

基于 ITS2 条形码的中药材赤芍及其易混伪品的 DNA 分子鉴定^{*}

□孙稚颖 (中国医学科学院 药用植物研究所 北京 100193)
(北京协和医学院
(山东中医药大学药学院 济南 250355))

宋经元 姚 辉 孙 超^{**} 陈士林^{**}

(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:对中药材赤芍及其易混伪品进行分子鉴定,以确保该药材的质量以及临床疗效。方法:以核基因 ITS2 片段作为 DNA 条形码,对研究材料进行 PCR 扩增并双向测序,所得序列经 CodonCode Aligner 拼接后,用软件 MEGA4.0 进行相关数据分析,并构建 NJ(邻接)树。利用 Koetschan 等建立的 ITS2 数据库及其网站预测 ITS2 二级结构。结果:赤芍两基源植物 ITS2 序列长度均为 227bp;由所构建的系统聚类树图可以看出,无论芍药还是川赤芍,它们的不同来源样本均分别聚在一起,表现出单系性;比较赤芍及其易混伪品的二级结构发现,赤芍的正品来源芍药与川赤芍彼此间差异甚微,而与其它物种在螺旋区茎环的数目、大小、位置以及螺旋臂由中心环伸出时的转角等方面具有较明显区别。结论:ITS2 作为 DNA 条形码序列能够有效的区别中药材赤芍基源植物与其易混伪品,在中药材的鉴定中具有重要的应用前景。

关键词:赤芍 DNA 条形码 ITS2 鉴定

doi: 10.3969/j.issn.1674-3849.2011.02.036

赤芍 *Paeoniae Radix Rubra* 为我国常用中药材,具有清热凉血 散瘀止痛的功效。据中国药典 2010

年版一部记载其来源为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 或川赤芍 *Paeonia veitchii* Lynch 的干燥根^[1],由于该药材多源于野生,因而常出现供不应求的局面,因此在我国不同地区利用其同属植物作

收稿日期:2011-02-16

修回日期:2011-03-02

* 卫生部卫生行业科研专项(200802043):药用植物 DNA barcoding(条形码)鉴定研究,负责人:陈士林。

** 通讯作者:孙超,副研究员,博士,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;陈士林,本刊学术副主编和编委,教授,博士,中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所所长,主要研究方向:中药资源学,Tel:010-62899700,E-mail:slchen@implad.ac.cn。

为赤芍药用的情况较为普遍,如分布极为广泛的草芍药 *P. obovata* Maxim. 其根作赤芍药用,药材主产于吉林、黑龙江;美丽芍药 *P. mairei* H. Léveillé 其根作赤芍药用,药材主产四川;多花芍药,产西藏,当地作赤芍药用;新疆芍药 *Paeonia anomala* L.、块根芍药 *Paeonia intermedia* C. A. Mey. 均分布在新疆,并在当地作赤芍药用^[2]。为了更好地规范赤芍的正品来源,确保药材的质量以及临床用药的有效性,有必要对赤芍正品来源与其各地混用品种进行鉴别研究。

DNA 条形码是近年来生物分类和鉴定的研究热点和方向,该技术是利用基因组中一段公认的标准、相对较短的 DNA 片段来对物种进行准确鉴定^[3,4]。DNA 条形码技术简便高效,不受样品的形态性状以及研究者的专业水平限制,尤其适用于来源于生物体部分组织或器官的中药材的真伪鉴定^[5]。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 片段以其特有的优势被大家广泛关注^[6-13],ITS2 是真核生物 rDNA 上的一段顺反子,位于 5.8S 和 28SrRNA 之间,由于该序列具有适合扩增和测序的长度,有利于对发生降解的样品进行扩增^[14],同时 ITS2 片段在物种水平的变异较快,有更多的突变位点以区分不同的物种,因此,在中药材的物种鉴定方面具有潜在的研究价值。本研究即是利用 ITS2 序列对赤芍原植物及其同属多种近缘混伪品进行 DNA 条形码鉴别研究,为该药材的准确鉴定提供分子证据。

一、材料与方法

1. 材料、试剂及仪器

(1) 材料。

材料来源见表 1,包括实验样品及来自 GenBank 所下载序列,实验样品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。

(2) 试剂。

植物 DNA 提取试剂盒购自北京天根生物技术有限公司 (Tiangen Biotech Co., China); MgCl₂、dNTP、PCR buffer (10×)、DNA 聚合酶均购自北京博彩生物科技有限公司 (Biocolor BioScience &

Technology Co., China); 引物由上海生工 (Sangon Co., China) 合成。

(3) 仪器。

DNA 提取研磨仪 (Retsch MM400, Germany); PCR 仪 (PTC0200, BIO-RAD 公司); ABI 3730XL 测序仪 (Applied Biosystems Co., USA)。

2. 方法

(1) DNA 提取。

样品根使用 70% 乙醇擦洗表面后研磨,无水乙醇浸泡 5min 脱水,植物叶片采用硅胶进行干燥,取样约 10mg,用 DNA 提取研磨仪研磨 1min (30 次/s) 后,利用植物 DNA 提取试剂盒提取总 DNA。

(2) PCR 扩增及测序。

扩增引物正向为 5'-GCGATACTTGGTGTGAAT-3',反向为 5'-GACGCTTCTCCAGACTACAAT-3'。PCR 反应体积为 25μL,体系内含 MgCl₂ 2μL (25mM)、dNTP 2μL (2.5mM)、PCR buffer 2.5μL (10×)、引物各 1.0μL (2.5μM)、聚合酶 1.0U、总 DNA 约 1μL (~30ng)。扩增程序为 94℃,5min; 94℃ 30s,56℃ 30s,72℃ 45s,40cycles; 72℃ 10min。PCR 扩增产物经纯化后,使用 ABI 3730XL 测序仪

表 1 材料来源

材料	拉丁学名	标本号	Genbank 登录号
芍药 ^a	<i>Paeonia lactiflora</i>	PS0905MT01	GQ434600
芍药 ^b	<i>P. lactiflora</i>	PS0905MT03	GQ434601
芍药	<i>P. lactiflora</i>	—	EU591986
川赤芍 ^c	<i>P. veitchii</i>	PS0906MT01	GQ434602
川赤芍 ^d	<i>P. veitchii</i>	PS0906MT02	GQ434603
川赤芍	<i>P. veitchii</i>	—	DQ313691
川赤芍	<i>P. veitchii</i>	—	U27695
新疆芍药	<i>P. anomala</i>	—	DQ313696
新疆芍药	<i>P. sinjiangensis</i>	—	U27697
草芍药	<i>P. obovata</i>	—	U27688
美丽芍药	<i>P. mairei</i>	—	U27685
块根芍药	<i>P. intermedia</i>	—	DQ313697
多花芍药	<i>P. emodi</i>	—	U27680
白花芍药	<i>P. emodi</i> ssp. <i>sterniana</i>	—	U27693
黄牡丹	<i>P. lutea</i>	—	AY328312
黄牡丹	<i>P. lutea</i>	—	U27683

注: a. 样品为药材根,购自四川成都荷花池药材市场; b. 样品为新鲜叶片硅胶干燥保存,采自中国医学科学院药用植物研究所药用植物园; c, d. 样品均取自腊叶标本干燥叶,采集地为四川汶川,采集号分别为 TK673,TK777。

双向测序。

(3) 数据处理。

测序峰图利用 CodonCode Aligner V 2. 06 (CodonCode Co. ,USA) 校对拼接,去除引物区。对于网上所获得的 ITS 序列,使用基于隐马尔可夫模型的 HMMer 注释方法去除两端 5. 8S 和 28S 区段获得 ITS2 间隔区序列^[15]。然后,将所有序列用软件 MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) 4. 0 分析比对并进行遗传距离等分析,用 NJ (邻接) 法对比对的序列构建系统聚类树。利用 Bootstrap (1000 次重复) 检验各分支的支持率。根据 Koetschan 等^[16]建立的 ITS2 数据库及其网站预测 ITS2 二级结构。

二、结果与分析

1. 序列比较

赤芍两基源植物芍药和川赤芍,序列长度均为 227bp,具有一个 PolyC 结构,G/C 含量分别为 56. 8% 和 56. 9%,根据 Kimura-2 参数遗传距离模型计算得到的序列间遗传距离,与芍药遗传距离最远的为黄牡丹 (*P. lutea*),距离值为 0. 041,距离最近的为块根芍药 (*P. intermedia*),距离值为 0. 009;与川赤芍距离最远的为黄牡丹 (*P. lutea*),距离值为 0. 037,距离最近的为新疆芍药 (*P. anomala*),距离值为 0. 005

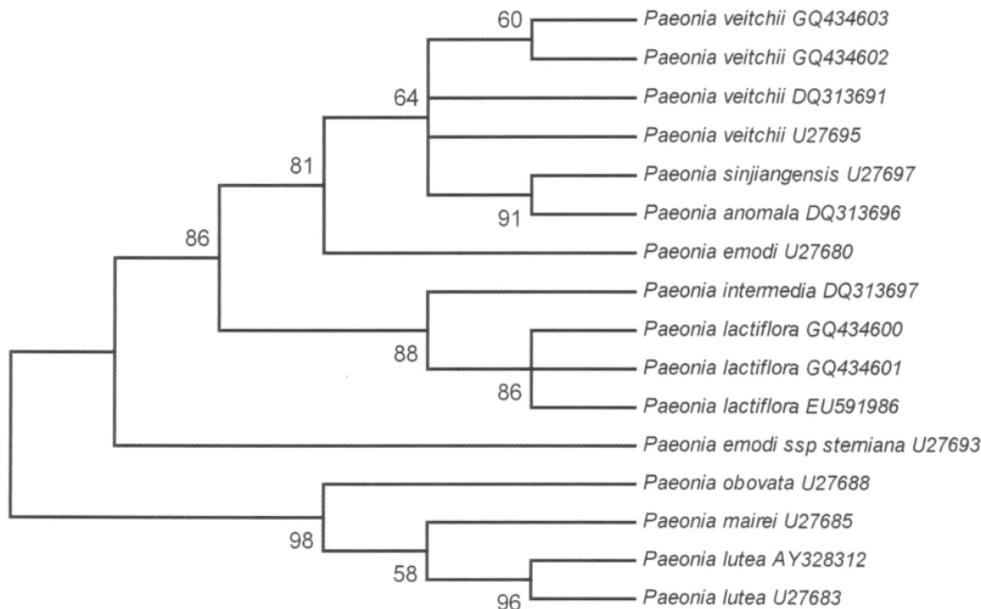


图 1 基于 ITS2 序列构建的赤芍及其混伪品的邻接 (NJ) 树

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

2. 聚类分析

基于 ITS2 序列,通过邻接法 (NJ) 所构建的系统聚类树图 (图 1) 可以看出,无论芍药还是川赤芍,它们的不同样本均分别聚在一枝,表现出单系性,与其它同属易混伪品能够很明显区分开。此外,芍药 3 个不同来源样本最先相聚后,又与块根芍药聚在一起,而川赤芍 4 个不同来源样本最早与新疆芍药聚成一枝。草芍药、美丽芍药以及黄牡丹彼此聚成一枝。

3. 赤芍及其主要易混伪品 ITS2 序列二级结构

从赤芍基源植物与其主要易混伪品二级结构比较可以看出 (图 2),主要差异位于螺旋 (Helix) I 区和 III 区,表现在茎环 (Loop) 的数目、大小、位置以及螺旋臂由中心环伸出时的转角,不同物种间有或多或少的区别,见图中方框所示,但赤芍的正品来源芍药与川赤芍彼此间差异甚微,仅在螺旋 I 区顶端的两个茎环有微弱差别。通过 ITS2 二级结构比较,可以将赤芍与其易混伪品区别开来。

三、讨论

赤芍为我国传统的活血化瘀类中药,《常用中药材品种整理和质量研究》一书中指出^[17],其同属植物草芍药、美丽芍药、新疆芍药、黄牡丹等在不同地区被作为赤芍药用。由于赤芍的混伪品来自同属近缘植物,采用传统的药材鉴定方法通常会比较困难。而本研究发现,ITS2 作为 DNA 条形码序列,可以有效便捷的鉴别赤芍基源植物与其易混伪品。川赤芍在中国植物志英文版 (Flora of China) 中^[18],被降为新疆芍药的一个亚种,我们的实验结果也证实二者确实具有较近的亲缘关系;此外,在我们的聚类树图中,材料 *Paeonia sinjiangensis* (U27697) 与新疆芍药 *P. anomala* (DQ313696) 最先相聚,表明关系很近,经文献^[18, 19]考证后得

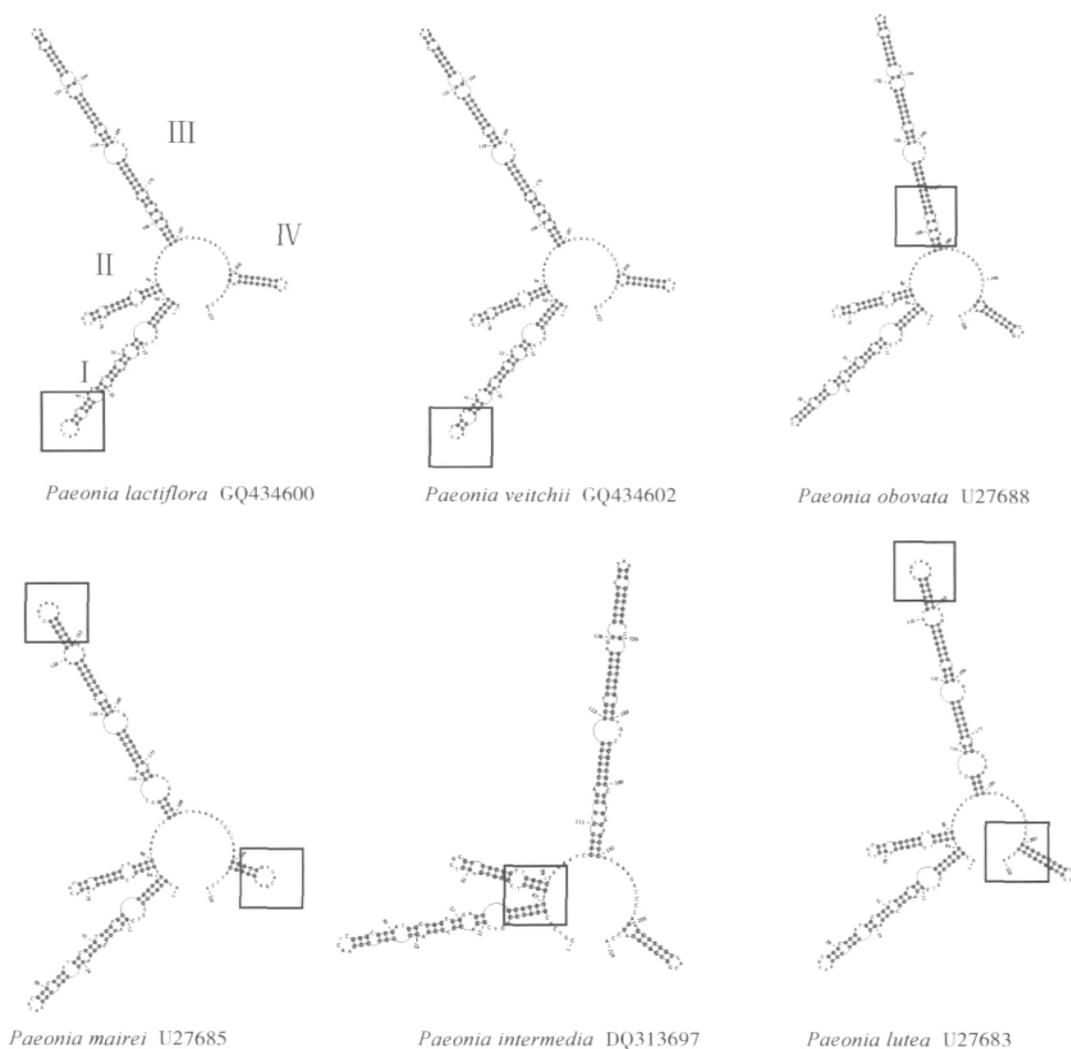


图2 赤芍及其混伪品的 ITS2 二级结构比较

知,前者拉丁名是后者的异名,均为新疆芍药,所以本研究结果恰好也验证了前人的分类观点;白花芍药 *P. emodi* ssp. *sterniana* 曾作为多花芍药的亚种,中国植物志英文版现已将其作为一独立物种,定名为 *Paeonia sterniana* H. R. Fletcher。本研究中发现,二者确实相隔较远,因而支持这一分类处理。

新疆芍药与块根芍药均分布在新疆,野生资源量丰富,在当地被作为新疆赤芍药用^[20],田树革等^[21]从赤芍的有效成分芍药苷的含量上考察得出,新疆芍药与块根芍药都可达到中国药典的要求。本研究无论是从遗传距离比较还是从聚类分析来看,块根芍药与芍药,新疆芍药与川赤芍都具有较近的关系,从而为新疆芍药与块根芍药在赤芍正品野生

资源紧缺的情况下,可以作为赤芍代替品提供了重要的分子证据。

综上所述,ITS2 作为 DNA 条形码序列不仅能够较好的区别中药材赤芍基源植物与其易混伪品,同时,对于探讨芍药属不同物种间的分类学关系以及赤芍药材资源的合理开发利用亦具有重要的参考价值。

参考文献

- 1 国家药典委员会. 中国药典(一部). 北京: 化学工业出版社, 2010:147.
- 2 方前波. 中国芍药属芍药组的分类、分布与药用. 现代中药研究与实践 2004, 18 (3): 28~30.
- 3 Schindel DE, Miller SE. DNA barcoding, a useful tool for taxonomists. *Nature* 2005, 435:17.

- 4 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* 2009,7(5):322~327.
- 5 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.
- 6 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.
- 7 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:生命科学* 2010,40(4):342~351.
- 8 朱英杰,陈士林,姚辉,等.重楼属药用植物 DNA 条形码鉴定研究. *药学报* 2010,45(3):376~382.
- 9 Gao Ting, Yao Hui, Song Jingyuan, et al. Identification of medicinal plants in the family Fabaceae using a potential DNA barcode ITS2. *Journal of Ethnopharmacology* 2010,130:116~121.
- 10 Pang XH, Song JY, Zhu YJ, et al. Applying plant DNA barcodes for *Rosaceae* species identification. *Cladistics* 2010,26:1~6.
- 11 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.
- 12 Gao T, Yao H, Song JY, et al. Evaluating the Feasibility of Using Candidate DNA Barcodes in Discriminating Species of the Large Asteraceae Family. *BMC Evolutionary Biology* 2010,10:324.
- 13 Pang XH, Song JY, Zhu YJ, et al. Using DNA barcoding to identify species within Euphorbiaceae. *Planta Medica*, 2010,76:1784~1786.
- 14 Kress WJ, Wurdack KJ, Zimmer EA, et al. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005,102:8369~8374.
- 15 Keller A, Schleicher T, Schultz J, et al. 5S-28S rRNA interaction and HMM-based ITS2 annotation. *Gene* 2009,430:50~57.
- 16 Koetschan C, Förster F, Keller A, et al. The ITS2 Database III—sequences and structures for phylogeny. *Nucleic Acids Research* 2010,38:D275~D279.
- 17 徐国钧,徐璐珊.常用中药材品种整理和质量研究(南方协作组)第三册.福州:福建科学技术出版社,1997:109~146.
- 18 Hong Deyuan, Pan Kaiyu, Turland NJ. Flora of China. Beijing: Science Press; St. Louis: the Missouri Botanical Garden Press 2001,6:127~132.
- 19 Hong DY, Pan KY. A taxonomic revision of the *Paeonia anomala* complex (Paeoniaceae). *Ann Missouri Bot Gard*, 2004,91(1):87~98.
- 20 中国科学院新疆生物土壤研究所编.新疆药用植物志.第三册.乌鲁木齐:新疆人民出版社,1984:14~15.
- 21 田树革,刘庆.新疆芍药色谱图谱分析及芍药苷的含量测定. *中国民族医药杂志* 2003,10(4):32~33.

Molecular Identification of *Paeoniae Radix Rubra* and Its Adulterants based on ITS2 DNA Barcode

Sun Zhiying^{1,2}, Song Jingyuan¹, Yao Hui¹, Sun Chao¹, Chen Shilin¹

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

2. College of Chinese Medicine, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China)

Abstract: This study aimed to discriminate between *Paeoniae Radix Rubra* and its adulterants in order to guarantee the quality and clinical curative effect of this medical material. In this study, the second internal transcribed spacer (ITS2) of ribosomal DNA were amplified and sequenced. Sequence assembly and consensus sequence generation were performed by using the CodonCode Aligner. To perform a phylogenetic study, sequences of DNA regions were aligned using Clustal W and the genetic distances were computed using MEGA 4.0 in accordance with the Kimura 2-parameter (K2P) model. And the phylogenetic tree was constructed using the neighbor-joining and Kimura 2-parameter methods. The ITS2 secondary structure was predicted using the ITS2 database and website which was found by Koetschan et al. The results showed that the length of ITS2 sequence of the origin plant of *Paeoniae Radix Rubra* were both 227 bp. In the cluster dendrogram, both *Paeonia lactiflora* and *P. veitchii* showed monophyletic. To compare the ITS2 secondary structure of the origin plants of *Paeoniae Radix Rubra* and its adulterants, we noticed that the difference of *Paeonia lactiflora* and *P. veitchii* was slight. But they were obviously distinguished from other species in the amount, size, position of loop and the angle of helix exertion. It is concluded that ITS2 can be used to correctly identify *Paeoniae Radix Rubra* from its adulterants. Hence, the application of ITS2 in the identification of traditional Chinese medicine has an important prospect.

Keywords: *Paeoniae Radix Rubra*, DNA barcoding, ITS2, identification

(责任编辑:李沙沙 张志华 责任译审:王 晶)