

高良姜及其混淆品的分子鉴定^{*}

□ 罗 焜 (中国医学科学院 药用植物研究所 北京 100193)
(北京协和医学院)

陈科力 刘义梅 (湖北中医药大学药学院 武汉 430061)

姚 辉 韩建萍 马 培 孙 超^{**}

(中国医学科学院 药用植物研究所 北京 100193)
(北京协和医学院)

摘 要:目的:探讨基于 ITS2 条形码序列鉴定高良姜及其混淆品的新方法。方法:本研究对高良姜及其混淆品 6 个物种 9 份样品的 ITS2 序列进行 PCR 扩增和测序,同时扩大研究范围从 GenBank 上下载同属共 15 个物种 37 个样本。用 MEGA4.1 计算其种间、种内的 K2P 距离,并分析各样本间 ITS2 序列二级结构的差异,最后利用 ITS2 序列重构其系统发育树。结果:高良姜基源植物种内最大 K2P 距离为 0.0171,与混伪品的种间最小 K2P 距离为 0.0469;高良姜及其混淆品的 ITS2 二级结构存在明显差异;重构的系统发育树显示高良姜的不同来源聚在一支,能较好与混淆品区分。结论:ITS2 序列能够成功鉴定高良姜及其易混淆品,可以作为高良姜及其混淆品的分子鉴定工具。

关键词:高良姜 ITS2 序列 分子鉴定

doi: 10.3969/j.issn.1674-3849.2011.02.035

药材高良姜为姜科山姜属植物高良姜 *Alpinia officinarum* Hance 的干燥根茎,又名良姜、小良姜、贺哈等,始载于《名医别录》,历版《中国药典》均有收载^[1-2]。传统中医药理论认为具有温胃、祛风、散寒、行气、止痛的功效,现代药理学研究表明其具有较强的抗溃疡、抗腹泻、利胆、镇痛、抗炎、抗缺氧、抗凝、抗血栓形成等作用^[3-10]。作为岭南代表药材之一的

高良姜,虽台湾、广东、广西、云南、海南等主产地栽培品已逐步成为主要商品来源,但长期以来商品的种质基源混乱,加之各地用药习俗以及同名异物、同物异名现象严重,甚至其同属的华山姜 *A. chinensis*; 山姜 *A. japonica*; 红豆蔻 *A. galanga* 等混淆品频繁出现^[11-15],业内相关人员都在寻求能够快速准确鉴定高良姜及其易混淆品的方法。

2010 年 Chen 等^[17]利用 ITS2 序列考察包括 4800 个物种超过 6600 个药用植物样本后,发现其

收稿日期:2011-03-04

修回日期:2011-04-06

* 北京市科技计划项目(D08080203640901):羌活、石斛药材质量评价和分子生物学鉴定示范研究,负责人:陈士林。

** 通讯作者:孙超 副研究员,主要研究方向:药用植物功能基因组学,Tel:010-62899729,E-mail:csun@implad.ac.cn。

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>
(World Science and Technology/Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica) 400

物种水平鉴定效率达 92.7%。随后 ITS2 序列被证明能很好的运用于芸香科^[18]、蔷薇科^[19]、豆科^[20]、重楼属^[21]等科属的物种鉴定。在此基础上,Yao 等^[22]基于 GenBank 数据库中 50790 植物和 12221 动物 ITS2 序列进行大样本量下验证工作,结果表明 ITS2 序列不仅能用于植物的 DNA 条形码研究,而且还能很好的辅助 COI 序列用于动物的 DNA 条形码研究工作。越来越多的研究结果表明基于 ITS2 序列的 DNA 条形码技术能很好地运用于中药鉴定领域^[23 24]。

在此研究背景下,本研究选用 ITS2 序列对高良姜原植物及其市面流通较多的混淆品进行鉴定研究,为高良姜种质资源规范化、中药材鉴定、遗传资源保护等方面提供分子水平依据。

一、材料与方法

1. 材 料

实验采集山姜属 9 个样本 6 个物种,全部经中国医学科学院药用植物研究所林余霖副研究员鉴定,凭证标本保存于中国医学科学院药用植物研究所(表 1)。其余 28 个样本 11 个物种来源于 Gen-Bank(表 2)。

2. DNA 提取和 PCR 扩增、PCR 产物纯化及序列测定

样品的 DNA 提取、PCR 扩增及测序的方法均参考前人的研究^[17]。

3. 数据分析

测序获得的峰图利用 CondonCode Aligner V3.7.1((CodonCode Co.,USA))校对拼接以获得可用于后续分析的 ITS2 序列。实验数据与 GenBank

表 2 GenBank 下载山姜属样本物种信息

拉丁学名	Genbank 登录号
<i>A. aquatica</i>	AF254458
<i>A. blepharocalyx</i>	AF478709
<i>A. blepharocalyx</i> var. <i>blepharocalyx</i>	AF192710
<i>A. blepharocalyx</i> var. <i>glabrior</i>	AF192712
<i>A. chinensis</i>	EU909426
<i>A. flabellata</i>	AY742349
<i>A. guangdongensis</i>	AY742352
<i>A. intermedia</i>	AB049288
	AF192722 ,AF254474 ,
<i>A. japonica</i>	AY742357 ,EU909427
<i>A. kusshakuensis</i>	FJ496770
	AF478718 ,EU909413-
<i>A. officinarum</i>	EU909425 ,GU097441

下载的 ITS2 序列共同采用基于隐马尔可夫模型的 HMMer 注释方法去除两端 5.8S 和 26S 区段获得 ITS2 间隔区序列^[26]。通过 MEGA4.1 软件对不同样本进行序列对比,计算高良姜的种内最大 K2P 距离和种间最小 K2P 距离,并重构其 N-J 系统发育树。基于 Schult 等^[26]的研究结论预测各物种 ITS2 茎环二级结构。

二、结果与分析

1. 测序峰图

上图为实验序列 GQ434443 的峰图,其序列长度为 231bp,其中 229 个碱基的 Q 值均大于等于 20,无 POLY 结构,GC 含量为 61.0%。

2. 高良姜不同样本种内序列比对

通过比对不同采集地 16 个高良姜样本的 ITS2 序列,序列对比后长度为 239bp,无 POLY 结构,GC 含量为 60.9%~61.8%,平均 GC 含量为 61.1%。

表 1 实验材料采集地及 GenBank 登录号

材料	拉丁学名	标本号	采集地	Genbank 登录号
高良姜	<i>Alpinia officinarum</i>	PS0519MT04	中国医学科学院药用植物研究所广西分所	GU180360
海南山姜	<i>A. hainanensis</i>	PS0511MT01	中国医学科学院药用植物研究所广西分所	GU180354
长柄山姜	<i>A. kwangsiensis</i>	PS0513MT01	中国医学科学院药用植物研究所广西分所	GU180355
红豆蔻	<i>A. galanga</i>	PS0515MT02	中国医学科学院药用植物研究所广西分所	GU180356
红豆蔻	<i>A. galanga</i>	PS0515MT03	中国医学科学院药用植物研究所广西分所	GU180357
红豆蔻	<i>A. galanga</i>	PS0515MT04	中国医学科学院药用植物研究所广西分所	GU180358
艳山姜	<i>A. zerumbet</i>	PS0532MT03	中国医学科学院药用植物研究所广西分所	GU180367
艳山姜	<i>A. zerumbet</i>	PS0532MT04	中国科学院华南植物园	GU180368
多花山姜	<i>A. polyantha</i>	PS0517MT01	中国医学科学院药用植物研究所广西分所	GU180373

<i>A. zerumbet</i> GU180367	 C T C C GGCT . ACC..... C T..... GT... .. T..... AC
<i>A. zerumbet</i> GU180368	 C T C C GGCT . ACC..... C T..... GT... .. T..... AC
<i>A. flabellata</i> AY742349	C..... TTC . T . C GGCT ... C..... C T . G... G... C ... T . G... AC
<i>A. blepharocalyx</i> var. <i>blepharocalyx</i> AF192710	 C T C .. A. C GGCT . ACC..... C T..... G... .. T..... AC
<i>A. blepharocalyx</i> var. <i>glabrior</i> AF192712	 C T C .. A. C GGCT . ACC..... C T..... G... .. T..... AC
<i>A. chinensis</i> EU909426	.. A... T . C C GGCT . ACC..... C T..... G... C . T . G... AC
<i>A. japonica</i> EU909427	.. A... T . C C GGCT . ACC..... C T..... G... C . T . G... AC
<i>A. japonica</i> AF192722	.. A... T . C C GGCT . ACC..... C T..... G... C . T . G... AC
<i>A. japonica</i> AF254474	.. A... T . C C GGCT . ACC..... C T..... G... C . T . G... AC
[	2222222222 2222222222 222]
[	0001111222 2222334455 555]
[	6793569024 5679145901 789]
<i>A. aquatica</i> AF254458	TTCTCGATTA AGCAAGACGG GGA
<i>A. blepharocalyx</i> AF478709	G . TA . . GC . G CATT . G . CA AA.
<i>A. galanga</i> GU180356	G . T . . AGC . G CAT . . . GTCA AT.
<i>A. galanga</i> GU180357	G . T . . AGC . G CAT . . . GTCA AT.
<i>A. galanga</i> GU180358	G . T . . AGC . G CAT . . . GTCA AT.
<i>A. guangdongensis</i> AY742352	G . TA . . GCCG GAT . . . G . CA AA.
<i>A. hainanensis</i> GU180354	G . TA . . GC . G CAT . . . G . CA AA.
<i>A. intermedia</i> AB049288	G . T . . GC . G CAT . . . G . CA AA.
<i>A. japonica</i> AY742357	G . T . . GC . G CAT . . . G . CA AA.
<i>A. kusshakuensis</i> FJ496770	G . TA . . GC . G CAT . . . G . CA AA.
<i>A. kwangsiensis</i> GU180355	G . TA . . GC . G CATT . . G . CA AA.
<i>A. officinarum</i> AF478718	G . T . . GC . G CAT . . . G . CA A .
<i>A. officinarum</i> EU909413	G . T . . GC . G CAT . . . G . CA A .
<i>A. officinarum</i> EU909414	G . T . . GC . G CAT . . . G . CA A .
<i>A. officinarum</i> EU909415	G . T . . GC . G CAT . . . G . CA A .
<i>A. officinarum</i> EU909416	G . T . . GC . G CAT . . . G . CA A .
<i>A. officinarum</i> EU909417	G . T . . GC . G CAT . . . G . CA A .
<i>A. officinarum</i> EU909418	G . T . . GC . G CAT . . . G . CA A .
<i>A. officinarum</i> EU909419	G . T . . GC . G CAT . . . G . CA A .
<i>A. officinarum</i> EU909420	G . T . . GC . G CAT . . . G . CA A .
<i>A. officinarum</i> EU909421	G . T . . GC . G CAT . . . G . CA A .
<i>A. officinarum</i> EU909422	G . T . . GC . G CAT . . . G . CA A .
<i>A. officinarum</i> EU909423	G . T . . GC . G CAT . . . G . CA A .
<i>A. officinarum</i> EU909424	G . T . . GC . G CAT . . . G . CA A .
<i>A. officinarum</i> EU909425	G . T . . GC . G CAT . . . G . CA A .
<i>A. officinarum</i> GU097441	G . T . . GC . G CAT . . . G . CA A .
<i>A. officinarum</i> GU180360	G . T . . GC . G CAT . . . G . CA A .
<i>A. polyantha</i> GU180373	GCT . T . GCCG G . . . AG . CA AAC
<i>A. zerumbet</i> GU180367	G . TA . . GC . G CAT . . . G . CA AA.
<i>A. zerumbet</i> GU180368	G . TA . . GC . G CAT . . . G . CA AA.
<i>A. flabellata</i> AY742349	G GCC . T . T . . G . CA A .
<i>A. blepharocalyx</i> var. <i>blepharocalyx</i> AF192710	G . TA . . GC . G CATT . . G . CA AA.
<i>A. blepharocalyx</i> var. <i>glabrior</i> AF192712	G . TA . . GC . G CATT . . G . CA AA.
<i>A. chinensis</i> EU909426	G . T . . GC . G CAT . . . G . CA AA.
<i>A. japonica</i> EU909427	G . T . . GC . G CAT . . . G . CA AA.
<i>A. japonica</i> AF192722	G . T . . GC . G CAT . . . G . CA AA.
<i>A. japonica</i> AF254474	G . T . . GC . G CAT . . . G . CA AA.

图2 高良姜不同基源与易混淆品的种间比对

其含量分别为 56.5% (GU180357 和 GU180358)、56.9% (GU180359), 多花山姜 (*A. polyantha*) GC 含量最高为 63.6%; 高良姜及其同属易混伪品的种间平均 K2P 距离为 0.0742, 最小 K2P 距离为 0.0469。

4. ITS2 茎环二级结构比对

如图 3 所示, 高良姜与其 3 个混淆品种在二级结构上有明显差异。重点差异存在于螺旋 I 和螺旋 IV 中。高良姜二级结构螺旋 I 存在 7 个大小相当的茎环, 而其伪品华山姜二级结构螺旋 I 的茎环数目为 6 个, 红豆蔻二级结构螺旋 I 的茎环数目为 6 个且靠近基部的 1 个茎环明显大于其他茎环, 山姜二级结构螺旋 I 的茎环数目为 5 个。另外高良姜与其 3 个混淆品种在螺旋 I、III 间的翻转角度也存在明显差异。因此, ITS2 二级结构也可作为鉴定高良姜及混淆品种的一个方法。

5. 高良姜及其主要混淆品的鉴定

从高良姜与其混淆品的 NJ 树中可以看出高良姜的 16 个样本在支持率为 99 的情况下, 单独聚为一支, 与混淆品华山姜 (*A. chinensis*)、山姜 (*A. japonica*)、红豆蔻 (*A. galanga*) 等混淆品及同属其他物种明显区分开 (见图 4)。重构的 NJ 树中还显示华山姜 (*A. chinensis*) 与山姜 (*A. japonica*) 亲缘关系最近, 高良姜与山姜和华山姜等 3 个种的亲缘关系比较近, 而红豆蔻 (*A. galanga*) 与上述 3 个种的亲缘关系较远。但在形态学分类中, 高良姜和山姜亲缘关系较近, 都属于良姜亚属, 华山姜和红豆蔻亲缘关系较

近, 均属于山姜亚属, 关于此次 DNA 数据的分类结果与形态学的分类结果不完全一致的问题还有待进一步讨论。

三、讨 论

高良姜 (*A. officinarum*) 为我国的“十大南药”之一, 其在医药、食品和化妆品加工以及蔬果保鲜上有广泛的应用。作为其开发应用的基础——高良姜基源植物的鉴定研究工作也一直受到业内人士的高度关注。随着分子生物学技术的快速发展, 各种 DNA 分子标记技术也被逐渐应用于高良姜鉴定研究工作^[13, 15]。

本实验通过对高良姜核基因序列进行研究, 结果显示, ITS2 序列在高良姜基源植物鉴定方面具有以下特点: ① ITS2 序列两端的 5.8S 和 26S 序列较为保守, 能用于通用引物的设计, 而此次研究中实验采集样本全部扩增出 ITS2 序列, 也说明此对引物适宜高良姜乃至整个山姜属物种的扩增; ②高良姜 ITS2 序列较短, 约为 240bp, 降低了提取、扩增和测序的难度, 此特性也将有利于从已降解的样本中获得该序列, 对于 DNA 条形码技术在中药材应用具有重要的意义; ③通过对高良姜及其混淆数据的分析, 发现不同采集地的 17 样本 ITS2 序列种内最大 K2P 距离 (0.0171) 小于种间最小距离为 (0.0469)。同时, 从基于 ITS2 序列构建的高良姜及其混淆品 NJ 树可以看出, 高良姜 16 个样品聚为一支, 支持率为

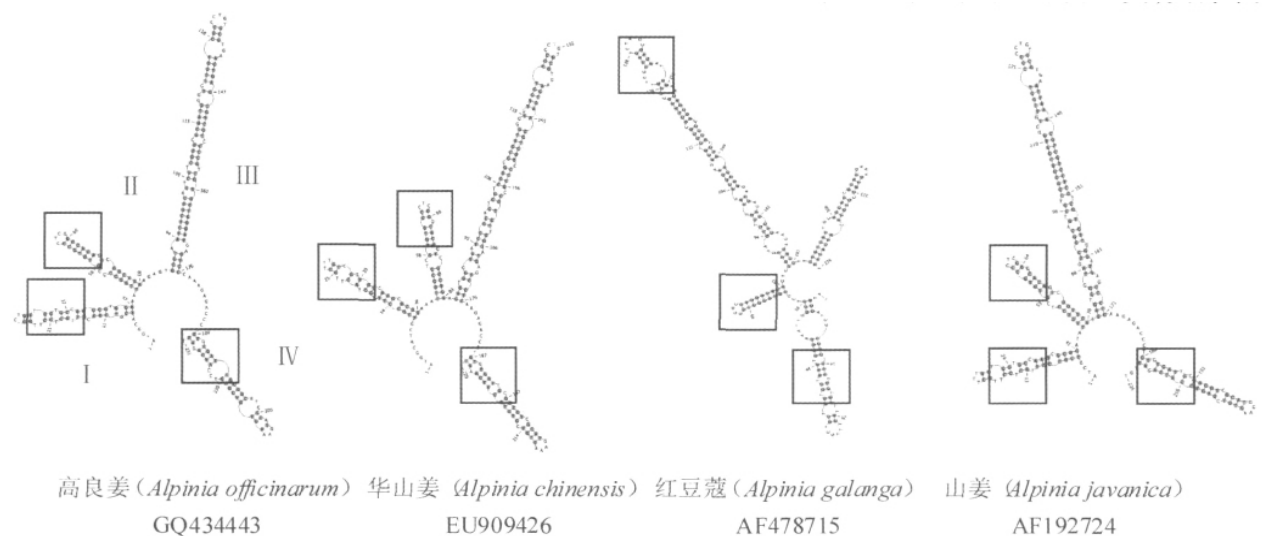


图3 高良姜及其3种易混伪品种的 ITS2 二级结构

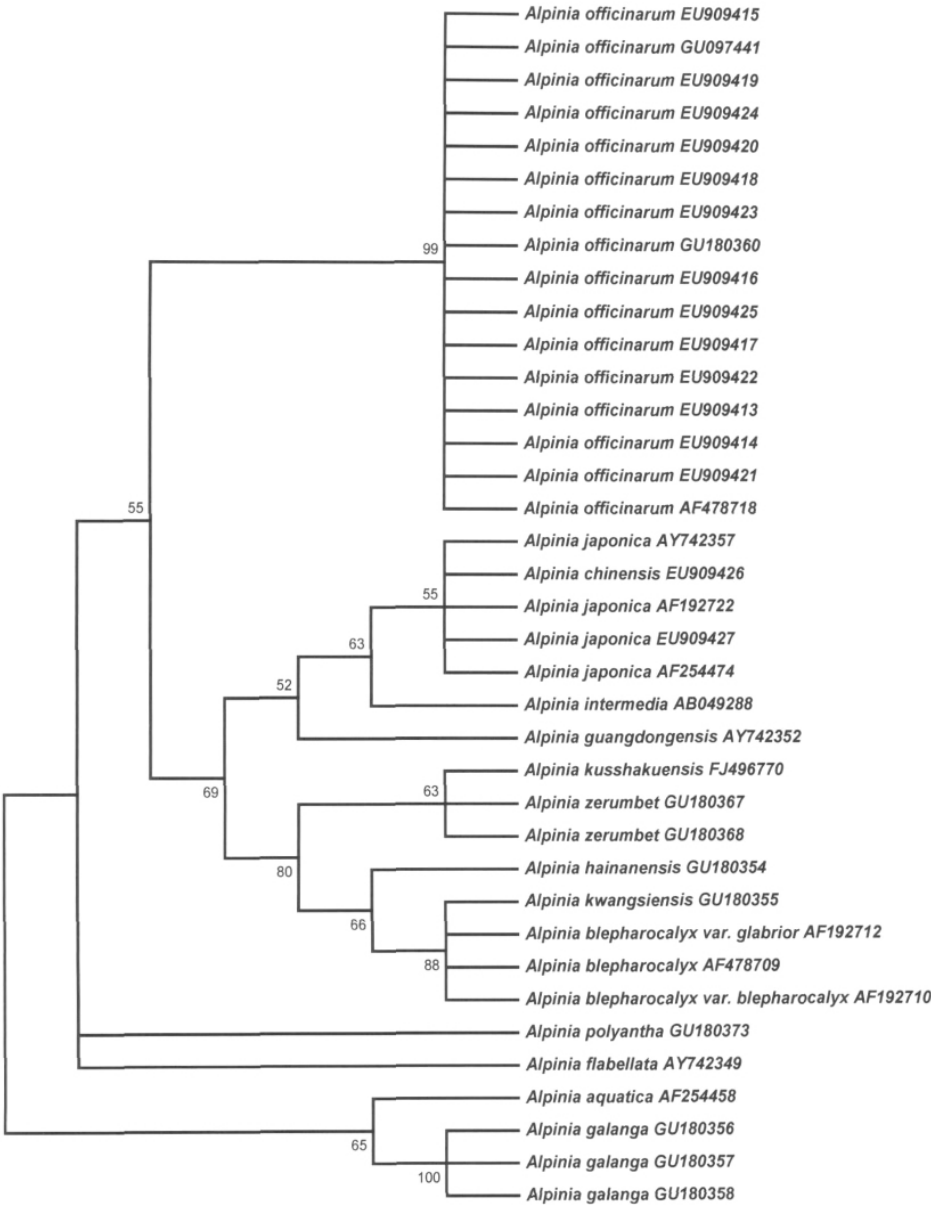


图4 基于 ITS2 序列构建的高良姜及其混伪品的邻接(NJ)树

注: bootstrap 1000 次重复 枝上数值仅显示自展支持率 $\geq 50\%$ 采用 K2P 距离法。

95% ,明显与同属其他物种分开。说明通过 ITS2 序列能很好地区分高良姜及其混淆品;③高良姜及其混淆品的 ITS2 二级结构,都存在 4 个螺旋区域,各螺旋上的茎环,以及彼此间的夹角存在明显的不同,也说明 ITS2 二级结构有助于更直观的鉴定物种。以上结论能很好地说明 ITS2 序列能够用于鉴定高良姜及其混淆品。

尽管 DNA 条形码在整个植物界的通用序列还

没有最终确定,但 ITS2 序列已经在药用植物领域得到广泛应用,本实验的研究结果为高良姜及其混伪品的物种鉴定提供新的思路,进一步开拓高良姜的应用前景打下基础。

参考文献

1 赵志礼,王峰涛,董辉,等. 山姜属药用植物及生药学研究进展. 中草药,2001,32(2): 171~173.

2 胡佳惠,闫明. 高良姜的研究进展. 时珍国医国药,2009,20(10):2544~2546.

3 李彩君,陈佃,何瑞. 高良姜化学成分研究. 时珍国医国药,2000,11(4):368.

4 卜宪章,肖桂武,古练权,等. 高良姜化学成分研究. 中药材,2000,23(2):84.

5 罗辉,蔡春,张建和,等. 不同产地高良姜挥发油化学成分的比较. 时珍国医研究,1998,9(1):29.

6 罗辉,蔡春,刘江琴,等. 高良姜鲜品和干品挥发油化学成分的比较. 中国现代应用药学,1998,15(1):16.

7 林敬明,刘双秀,贺巍,等. 高良姜超临界 CO₂ 萃取物 GC-MS 分析. 中药材,2000,23(10):613.

8 刘莉华,宛晓春,李大祥. 黄酮类化合物抗氧化活性构效关系的研究进展. 安徽农业学报,2002,29(3):265~270.

9 沈琦,李文姬,徐莲英. 高良姜等中药对 5-氟脲嘧啶的促渗作用. 中药材,2000,23(11):697~699.

10 吴清和,荣向路,黄萍,等. 高良姜素的药效学研究. 中药材,2000,23(11):699.

11 詹若挺,黄海波,潘超美,等. 高良姜种植基地不同栽培类型的品种调查和形态比较研究. 现代中药研究与实践,2007,21(2):3~6.

12 刘心纯,符红,黄海波,等. 高良姜与混淆品的鉴别研究. 广州中

- 医药大学学报,1999,16(3):232~234.
- 13 庞启华,严萍,赵树进.高良姜及其混淆品 rDNA ITS 序列的分析与鉴别.华南理工大学学报,2009,37(6):63~68.
 - 14 周子静,周晓东,廖月葵,等.高良姜及其三种混淆品的生药鉴定.中药材,1990,13(7):20~23.
 - 15 庞启华,严萍,赵翔.基于 *matK* 基因序列的高良姜及其混淆品的鉴定.陕西科技大学学报(自然科学版),2008,26(4):11~15.
 - 16 Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, et al. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 2003a, 270: 313~321.
 - 17 Chen SL, Yao H, Han JP, et al. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PLoS ONE*, 2010, 5(1):e8613.
 - 18 罗焜,陈士林,陈科力,等.基于芸香科的植物通用 DNA 条形码研究.中国科学,2010,30(4):342~351.
 - 19 Pang XH, Song JY, Zhu YJ, et al. Applying plant DNA barcodes for Rosaceae species identification. *Cladistics*, 2010, DOI: 10.1111/j.1096-0031.2010.00328.x.
 - 20 Gao T, Yao H, Song JY, et al. Identification of medicinal plants in the family Fabaceae using a potential DNA Barcode ITS2. *J Ethnopharmacol*, 2010, 130(1):116~21.
 - 21 朱英杰,陈士林,宋经元,等.重楼属药用植物 DNA 条形码鉴定研究.药学报,2010,45(3):376~382.
 - 23 Yao H, Song JY, Liu C, et al. Use of ITS2 Region as the Universal DNA Barcode for Plants and Animals. *PLoS ONE*, 2010, 5(10):e13102.
 - 24 陈士林,宋经元,姚辉,等.药用植物 DNA 条形码鉴定策略及关键技术分析.中国天然药物,2009,4(5):322~327.
 - 25 陈士林,姚辉,宋经元,等.基于 DNA barcoding(条形码)技术的中药材鉴定.世界科学技术-中医药现代化,2007,9(3):7~12.
 - 26 Schultz J, Müller T, Achtziger M, et al. The internal transcribed spacer 2 database—a web server for (not only) low level phylogenetic analyses. *Nucleic Acids Res.* 2006, 34(Suppl.):W704~707.

Molecular Identification of *Alpinia Officinarum* and Its Adulterants

Luo Kun¹, Chen Keli², Liu Yimei², Yao Hui¹, Han Jianping¹, Ma Pei¹, Sun Chao¹

(1. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Beijing 100193, China;

2. Pharmacy College, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430061, China)

Abstract: This study aimed to discriminate *Alpinia officinarum* and its adulterants using ITS2 sequence. DNA samples were extracted from *Alpinia* specimens. The ITS2 sequence was amplified by PCR and sequenced bidirectionally. Sequences were assembled by CodonCode Aligner. The intra-specific and inter-specific K2P distances of *Alpinia officinarum* and its adulterants were calculated. And the N-J tree was constructed by MEGA V 4.1. The ITS2 secondary structure was predicted. The results showed that the maximum intra-specific K2P distance was 0.0171, while the minimum inter-specific K2P distance was 0.0469. Different samples of *Alpinia officinarum* were clustered. And the N-J tree was able to distinguish *Alpinia officinarum* from its adulterants. The *Alpinia officinarum* was obviously differentiated from its adulterants by the ITS2 secondary structure. It was concluded that ITS2 sequence was able to identify *Alpinia officinarum* and its adulterants. It was an efficient molecular identification method for *Alpinia officinarum* and its adulterants.

Keywords: *Alpinia officinarum*, ITS2 sequence, molecular identification

(责任编辑:李沙沙 张志华,责任译审:王 晶)