

基于 ITS2 序列的车前子原植物及其混伪品的分子鉴定*

邬 兰** , 刘义梅** , 熊永兴 , 陈科力***

(湖北中医药大学药学院 & 中药资源和中药复方教育部重点实验室 武汉 430065)

摘 要 :目的 通过分析车前子原植物及其混伪品的 ITS2 条形码序列 ,探索鉴定车前子及其混伪品的新方法。方法 对研究材料进行 DNA 提取、PCR 扩增和双向测序 ,所得序列经过 CodonCode Aligner 拼接后 ,用软件 MEGA5 进行相关数据分析 ,计算其种间、种内遗传距离 ,并利用已建立的 ITS2 数据库及其网站预测 ITS2 二级结构和构建系统发育树。结果 车前种内最大 K2P 距离为 0.009 9 ,与混伪品种间最小 K2P 距离为 0.497 6 ;平车前种内最大 K2P 距离为 0.005 2 ,与混伪品种间最小 K2P 距离为 0.519 1。车前子基原植物与其混伪品的二级结构的分子形态均有明显差异。由所构建的系统聚类树可以看出 ,车前与平车前的不同来源样品聚在一支 ,并能很好与混伪品区分开。结论 :ITS2 条形码序列能够成功鉴定车前子基原植物与其混伪品 ,为车前子的基原鉴定提供了新的方法。

关键词 :车前子 ITS2 序列 混伪品 鉴定

doi: 10.11842/wst.2013.09.006 中图分类号 :R282.5 文献标识码 :A

2010 年版《中国药典》收载车前子 *Plantaginis Semen* 为车前科植物车前 *Plantago asiatica* L. 或平车前 *Plantago depressa* Willd. 的干燥成熟种子^[1]。车前子性味甘寒 ,归肾、膀胱经 ,具有清热利尿通淋、渗湿止泻、明目、祛痰之功^[2]。其作用平和 ,效果较好 ,临床应用广泛。根据文献资料^[3]记载 ,车前子的常见混伪品为十字花科植物播娘蒿 *Descurainia sophia* (L.) Webb. ex Prantl、独行菜 *Lepidium apetalum* Willd.、桔梗科植物党参 *Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf.、苋科植物青葙 *Celosia argentea* L.、旋花科植物菟丝子 *Cuscuta chinensis* Lam. 的干燥成熟种子、唇形科植物荆芥 *Schizonepeta tenuifolia* Briq.、益母草 *Leonurus japonicus* Houtt. 的干燥成熟果实。龚卉

卉等^[4]使用扫描电镜对车前子及其易混伪品进行了成功鉴别。张小斌等^[5]针对药材市场上不断出现车前子伪品的现象 ,从性状上对正品车前子和几种伪品车前子进行了鉴别。多位学者对车前子与荆芥子从药材性状、理化性质、显微特征等方面进行了鉴别^[6-8]。而对车前子及其混伪品条形码分子鉴定方面的相关研究尚少。DNA 条形码是指用短的、标准的 DNA 片段作为物种标记而建立的一种新的生物鉴定方法。在众多条形码中 ,ITS2 片段是最具有潜力的候选 DNA 条形码之一^[9-14]。本研究探索运用 ITS2 序列鉴定车前子基原植物及其常见混伪品 ,为车前子的基原鉴定提供新的方法。

1 植物材料

实验采集车前样品 2 份(标本号为 DF01MT01 和

收稿日期 :2013-03-12

修回日期 :2013-12-18

* 科学技术部国家科技支撑计划(2011BAI07B08) 中药材质量评价体系建设及其质量标准示范研究 ,负责人 杨秀伟。

** 邬兰、刘义梅并列第一作者。

*** 通讯作者 :陈科力 ,教授 ,研究方向为中药资源及其品质研究。

DF01MT03), 均为新鲜叶片, 材料经湖北中医药大学鉴定教研室陈科力教授鉴定, 叶片经硅胶干燥后保存备用。其余 9 个物种 28 份样本来源于 GenBank。材料来源见表 1。

2 方法

2.1 DNA 提取和 PCR 扩增及测序

硅胶干燥叶片经液氮研磨, 取样约 30 mg, 参照植物 DNA 提取试剂盒(Tiangen Biotech Co., 中国)提取总 DNA。ITS2 通用引物 S2F :5'-ATGCGAT-ACTTGGTGTGAAT-3' 和 S3R :5'-GACGCTTCTCCA-GACTACAAT-3'。反应条件为 94℃ 5 min, 94℃ 30 s ; 56℃ 30 s ; 72℃ 45 s, 40cycles ; 72℃ 10 min。反应体系为 MgCl₂(25 mM)2 μL、dNTP Mixture(2.5 mM)2 μL、PCR buffer(10×)2.5 μL、正反向引物(2.5 μM)各 1.0 μL、TagDNA 聚合酶 1U、总 DNA 约 1 μL(约 30 ng), 其余用 ddH₂O 补至 25 μL。电泳检查 PCR 扩增情况, 进行双向测序。

2.2 数据分析

对获得的测序峰图使用 CondonCode Aligner (Codon Code Co., USA) 校对拼接, 将实验数据和从 GenBank 下载的 ITS2 序列的两端 5.8S 和 26S 除去(采用基于隐马尔可夫模型^[15]HMMer 注释方法)以获

得 ITS2 间隔区序列。将所有序列用 MEGA5 软件进行分析比对, 计算 K2P 遗传距离, 利用 Schultz 等^[16,17]的研究方法预测各物种 ITS2 茎环二级结构并建立 NJ 系统发育树。

3 结果与分析

3.1 序列比较

车前样品的 ITS2 序列长度为 203 bp, 平均 GC 含量为 54.8%; 平车前 ITS2 序列长度为 195 bp, 平均 GC 含量 51.6%。二者都具有 1 个 POLY(C)、1 个 POLY(G)和 1 个 POLY(A)结构。车前种内不同来源样品 8 条序列比对后, 长度为 203 bp, 有两位点碱基变异, 基于 K2P 双参数模型计算遗传距离, 车前的种内平均 K2P 距离为 0.002 5; 种内最大 K2P 距离为 0.009 9。平车前 ITS2 序列 3 条, 序列比对后长度为 195 bp, 变异位点为 1 个, 平车前的种内平均 K2P 距离为 0.003 4; 种内最大 K2P 距离为 0.005 2。

对车前子基原植物与各混伪品种间序列进行比对后, 序列长度为 260 bp, ITS2 序列间存在较多的变异位点。其中基原植物车前与其余各混伪品种间平均 K2P 距离为 0.779 9, 最小种间 K2P 距离为 0.497 6; 平车前与其余各混伪品种间平均 K2P 距离

表 1 材料来源及 GenBank 登录号

中文名	拉丁学名	来源	登录号
车前	<i>Plantago asiatica</i>	武汉	—
车前	<i>Plantago asiatica</i>	GenBank	JF421529 ,JQ916063 ,AJ548977 ,AB558160 ,JQ916064 ,AY101862
平车前	<i>Plantago depressa</i>	GenBank	AB281168 ,AB296069 ,AB296070
播娘蒿	<i>Descurainia sophia</i>	GenBank	AY230618 ,AY230619
独行菜	<i>Lepidium apetalum</i>	GenBank	DQ310525 ,FJ980405
党参	<i>Codonopsis pilosula</i>	GenBank	EF190460 ,FJ572048 ,AF134860
青葙	<i>Celosia argentea</i>	GenBank	AY174418 ,JN407414 ,JN407416
菟丝子	<i>Cuscuta chinensis</i>	GenBank	DQ211587 ,JN234828 ,JN234829 ,JN234830
荆芥	<i>Schizonepeta tenuifolia</i>	GenBank	EU383034 ,AB557591 ,EU591983
益母草	<i>Leonurus japonicus</i>	GenBank	DQ903314 ,HM595474

为 0.885 5 , 最小种间 K2P 距离为 0.519 1。

3.2 ITS2 序列二级结构

所有物种的二级结构均由 4 个螺旋区和一个中心环组成 (图 1)。比较车前与平车前的 ITS2 二级结构发现,二者具有明显差异,螺旋发出的角度、茎环位置、大小、数目均有不同。同时车前与平车前和其混伪品的 ITS2 二级结构差异也较大,各螺旋彼此之间的夹角以及茎环的分布位置、大小都有不同。因此,依据 ITS2 二级结构可以直观地将车前子基原植物与其混伪品区分开来。

3.3 物种间 ITS2 序列聚类分析

基于 ITS2 序列,通过邻接法 (NJ)构建系统聚类树(图 2)。从所构建的系统聚类树可以看出,车前子基原植物车前与平车前均具有单系性,不同来源个体聚为一支,同时也很容易与其它混伪品区分开来。因此,ITS2 序列可以用来鉴别车前子基原植物与其混伪品。

4 讨论

车前子药材细小色深,伪品多及掺伪现象严重,常见的混伪品有荆芥子、北葶苈子、南葶苈子、党参子、菘蔚子、青箱子、菟丝子等,这些植物的种子在外形、颜色、大小等方面与车前子较为相似,成为其掺伪混杂的重要原因,也不易鉴别,但它们分别来源于与车前子不同科的植物,在其性味、归经、功能主治方面更与车前子显著不同,且党参子和荆芥子并无药用的记载,显然一旦混用将难以保证车前子临床用药的安全有效。

本文应用 DNA 条形码 ITS2 序列片段对车前子两种基原植物及其混伪品进行了鉴别,研究结果表

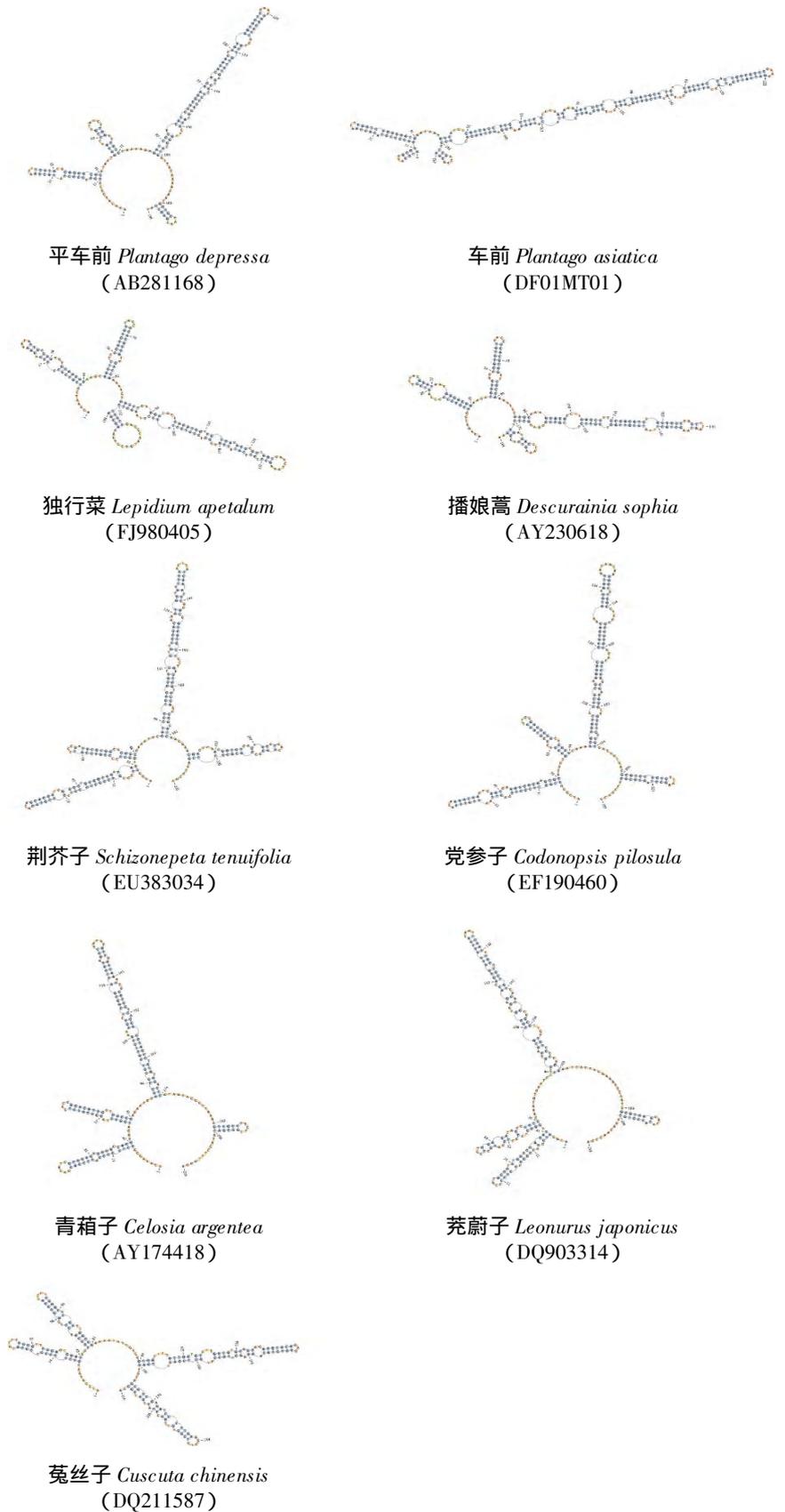


图 1 车前子及其易混种的 ITS2 序列二级结构比较

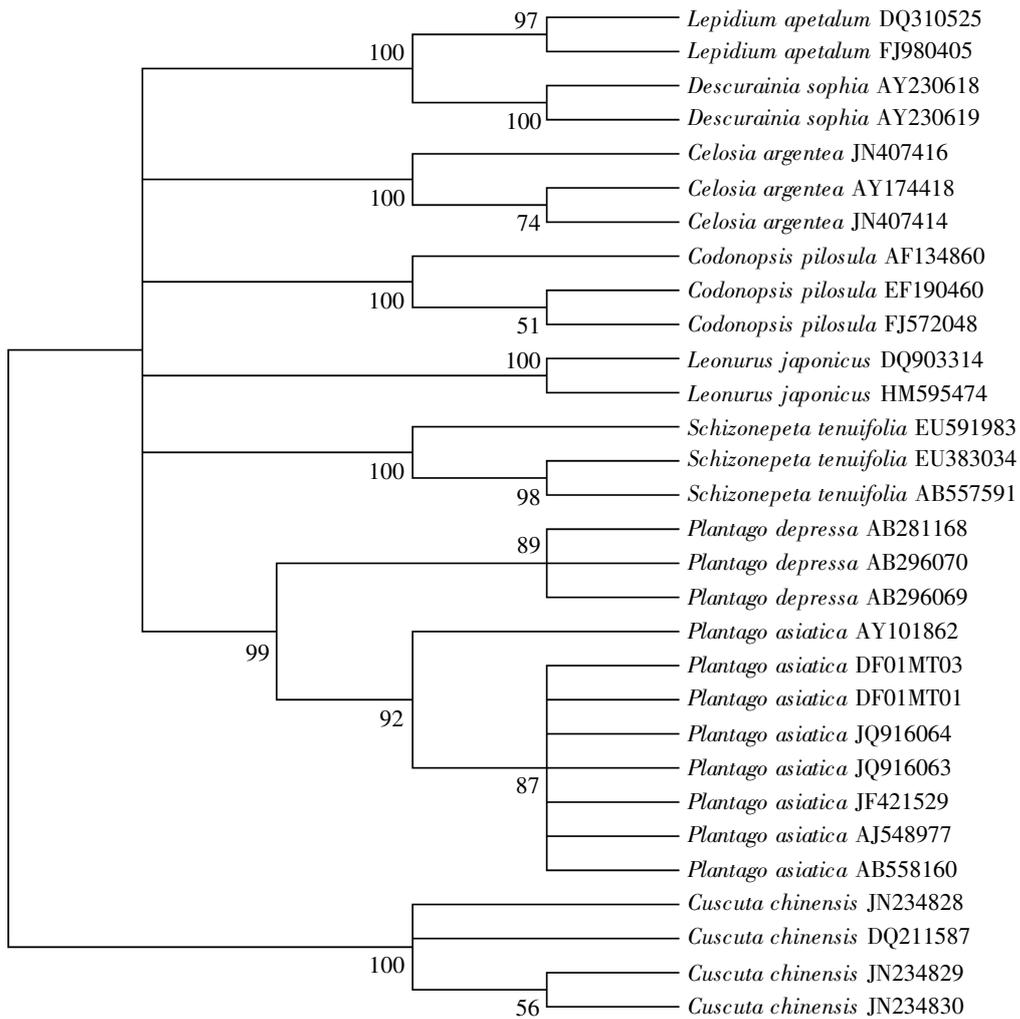


图 2 基于 ITS2 序列构建的车前子及其混伪品的 NJ 树

注 bootstrap 1 000 次重复 枝上数值仅仅显示自展支持率≥50% 采用 K2P 距离法。

明,通过对车前与平车前及其混伪品数据的分析,发现车前与平车前的种内最大 K2P 距离均小于种间最小距离。同时,车前子及其混伪品的 ITS2 二级结构可以从直观上方便的鉴别车前子的两种基原植物与各混伪品。此外,从基于 ITS2 序列建立的车前子及其混伪品 NJ 树可以看出,车前与平车前各自的不同样品分别聚为一支,支持率分别为 92% 和 89%,其余每种混伪品(除苋科植物青葙)的不同样品均以 100% 支持率聚在一起,明显的把车前子的两种基原植物与其混伪品鉴别开来。因此,应用 ITS2 条形码序列能够正确鉴定车前子基原植物与其混伪品,为车前子的基原鉴定提供了新的方法。

参考文献

- 1 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部). 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 63.
- 2 高学敏. 中药学. 北京: 中国中医药出版社, 2002: 255.
- 3 邢殿友. 几组常见易混淆中药的鉴别. 吉林中医药, 2007, 27(12): 53.
- 4 龚卉卉, 汪娟, 孙莉, 等. 车前子及其易混伪品的扫描电镜鉴别. 中国野生植物资源, 2012, 31(6): 49~52.
- 5 张小斌, 李雪艳. 浅析几种伪品车前子的鉴别. 辽宁中医药大学学报, 2008, 10(3): 113.
- 6 杜芳, 郭亚男, 王筱雨, 等. 车前子与伪品荆芥子的鉴别. 内蒙古中医药, 2006(1): 29.
- 7 吕明远, 刘雪平. 车前子与其伪品荆芥子的鉴别. 中草药, 2000, 31(8): 636.
- 8 张洁, 荆复礼. 车前子及其混伪品的性状与薄层色谱鉴别. 中药材,

- 1994,17(2):20~21.
- 9 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. *PLoS One*, 2010, 5(1):e8613.
- 10 Pang X H, Song J Y, Zhu Y J, *et al.* Using DNA barcoding to identify species within Euphorbiaceae. *Planta Med*, 2010, 76(15): 1784~1786.
- 11 Gao T, Yao H, Song J Y, *et al.* Evaluating the feasibility of using candidate DNA barcodes in discriminating species of the large Asteraceae family. *BMC Evol Biol*, 2010, 10:324.
- 12 陈士林, 庞晓慧, 姚辉, 等. 中药 DNA 条形码鉴定体系及研究方向. 世界科学技术—中医药现代化, 2011, 13(6):747~754.
- 13 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.
- 14 罗焜, 陈士林, 陈科力, 等. 基于芸香科的植物通用条形码研究. 中国科学, 2010, 30(4):342~351.
- 15 Keller A, Schleicher T, Schultz J, *et al.* 5.8S-28S rRNA interaction and HMM-based ITS2 annotation. *Gene*, 2009, 430(1-2):50~57.
- 16 Schultz J, Muller 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:W704~W707.
- 17 Koetschan C, Frsrer F, Keller A, *et al.* The ITS2 Database III—sequences and structures for phylogeny. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38: D275~279.

Identification of Original Plant of Plantaginis Semen and Its Adulterants Using DNA Barcoding Method Based on ITS2 Sequence

Wu Lan, Liu Yimei, Xiong Yongxing, Chen Keli

(Key Laboratory of Ministry of Education on Traditional Chinese Medicine Resource and

Compound Prescription & School of Pharmacy, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China)

Abstract: This study was aimed to explore a new method to identify the original plant of Plantaginis Semen and its adulterants by the ITS2 regions. The second internal transcribed spacer (ITS2) of ribosomal DNA was amplified and sequenced by bidirectional sequencing of PCR products. Sequence assembly and consensus sequence generation were performed by using CodonCode Aligner. The ITS2 secondary structure was predicted using ITS2 database and websites. The phylogenetic tree was constructed by MEGA5. The results showed that the maximum intraspecific K2P distance of *Plantago asiatica* was 0.009 9, while the minimum interspecific K2P distance was 0.497 6; the maximum intraspecific K2P distance of *P. depressa* was 0.005 2, while the minimum interspecific K2P distance was 0.519 1. The ITS2 secondary structure showed that *P. asiatica* and *P. depressa* can be differentiated obviously from its adulterants. Different samples of *P. asiatica* and *P. depressa* were gathered together and can be distinguished from its adulterants by NJ tree. It was concluded that the ITS2 sequence was able to identify original plant of Plantaginis Semen and its adulterants correctly. It provided a new method for the identification of original plant of Plantaginis Semen.

Keywords: Plantaginis Semen, ITS2 sequence, adulterants, identification

(责任编辑 李沙沙 张志华, 责任译审 汪 晶)