

# 基于 DNA 条形码的藤类药材鉴定\*

□孙稚颖 张永清\*\*

(山东中医药大学药学院 济南 250355)

**摘要:**目的:对《中国药典》中记载的 14 种藤类药材进行分子鉴定。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。结果:14 种藤类药材的 ITS2 序列长度为 190~284 bp;各药材种内 K2P 遗传距离为 0~0.053,远远小于种间 K2P 遗传距离(平均值为 0.852,最小值为 0.309);由所构建的系统聚类树图可以看出,本研究中具有不同产地来源样品的药材均表现出了单系性,同时又与其它药材明显分开。结论:ITS2 序列作为条形码适用于鉴定《中国药典》中藤类药材,在中药材的鉴定领域具有重要的应用前景。

**关键词:**藤类药材 DNA 条形码 ITS2 分子鉴定

doi: 10.3969/j.issn.1674-3849.2012.05.012

藤类药材通常是指以藤本植物的藤茎入药的药材。据 2010 版《中国药典》记载<sup>[1]</sup>,此藤类药材约有 14 种,多为临床常用药,如大血藤、鸡血藤、川木通、木通、青风藤、海风藤、钩藤等均具有重要的药用价值。藤类药材虽然品种不多,往往也有混淆现象,或因辨识不清、鉴别不当而混用,或因货源紧张而以它物冒充,特别是随着中药材价格的不断攀升,这种混乱现象愈发严重。对于藤类药材的鉴定目前可见报道的多为传统鉴定方法,包括性状鉴别和显微鉴别<sup>[2-4]</sup>,对研究者和使用者的专业水平要求较高。为规范藤类药材商品流通,确保藤类药材质量的稳定可靠以及临床用药的安全有效,有必要探讨一种新的便捷有效的方法对藤类药材进行鉴别

研究。

DNA 条形码技术是利用基因组中一段通用的标准短序列来进行物种鉴定的分子诊断新技术,是近年来生物分类和鉴定的研究热点和方向<sup>[5]</sup>。该技术简便高效,不受样品的形态性状以及研究者的专业水平限制,具有独一无二的可重复性,能真实的反映中药材的本来面貌,适用于源自生物体部分组织或器官的中药材的真伪鉴定<sup>[6]</sup>。近来,ITS2 已被提出作为药用植物鉴定的标准条形码序列<sup>[7-14]</sup>。该序列片段一般较短,有利于对发生降解的样品进行扩增<sup>[15]</sup>,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。本研究利用 ITS2 片段作为 DNA 条形码对药典中 14 种藤类药材进行了比较研究,旨在该类药材的质量控制及临床安全用药提供分子鉴定依据。

收稿日期:2012-03-26

修回日期:2012-10-19

\* 国家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;科学技术部国家科技支撑计划(2011BAI06B01)金银花规范化种植基地优化升级及系列产品综合开发研究,负责人:张永清;山东省科技厅科技发展计划(2008GG2NS02022):山东道地药材资源质量控制科技平台建设,负责人:张永清。

\*\* 通讯作者:张永清,教授,博士,主要研究方向:药用植物栽培与中药资源 E-mail: zyq622003@126.com。

## 一、材料与方法

## 1. 材料

材料来源包括实验样品及来自 GenBank 所下

载序列,共 14 种藤类药材的 47 个样品(见表 1)。实验材料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 材料来源

药材	植物名	拉丁学名	采集地	标本号	GenBank No.
大血藤	大血藤	<i>Sargentodoxa cuneata</i>	—	—	AY029794
大血藤	大血藤	<i>S. cuneata</i>	—	—	EF076046
大血藤	大血藤	<i>S. cuneata</i>	—	—	EF076048
鸡血藤	密花豆	<i>Spatholobus suberectus</i>	中国医学科学院药用植物研究所广西分所	PS0246MT02	GU217620
滇鸡血藤	南五味子	<i>Kadsura longipedunculata</i>	—	—	AF263448
滇鸡血藤	南五味子	<i>K. longipedunculata</i>	—	—	AF163711
川木通	小木通	<i>Clematis armandii</i>	—	—	GU732578
川木通	小木通	<i>C. armandii</i>	—	—	FJ572047
川木通	绣球藤	<i>C. montana</i>	四川汶川	PS0955MT01	GQ434613
川木通	绣球藤	<i>C. montana</i>	—	—	GU73261
川木通	绣球藤	<i>C. montana</i>	—	—	FJ424227
木通	木通	<i>Akebia quinata</i>	四川大学华西药学院药用植物园	PS0958MT01	GQ434614
木通	木通	<i>A. quinata</i>	—	—	AY029791
木通	木通	<i>A. quinata</i>	—	—	FJ868727
木通	三叶木通	<i>A. trifoliata</i>	中国医学科学院药用植物研究所广西分所	PS0959MT02	GQ434616
木通	三叶木通	<i>A. trifoliata</i>	重庆南充	PS0959MT01	GQ434615
木通	三叶木通	<i>A. trifoliata</i>	—	—	FJ868728
木通	白木通	<i>A. trifoliata ssp. australis</i>	—	—	AY029788
青风藤	青藤	<i>Sinomenium acutum</i>	四川大学华西药学院药用植物园	PS0347MT01	GQ434392
青风藤	青藤	<i>S. acutum</i>	—	—	AB571154
青风藤	青藤	<i>S. acutum</i>	—	—	AY017394
海风藤	风藤	<i>Piper kadsura</i>	—	—	EF450290
海风藤	风藤	<i>P. kadsura</i>	—	—	JF491439
海风藤	风藤	<i>P. kadsura</i>	—	—	DQ868724
钩藤	钩藤	<i>Uncaria rhynchophylla</i>	四川大学华西药学院药用植物园	PS1040MT01	JF421552
钩藤	钩藤	<i>U. rhynchophylla</i>	—	—	AJ346900
钩藤	大叶钩藤	<i>U. macrophylla</i>	中国医学科学院药用植物研究所广西分所	PS1038MT01	GQ434636
钩藤	大叶钩藤	<i>U. macrophylla</i>	中国医学科学院药用植物研究所云南分所	PS1038MT03	GQ434637
钩藤	大叶钩藤	<i>U. macrophylla</i>	中国医学科学院药用植物研究所云南分所	PS1038MT04	GQ434638
钩藤	华钩藤	<i>U. sinensis</i>	重庆南充	PS1039MT01	GQ434639
钩藤	毛钩藤	<i>U. hirsuta</i>	中国医学科学院药用植物研究所云南分所	PS1043MT01	GQ434641
钩藤	毛钩藤	<i>U. hirsuta</i>	—	—	GU937110
钩藤	无柄果钩藤	<i>U. sessilifructus</i>	中国医学科学院药用植物研究所广西分所	PS1041MT02	GQ434640
钩藤	无柄果钩藤	<i>U. sessilifructus</i>	—	—	GU937111
忍冬藤	忍冬	<i>Lonicera japonica</i>	—	—	FJ774978
忍冬藤	忍冬	<i>L. japonica</i>	—	—	FJ774982
忍冬藤	忍冬	<i>L. japonica</i>	—	—	EF611052
天仙藤	马兜铃	<i>Aristolochia debilis</i>	—	—	EU257422
首乌藤	何首乌	<i>Fallopia multiflora</i>	—	—	EF532407
首乌藤	何首乌	<i>F. multiflora</i>	—	—	EU580718
首乌藤	何首乌	<i>F. multiflora</i>	—	—	EU808016
通关藤	通关藤	<i>Marsdenia tenacissima</i>	中国医学科学院药用植物研究所云南分所	PS0844MT01	GQ434576
通关藤	通关藤	<i>M. tenacissima</i>	—	—	FM178493
黄藤	黄藤	<i>Fibraurea recisa</i>	中国医学科学院药用植物研究所广西分所	PS0350MT05	GQ434393
络石藤	络石	<i>Trachelospermum jasminoides</i>	中国医学科学院药用植物研究所广西分所	PS0501MT01	GQ434434
络石藤	络石	<i>T. jasminoides</i>	四川大学华西药学院药用植物园	PS0501MT06	GQ434435
络石藤	络石	<i>T. jasminoides</i>	—	—	AB610209

## 2. 方法

### (1) DNA 提取。

实验材料均为硅胶干燥叶片, 取样约 10 mg, 用 DNA 提取研磨仪(Retsch MM400, Germany)研磨 1 min(30 次/s)后, 利用植物 DNA 提取试剂盒(Tian-gen Biotech Co., China)提取总 DNA。

### (2) PCR 扩增及测序。

扩增引物正向为 5'-ATGCGATACTTG-GTGTGAAT-3', 反向为 5'-GACGCTTCTCCA-GACTACAAT-3'。PCR 反应体积为 25  $\mu$ L, 反应体系及扩增程序参照陈士林等的文章<sup>[7]</sup>。PCR 扩增产物经纯化后, 使用 ABI 3730XL 测序仪双向测序, 测序引物与扩增引物一致。

### (3) 数据处理。

测序峰图利用 CodonCode Aligner V3.0 (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<sup>[16,17]</sup>。然后, 将所有序列用软件 MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) 4.0 分析比对并基于 K2P 双参数模型进行遗传距离分析, 用 NJ (邻接) 法构建系统聚类树。利用 bootstrap (1000 次重复) 检验各分支的支持率。

## 二、结果与分析

### 1. 藤类药材 ITS2 序列比较

经实验测序获得 ITS2 序列 17 条, 加上 GenBank 所下载序列 30 条, 共计 14 种 47 份样本的藤类药材, ITS2 序列片段长度范围在 190~284 bp, 平均序列长度为 222 bp, 最长的为海风藤的原植物风藤, 最短的为首乌藤的原植物何首乌, 此外所研究样本 ITS2 序列 GC 含量在 51.7%~80.3%, 平均 GC 含量为 66.4%, GC 含量最高的为首乌藤的原植物何首乌, 最低的为青风藤的原植物青藤。所研究藤类药材有 11 种包括了 2~3 条不同来源的种内序列, 根据 Kimura-2 参数遗传距离模型计算得到序列间遗传距离, 种内最大 K2P 距离为 0.053 (通关藤); 种内最小 K2P 变异为 0.000 (络石藤)。14 种药材 (多基原药材选药典中第一正品为代表) 的 ITS2 序列经比对后

长度为 292 bp, 具有较多的变异位点, 种间平均 K2P 距离为 0.852, 最小 K2P 距离为 0.309, 遗传距离最小的为木通与大血藤。

### 2. 聚类分析

基于 ITS2 序列, 利用 Mega4.0 构建了 NJ 系统聚类树 (图 1), 聚类树中包含了药典中 14 种藤类药

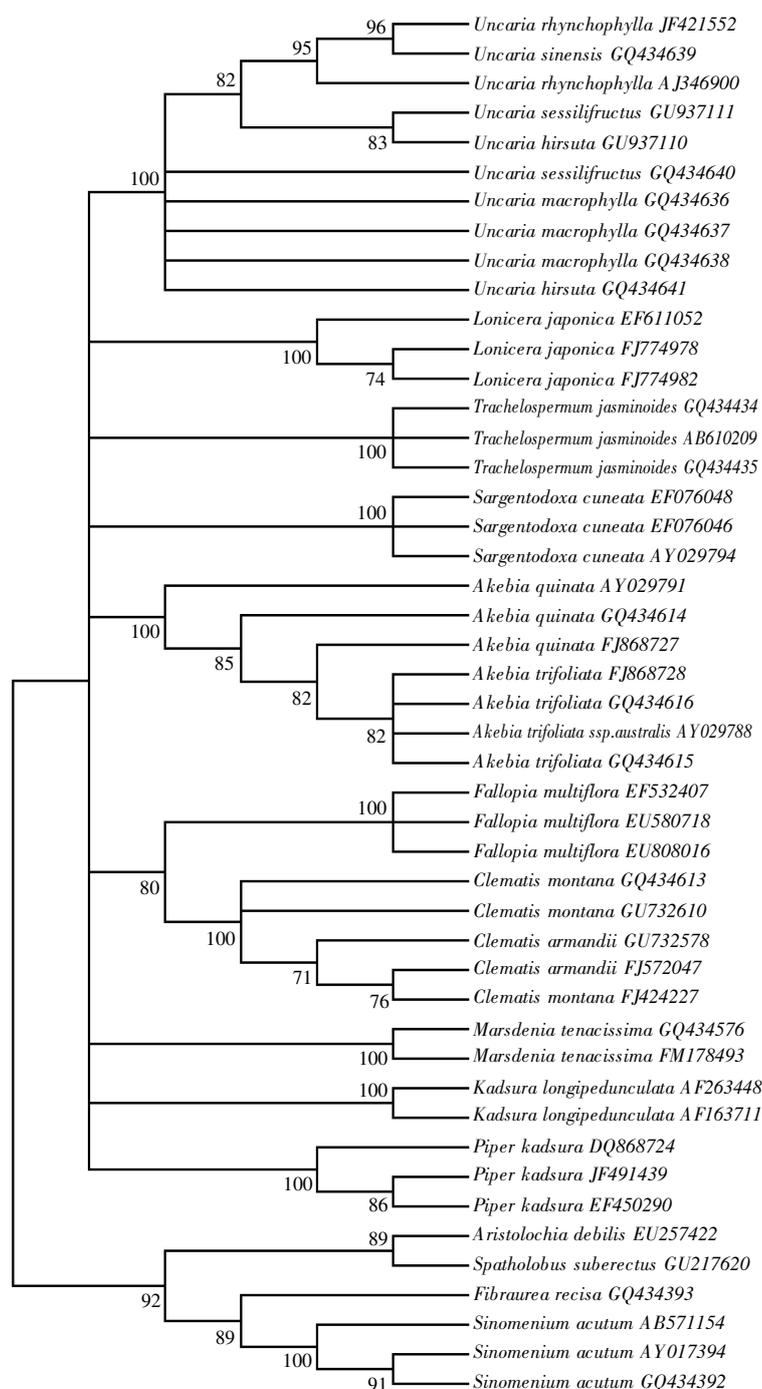


图 1 基于 ITS2 序列构建的藤类药材的邻接 (NJ) 树  
注 bootstrap 1000 次重复 枝上数值仅显示自展支持率  $\geq 70\%$ 。

材的 47 份样本的序列,其中有 11 种藤类药材具有不同产地来源样本,聚类结果表明,同一物种不同来源样本聚在一起,表现出单系性,同时又与其它药材品种彼此很明显区分。此外,多基原药材,如钩藤、木通及川木通等,同一药材的不同基原也较早聚在一起,易于和其它藤类药材区别。

### 三、讨论

ITS2 序列片段是目前被大家所广泛认可的 DNA 条形码<sup>[7,10,12]</sup>,本研究首次利用 ITS2 条形码对《中国药典》中收录的常用藤类药材进行系统的比较鉴别,发现所研究藤类药材的 ITS2 条形码序列长度范围为 190~284 bp,其种内 K2P 距离(0~0.053)均远远小于种间 K2P 距离(平均值为 0.852,最小值为 0.309),在基于邻接法构建的系统聚类树中,来自不同产地的药材品种均表现出了单系性,而同时又与其它药材品种明显分开,因此,基于 ITS2 条形码可以方便快捷的鉴定中国药典中的藤类中药材,同时可以有效区别一些在中药鉴别与商品流通中的易混淆种类,如大血藤与鸡血藤,木通与川木通,青风藤与海风藤等药材。

中医中药是祖国医学的重要组成部分,但中药原料药材的真伪一直是制约现代中药产业化进程的一个瓶颈。DNA 条形码是目前国际上最新物种鉴定技术,通过构建中药材 DNA 条形码技术鉴定体系,可以实现对中药材原植物、饮片、粉末以及细胞、组织等材料来源的准确快速鉴定,该技术易于掌握,便于推广,对缓解传统鉴定人才缺乏、药材鉴定困难、确保中药材的安全有效均具有重要的现实意义。本研究表明 ITS2 条形码适用于中药材鉴定领域,对完善中药安全性检测方法体系可以起到重要的作用。

### 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.
- 2 史顺梅. 几组常用藤类中药饮片的鉴别与应用. 实用医技杂志, 2007, 14(6): 728.
- 3 藤茜华, 邓黎宁, 盘红梅. 木通、川木通与关木通鉴别. 实用中医药杂志, 2004, 20(8):468.
- 4 沈保安. 络石藤及其混淆品种的鉴别. 中国中药杂志, 1993, 18(9):521.
- 5 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.
- 6 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.
- 7 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.
- 8 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.
- 9 朱英杰, 陈士林, 姚辉, 等. 重楼属药用植物 DNA 条形码鉴定研究. 药学学报, 2010, 45(3):376.
- 10 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, 130:116.
- 11 Pang XH, Song JY, Zhu YJ, *et al.* Applying plant DNA barcodes for *Rosaceae* species identification. *Cladistics*, 2010, 26:1.
- 12 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.
- 13 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 Evol Biol*, 2010, 10:324.
- 14 Pang XH, Song JY, Zhu YJ, *et al.* Using DNA barcoding to identify species within Euphorbiaceae. *Planta Med*, 2010, 76:1784.
- 15 Kress WJ, Wurdack KJ, Zimmer EA, *et al.* Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102:8369.
- 16 Eddy SR. Profile hidden Markov models. *Bioinformatics*, 1998, 14: 755.
- 17 Keller A, Schleicher T, Schultz J, *et al.* 5.8S–28S rRNA interaction and HMM-based ITS2 annotation. *Gene*, 2009, 430:50.

## Identification of Vine Herbs Using DNA Barcoding Method

Sun Zhiying, Zhang Yongqing

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

**Abstract:** This study was aimed to discriminate 14 types of vine herbs of the *Chinese Pharmacopoeia*. The second internal transcribed spacer (ITS2) of ribosomal DNA was amplified and sequenced. Sequence assembly and consensus sequence generation were performed using the CodonCode Aligner. Phylogenetic study was performed using software MEGA 4.0 in accordance with the Kimura 2-Parameter (K2P) model. And the phylogenetic tree was

constructed using neighbor-joining (NJ) methods. The results showed that the length of ITS2 sequence of 14 studied vine herbs was from 190 bp to 284 bp. The intraspecific genetic distance (K2P distance) of vine herbs is between 0 and 0.053, which was far lower than their interspecific genetic distance (mean: 0.852, the smallest: 0.309). In the cluster dendrogram, all studied medicinal materials with several samples showed monophyletic, and meanwhile, distinguished from others. It was concluded that ITS2 barcode is suitable for the identification of vine herbs from the *Chinese Pharmacopoeia*. This method will play an important role in the identification of Chinese Materia Medica.

**Keywords:** Vine herbs, DNA barcode, ITS2, molecular identification

(责任编辑 李沙沙 张志华 责任译审 王 晶)