

藏药材榜嘎及其混伪品的 DNA 条形码鉴定研究

郭豪杰^{1,2} 丁 钰¹ 陈维武³ 刘海涛² 边巴次仁³ 李西文¹

(1 中国中医科学院中药研究所, 北京, 100700; 2 中国医学科学院药用植物研究所, 北京, 100193;

3 西藏奇正藏药股份有限公司, 林芝, 860000)

摘要 目的: 利用 DNA 条形码技术对榜嘎及其混伪品进行鉴别, 为藏药榜嘎的鉴定提供准确可靠的依据。方法: 通过分析榜嘎及其混伪品 ITS 和 ITS2 序列的遗传距离、种内种间变异并构建 NJ 系统发育树, 以评价 ITS2 和 ITS 序列的鉴定效率。结果: 本研究中 ITS2 和 ITS 序列扩增效率相同, 在 blast 比对和遗传距离分析上, ITS 序列表现出更强的鉴定能力; 通过 K2P 距离构建 NJ 树, ITS2 和 ITS 序列在榜嘎与混伪品间的种间变异无统计学意义, 但 ITS 序列对易混物种的鉴定效率较高。结论: ITS 序列可作为鉴定榜嘎及其混伪品的有效条形码。

关键词 藏药榜嘎乌头属; ITS

Identification of Herba Aconiti Bonga and Its Adulterants Using DNA Barcode

Guo Haojie^{1,2}, Ding Yu¹, Chen Weiwu³, Liu Haitao², Bianba Ciren³, Li Xiwen¹

(1 Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

2 Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China; 3 Tibet Cheezheng Tibetan Medicine Co., Ltd., Linzhi 860000, China)

Abstract Objective: To select an effective barcode for identifying Herba Aconiti Bonga and its adulterants using DNA barcoding technology. **Methods:** This study compared ITS and ITS2 sequences and analyzed genetic distances, the variations of inter- and intra-species. Neighbor-joining tree was also constructed for evaluate their identification efficiencies based on the sequences from experimental and GenBank database. **Results:** The results showed that ITS and ITS2 sequences had the same amplification efficiency. ITS sequence had a better performance than ITS2 on species identification efficiency using blast and nearest distance methods. The two barcodes showed no significant difference on the identification using NJ tree to distinguish Herba Aconiti Bonga and its adulterants. However results demonstrated that ITS can also identify all species among adulterants of Herba Aconiti Bonga. **Conclusion:** ITS sequence can be used as the effective barcode to identify Herba Aconiti Bonga and its adulterants.

Key Words Tibetan medicine; Herba Aconiti Bonga; Aconitum; ITS

中图分类号: R282.5 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2016.01.003

藏医药是中国传统医药的重要组成部分, 具有悠久的历史、独特的医疗和研究价值及市场开发潜力^[1]。榜嘎是藏医习用藏药材, 为毛茛科乌头属植物船盔乌头 (*Aconitum naviculare*) 或甘青乌头 (*A. tanguticum*) 的干燥全草, 味苦, 性凉, 具有清热解毒与燥湿之功效, 主要用于治疗热病等^[2]。船盔乌头在我国主要分布于西藏南部 3200 ~ 5000 m 的山坡草地或灌木丛中, 甘青乌头分布于西藏东部、云南西北部、四川西部等地 3200 ~ 4800 m 的山地草坡或沼泽草地^[3]。《晶珠本草》将乌头属分为“白、黄、红、黑”四种, 其中榜嘎属于白乌头。

乌头属药材形态相似, 榜嘎有较多混用和代用品, 西藏地区用叉苞乌头, 青海用祁连乌头, 川西用

刷经寺乌头作为榜嘎使用。同时, 由于地域上的差异, 同名异物或同物异名的现象也是造成榜嘎混用乱用原因之一^[1]。榜嘎在不同著作中曾出现多个藏语名, 《蒙药正典·美丽日饰》中记载用百合科麦冬 (*Ophiopogon japonicus*) 作为榜嘎的来源植物^[4]。传统鉴别方法受地域差异、活性成分和亲缘关系等因素影响, 存在鉴定局限性。乌头属植物大多具有毒性, 为保障临床用药安全, 寻求一种榜嘎药材快速准确的鉴定方法则显得尤为迫切。

DNA 条形码技术具有通用性强、鉴定结果可靠、重复性良好等优点, 被广泛用于中药材鉴定中^[5]。ITS2 是中国学者通过大量样本的系统研究, 提出的可以作为鉴定药用植物和近缘种的通用条形码^[6]。ITS/ITS2 是中国植物 DNA 条形码研究组提

基金项目: 重大新药创制国家科技重大专项 (编号: 2014ZX09304307001-014; 2014ZX09301308-007); 国家科技支撑计划 (编号: 2015BAI05B02); 国家科技计划港澳台合作专项 (编号: 2015DFM30030)

通信作者: 李西文, 副研究员, 研究方向: 中药栽培与鉴定, Tel: (010)84084107, E-mail: xwli@icmm.ac.cn

出可作为种子植物核心条形码的序列^[7]。目前榜嘎的鉴别主要是传统的性状和显微鉴别,我们在本文通过多种数据分析方法分析 ITS 和 ITS2 对榜嘎及其混为品的鉴别能力,为建立合适的榜嘎 DNA 条形码技术奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器 实验物种包括工布乌头(*Aconitum kongboense*)、铁棒锤(*A. pendulum*)和甘青乌头(*A. tanguticum*)、麦冬(*Ophiopogon japonicus*)等。植物基因组 DNA 提取试剂盒(Tiagen Biotech Co., 中国),2 × Tag PCR Master Mix(北京艾德莱生物科技有限公司,中国),引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。scientz-48 高通量组织研磨仪(宁波

新芝生物科技股份有限公司,中国),2720PCR 仪(Applied Biosystems ®, USA),1-14K 高速离心机(SIGMA, Germany)。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 取药材样品约 50 mg,用高通量组织研磨仪研磨 2 min(50Hz)后,利用植物基因组 DNA 提取试剂盒提取总 DNA。

1.2.2 PCR 扩增及测序 反应体系为 2 × Tag PCR Master Mix 12.5 μL,正反向引物(2.5 μM)各 1.0 μL、模板 DNA2.0 μL,加 ddH₂O 补至 25 μL。各条形码的引物序列和 PCR 反应程序见表 1。1%琼脂糖电泳检测 PCR 扩增情况,由测序公司进行双向测序。

表 1 引物序列和 PCR 反应程序

序列	引物	引物序列(5′-3′)	PCR 反应程序
ITS2	S2F	ATGCGATACTTGGTGTGAAT	94 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s,56 ℃ 30 s,72 ℃ 45 s,40 cycles;72 ℃ 10 min
	S3R	GACGCTTCCTCCAGACTACAAT	
ITS	5F	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	94 ℃ 5 min;94 ℃ 1 min,50 ℃ 1 min,72 ℃ 1.5 min + 3 s/cycle,30 cycles;72 ℃ 7 min
	4R	TCCTCCGCTTATTGATATGC	

表 2 Genbank 数据

物种名	Genbank 登录号
<i>A. albotriolaceum</i>	JF975782 JF975783 JF975785
<i>A. apoense</i>	KJ078593 KJ078594 KJ078595
<i>A. austroyunnanense</i>	QJ350821 JQ350822 JQ387580
<i>A. barbatum</i>	JF975798 JF975802 JF975804 JF975805
<i>A. ferox</i>	KM887357 KM887365 KM887381
<i>A. forrestii</i>	AY164644 AY189783
<i>A. henryi</i>	KF022318 KF022319
<i>A. kongboense</i>	KM079168 KM079169 KM079170
<i>A. longecassidatum</i>	JF975807 JF975809 JF975810 JF975811
<i>A. ludlowii</i>	KM079165 KM079166 KM079167
<i>A. lycoctonum</i>	AF216537 AF216539 AF216541 AF216542
<i>A. nagarum</i>	AY189790 AY571347
<i>A. naviculare</i>	KM097993 KM097994 KM097995 KM097996
<i>A. pentheri</i>	JF331905 JF331909 JF331913 JF331917
<i>A. pulchellum</i>	KM079162 KM079163 KM079164
<i>A. richardsonianum</i>	KM098011 KM098013 KM098024 KM098026
<i>A. rockii</i>	KF022320 KF022321 KF233840
<i>A. sachalinense</i>	KJ482006 KJ482007 KJ482008 KJ482009 KJ482010
<i>A. scaposum</i>	AY150231 JF975815 JF975816 JF975818
<i>A. shennongjiaense</i>	JF975819 JF975820
<i>A. sinomontanum</i>	KF022322 KF022323 KF022324
<i>A. sungpanense</i>	AY189795 AY189796
<i>A. tanguticum</i>	KM098040 KM098042 KM098043 KM098046 KM098049
<i>A. variegatum</i>	KF219805 KF219812 KF219824
<i>Paeonia suffruticosa</i>	JN572149 EU369007 EU224272 FJ528285
<i>Paeonia veitchii</i>	JN622190 KC821539 KC821540 JN622191 U27695
<i>Paeonia lactiflora</i>	JN572150 EU591986 FJ514502 JQ743067 U27682
<i>Ophiopogon japonicus</i>	EU930854 KF671258 KF671255 KF671252 KF671250

1.2.3 数据处理 将测序峰图用 Codon Code Aligner 软件进行拼接,将每个片段两端引物及低质量序列切除,得到所需片段并对 ITS2 进行注释剪切。

同时从 GenBank 数据库中搜集并下载榜嘎及其混伪品 ITS 序列(表 2),注释剪切后得到 ITS2,结合实验样品序列,运用 MEGA 6.0 建立 NJ 树,计算遗传距离,分析榜嘎及其混伪品亲缘关系;采用 Perl 语言统计不同序列种内种间遗传差异;运用最近距离法(K2P nearest distance)和相似性搜索法(BLAST1)考察序列的鉴定效率^[8]。

2 结果与分析

2.1 序列信息和鉴定效率 各序列数量、长度范围、GC 含量、遗传距离、鉴定效率等信息见表 3。ITS2 由 ITS 注释而来,所以 ITS2 与 ITS 数量相等,都为 148 条。ITS2 的长度范围为 194 ~ 227bp,ITS 的长度在 605 ~ 777bp 之间。平均 GC 含量,ITS2 为 62.15%,ITS 为 59.26%。ITS2 和 ITS 的最小遗传距离相同,都为 0.0000;平均遗传距离 ITS 较小,为 0.1702,ITS2 为 0.2815;最大遗传距离 ITS2 较大,为 0.8423,ITS 为 0.5351。从鉴定效率看,ITS 表现较好,BLAST1 和 Nearest distance 鉴定效率都为 100%,ITS2 的 BLAST1 和 Nearest distance 鉴定效率都为 98.04%。综上所述,虽然 ITS2 最大遗传距离比 ITS 大,但是 ITS 最小遗传距离要小于 ITS2,并且 ITS 的鉴定效率高于 ITS2,所以从序列信息和鉴定效率方面考虑,ITS 更适合作为榜嘎及其混伪品的 DNA 条形码。

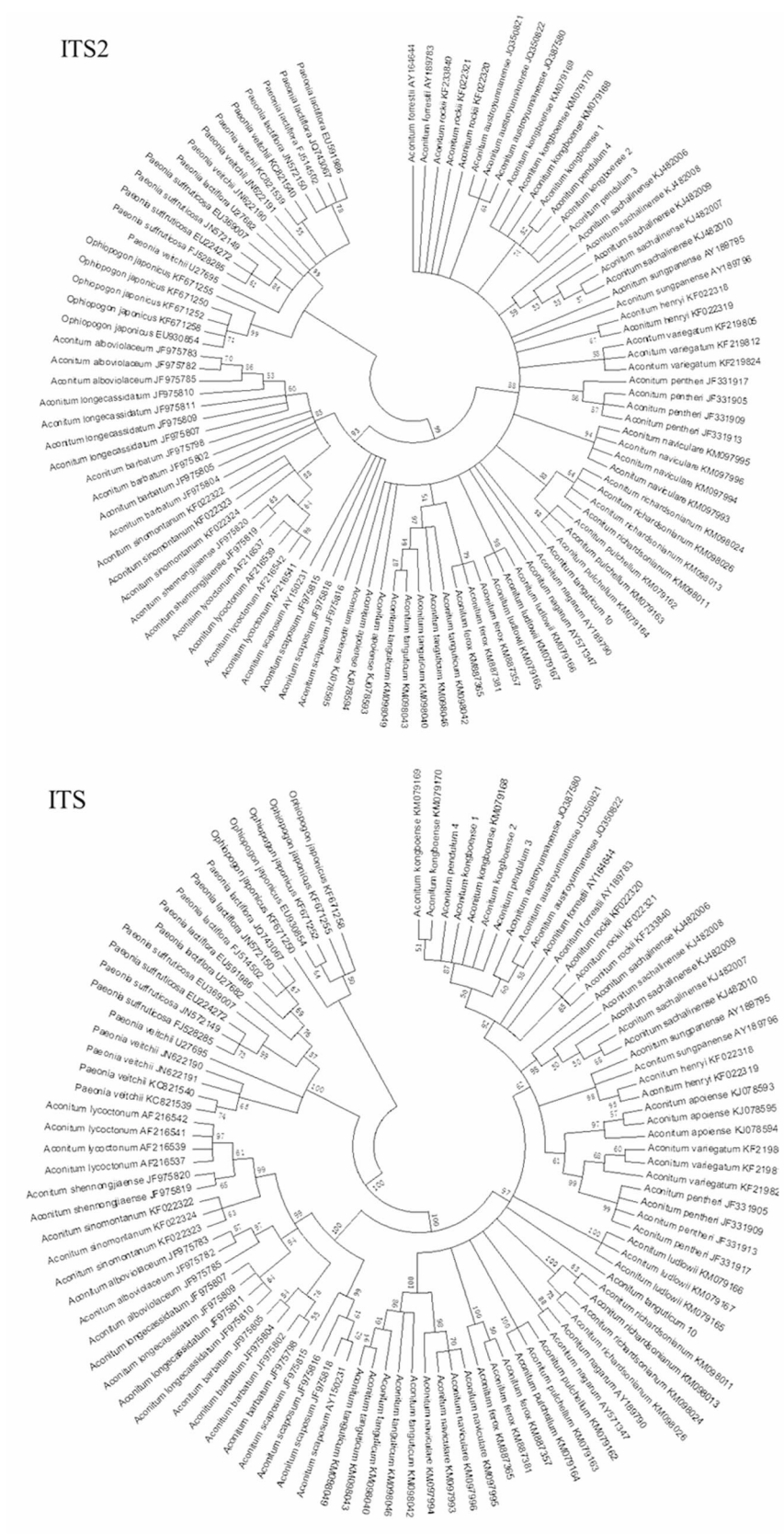


图1 NJ系统发育树

2.2 不同序列种内种间差异 利用 perl 语言统计 ITS2 和 ITS 序列的 6 个值:种内变异(Theta)、种内最大变异(Coalescent depth)、平均种内变异(All in-

tra-specific distance)、种间变异(Theta prime)、种间最小变异(Minimum inter-specific distance)、平均种间变异(All inter-specific distance)(表 4)。ITS2 和

ITS 序列的种间最小变异均大于种内最大变异,ITS2 的种内变异、平均种内变异、种间变异和平均种间变异与 ITS 相似。综上所述,在种内种间差异方面,ITS2 和 ITS 序列对榜嘎及其混伪品鉴定方面都有很好表现,无明显差别。

表 3 序列信息和鉴定成功率

序列特性		ITS2	ITS
序列数		102	102
长度/bp		194 ~ 227	605 ~ 777
平均 GC 含量/%		62. 15	59. 26
遗传距离	最大值	0. 8423	0. 5351
	最小值	0. 0000	0. 0000
	平均值	0. 2815	0. 1702
鉴定效率	BLAST1/%	98. 04	100
	Nearest distance/%	98. 04	100

表 4 种内种间差异分析

参数	ITS2	ITS
种内变异	0. 0042 ± 0. 0060	0. 0044 ± 0. 0062
种内最大变异	0. 0080 ± 0. 0126	0. 0082 ± 0. 0148
平均种内变异	0. 0067 ± 0. 0103	0. 0069 ± 0. 0126
种间变异	0. 0679 ± 0. 0170	0. 0584 ± 0. 0138
种间最小变异	0. 0195 ± 0. 0206	0. 0185 ± 0. 0165
平均种间变异	0. 0676 ± 0. 0395	0. 0603 ± 0. 0325

2. 3 NJ 树鉴别分析 基于 K2P 遗传距离建立 NJ 树,可以用来分析不同物种间的亲缘关系,以达到鉴别物种的目的。如图 1 所示,ITS2 和 ITS 序列都可以将榜嘎及其混伪品分开,但 ITS2 序列对乌头属其他物种的鉴定效率相对较差。ITS 序列表现出良好的鉴别能力,能够将不同的物种分到不同的分支上,更适合作为鉴定榜嘎及其混伪品的条形码序列。

3 讨论

乌头属植物作为有毒植物及药用植物一直倍受广泛的关注,全属约有 350 种植物,我国约有 167 种,其中 53 种可作药用^[2-3,9]。乌头属植物种间系统发育复杂,该属的分子生物学研究报道较少,多集中于生物多样性的研究,如 ISSR 分析、RAPD 分析^[10-12],鲜有生药学的分子鉴定研究。He 等利用条形码技术对乌头属的 19 个物种 134 份样品进行鉴定研究,但其研究仅用到 psbA-trnH 序列,没有对 ITS/ITS2 序列进行分析^[13]。榜嘎,藏名榜阿嘎保,全草均可入药,有小毒,历代藏医药书均有记载,具有清热解毒之功效,多用于各种热病的治疗,属于多基原藏药材,同时同属混伪品较多,多有毒性,传统方法鉴定困难,给临床用药带来诸多隐患。

传统藏药植物药缺乏系统分类基础研究,多采

用手摸、眼看、奔闻、嘴尝、水试、火试等表观鉴定方法。藏药的使用也多依赖经验和古书记载,地区差异大,如《晶珠本草》中榜嘎为乌头属植物,《蒙药正典·美丽日饰》记载以百合科麦冬作为榜嘎的基原植物^[3],因此建立一种科学快速的藏药基原物种鉴定方法迫在眉睫。DNA 条形码在物种鉴定上具有快速、有效、操作简便、通用性强以及易于形成标准化等特点,已有广泛的研究和应用基础。本研究针对榜嘎及乌头属常见混伪品的 ITS2 和 ITS 序列进行比较分析,结果显示,ITS2 和 ITS 扩增效率无统计学意义。Blast1 和 Nearest distance 2 种分析方法上,ITS 序列鉴定效率优于 ITS2;通过 K2P 遗传距离构建 NJ 树,ITS 序列表现出更好的鉴定能力。综合分析,ITS 序列可以作为榜嘎及其混伪品鉴定的候选条形码序列。本研究为藏药材榜嘎的鉴定提供了新的分子生物学方法,可保障其临床用药安全。

参考文献

[1]李敏,雷志强,钟国跃. 藏医学药用毛茛科植物药材品种与标准的现状分析[J]. 中药新药与临床药理,2015,26(1):133-137.

[2]国家中医药管理局. 中华本草[M]. 北京:科学出版社,1996:1709-1753.

[3]中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京:科学出版社,1996:113-326.

[4]刘治民. 藏药榜嘎、榜那的资源调查和药用合理性评价[D]. 北京:北京中医药大学,2013.

[5]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.

[6]Chen Shilin,Yao Hui,Han Jianping,et al. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species[J]. PLOS ONE,2010,5(1):1-8.

[7]Li Dezhu,Gao Lianming,Li Hongtao,et al. Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer(ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences,2011,108(49):19641-19646.

[8]郑司浩,李亚康,任伟光,等. 基于 DNA 条形码的百合属分子鉴定[J]. 药学报,2014,49(12):1730-1738.

[9]朱敏,肖培根. 常用藏药榜嘎的研究[J]. 中药材,1989,12(10):19-21.

[10]孙一丁,李绍平,黄晓东,等. 乌头干药材基因组提取及 RAPD 分析[J]. 西南农业学报,2008,21(1):138-141.

[11]田孟良,田迎秋,刘帆,等. 乌头种质资源遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 四川农业大学学报,2007,25(1):63-67.

[12]周倩,高福春,马红梅,等. 新疆特产 7 种乌头类药材的 ISSR 特征分析[J]. 新疆医科大学学报,2014,37(12):1614-1618.

[13]He Jun,Wong Kalok,Shaw Pangchui,et al. Identification of the medicinal plants in Aconitum L. by DNA barcoding technique [J]. Planta Med,2010,76(14):1622-1628.