNA 条形码标准序列数据库,可以实现对常用民族药材的粉末以及细胞、组织等材料来源的准确快速鉴定和鉴别。本研究表明, DNA 条形码技术在民族药物种基原鉴定、标准制定、药材流通等实际应用中具有重要的价值。

志谢:滇虹药业集团有限公司、拜耳医药保健有限公司提供资金支持;中国医学科学院药用植物研究所姚辉研究员对文章修改提出建议。

参考文献

- [1] 云南省中药材标准 2005 版. (第 1 册) 彝药 [S]. 2010.
- [2] 国家中成药标准汇编妇科分册 [S]. 2002.
- [3] 国家中成药标准汇编 内科 心系分册 [S]. 2002.
- [4] 李惠兰, 闫彩珍, 张荣平, 等. 滇丹参注射液对兔血小板功能的影响 [J]. 天然产物研究与开发, 2002, 14(1): 70-73.
- [5] 闫彩珍, 李惠兰, 张荣平, 等. 滇丹参、甘西鼠尾、褐毛甘西鼠尾对离体豚鼠心脏的影响 [J]. 昆明医学院学报, 2002, 23(1): 14-17.
- [6] 谢宗万. 中药品种理论与应用 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008.
- [7] 李海鹰, 邵林岳, 林 峰. 丹参及其伪品牛蒡根的理化鉴别 [J]. 中药材, 1999, 22(9): 449-451.
- [8] 何广新, 李忠琼. 丹参和紫丹参的比较鉴别 [J]. 中药材, 1996, 19(7): 342-343.
- [9] 张晓灿, 罗丹丹, 陶爱恩, 等. 基于指纹图谱和化学计量学的丹参及紫丹参质量评价研究 [J]. 中药材, 2017, 40(5): 1061-1065.
- [10] 曹 珍, 谢晓亮. 丹参的不同鉴别方法 [J]. 时珍国医国药, 2007, 18(8): 1861-1863.
- [11] 尚飞能, 方海兰, 段宝忠. 基于 ITS2 条形码和化学指纹鉴别何首乌及其伪品 [J]. 大理大学学报, 2017, 2(4): 12-15.
- [12] 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.
- [13] Duan B Z, Fang H L, Li X W, *et al.* Survey of traditional Dai medicine reveals species confusion and potential safety concerns: a case study on *Radix Clerodendri Japonicum* [J]. *Chin J Nat Med*, 2017, 15(6): 417-426.
- [14] 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.
- [15] 张 萍, 黎先军, 杜微波, 等. 基于 ITS2 序列的丹参及其混伪品分子鉴定研究 [J]. 安徽农业科学, 2017, 45(30): 122-124.
- [16] 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.
- [17] 陈士林. 中药 DNA 条形码分子鉴定 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012.
- [18] 中国药典 [S]. 四部. 2015.
- [19] 陈士林. 中国药典中药材 DNA 条形码标准序列 [M]. 北京: 科学出版社, 2015.