

ITS2 序列鉴定大蓟、小蓟药材及其近缘混伪品

张景景^{1,2} 祁晓婷^{1,2} 张超² 朱莉敏^{1,2} 杜康² 胡志刚^{2,3}

(1 南阳理工学院张仲景国医国药学院, 南阳, 473000; 2 湖北中医药大学药学院, 武汉, 430065;

3 湖北中医药大学詹亚华名医工作室, 武汉, 430065)

摘要 目的:应用 ITS2 序列鉴别大蓟、小蓟药材及其近缘混伪品,以保障临床用药准确。方法:收集大蓟、小蓟药材的基原物种蓟和刺儿菜及其近缘混伪品,经 DNA 提取、PCR 扩增、测序和序列拼接等步骤,获得 ITS2 序列,结合 GenBank 载序列共 14 个物种 54 条序列,用 MEGA6.0 对序列进行比对分析,计算种内种间 K2P(Kimura 2-Parameter)遗传距离,构建系统邻接(NJ)树。结果:ITS2 序列分析表明,蓟和刺儿菜种内变异位点数均远小于其与混伪品种间变异位点,以上 2 个物种种内最大(平均)K2P 距离均小于其与混伪品种间最小(平均)K2P 距离;基于 ITS2 序列的系统 NJ 树可以将蓟和刺儿菜及其近缘混伪品很好地区分开,且各物种均单独成支。结论:ITS2 序列可以很好地鉴定大蓟、小蓟药材及其近缘混伪品。

关键词 大蓟;小蓟;ITS2 序列;鉴定;近缘混伪品

Identification of *Cirsium japonicum*, *Cirsium setosum* and Their Adulterants Based on ITS2 Sequence

Zhang Jingjing^{1,2}, Qi Xiaoting^{1,2}, Zhang Chao², Zhu Limin^{1,2}, Du Kang², Hu Zhigang^{2,3}

(1 Zhang Zhong-jing Traditional Chinese Medicine College, Nanyang Institute of Technology, Nanyang 473004, China;

2 College of Pharmacy, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China; 3 Famous

Doctor's Studio of ZhanYahua, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China)

Abstract Objective: To identify *C. japonicum*, *C. setosum* and their adulterants through ITS2 Sequence method to ensure clinical medication safety. **Methods:** DNA was extracted from *C. japonicum* and *C. setosum*, which were the original plant samples of *Cirsii Japonici Herba* and *Cirsii Herba* together with their adulterant and ITS2 sequences were obtained by PCR, sequencing, and sequence assembly. Totally, 54 sequences of 14 species were downloaded from the GenBank, using MEGA 6.0 to align all sequences, calculating the intraspecific and interspecific Kimura-2-Parameter (K2P) genetic distance and constructing NJ tree. **Results:** It suggested that the intraspecific variation locis between *C. japonicum* and *C. setosum* were much less than that between adulterants. The maximum (average) intraspecific distance of *C. japonicum* and *C. setosum* was lower than the minimum (average) interspecific distance of adulterants. Based on ITS2 sequences, this identification method of NJ Tree were effective and clearly distinguished *C. japonicum* and *C. setosum* from their adulterant. Also, all species showed obvious monophyly. **Conclusion:** The sequence of ITS2 identified the herbal materials of *C. japonicum*, *C. setosum* and their Adulterants.

Key Words *Cirsium japonicum*; *Cirsium setosum*; ITS2 sequence; Identification; Adulterants

中图分类号:R282.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2016.10.052

《中华人民共和国药典》(2015 年版)记载,大蓟、小蓟药材分别为菊科蓟属(*Cirsium* Mill.)植物蓟 *Cirsium japonicum* Fisch. ex DC. 和刺儿菜 *Cirsium setosum* (Willd.) MB. 的干燥地上部分^[1],为我国常用凉血止血和祛瘀消肿药,具有重要的药用价值。蓟属植物在我国分布有 50 余种,其中 10 余种可作药用^[2],其在植物形态和药材性状方面极为相似,难以区分。大蓟和小蓟药材在我国药用历史悠久,始于《名医别录》。两者虽然外形相似,成分相近,但临床应用各有侧重,大蓟解毒疗疮作用较强,而凉血止血作用弱,小蓟凉血止血作用强,而解毒之力弱,故

应区别使用,不可混淆^[3-4]。据本草考证记载,大蓟药材除来源于同属植物外,还用了飞廉属(*Carduus* L.)植物,且中药小蓟存在多来源情况^[5-6]。目前全国各地药材市场上流通的大蓟和小蓟药材混淆现象时有发生,大蓟药材涉及菊科 3 属 13 种植物^[7-8],同属多种植物都充作小蓟药材使用,直接影响到临床用药的安全与准确。由于传统的四大鉴定方法主观性强、稳定性差、依赖专业鉴定人才,具有一定的局限性。因此,亟待建立一种快速准确的鉴定方法来区分大蓟、小蓟药材及其近缘混伪品。

基金项目:湖北省科技支撑计划(研发与示范类)(编号:2015BCA275);茯苓等 8 种湖北优势中药材 DNA 条形码分子鉴定体系构建,负责人:胡志刚

通信作者:胡志刚,博士,副教授,主要研究方向:中药资源与分子鉴定,E-mail:zghu0608@163.com

DNA 条形码(DNA barcoding)是利用基因组中一段通用的标准短序列来实现物种鉴定的新方法,具有操作简易、可重复性强、不受样品形态特征限制等优点,在生物分类学研究中得到广泛应用^[9]。陈士林^[10]等通过大样本量系统研究,建立了以 ITS2 序列为主体、psbA-trnH 序列为补充的药用植物 DNA 条形码鉴定体系,中药材 DNA 条形码分子鉴定指导原则于 2010 年已列入《中华人民共和国药典》^[11]。目前,以 ITS2 序列为代表的 DNA 条形码技术在中药材物种鉴定领域已经得到了大量验证^[12-16],并成功应用于药材市场真伪检测^[17],在中药材物种基原

鉴定方面具有广阔的应用前景。本研究运用 ITS2 序列来鉴别大蓟、小蓟药材及其近缘混伪品,为该属植物的准确鉴定提供依据。

1 材料

本研究收集大蓟、小蓟药材基原物种蓟和刺儿菜及同属混伪品共 7 个物种 20 份样品,经中国科学院武汉植物园赵子恩研究员鉴定,凭证标本保存于湖北中医药大学中药标本馆。另从 GenBank 数据库下载 34 条相关序列,所有序列经查阅文献确保其准确可靠^[18-24]。样本信息及 GenBank 下载序列信息详见表 1。

表 1 大蓟、小蓟药材及其近缘混伪品样本信息

基原物种	拉丁名	样品来源	凭证标本号	GenBank 登录号
蓟	<i>Cirsium japonicum</i>	湖北神农架 GenBank	HB0784MT05-06	KP241704, KP241703, KP241702, KM051436, KP241701, GU724278, EU592014, GQ434480, GQ434479
刺儿菜	<i>C. setosum</i> (<i>C. arvense</i> var. <i>integrifolium</i>)	湖北神农架、湖北恩施	HB0787MT01-09	GU724318, GU724276, GQ434477, KC004050, GU724277
等苞蓟	<i>C. fargesii</i>	湖北恩施	HB0782MT01-02	
刺苞蓟	<i>C. henryi</i>	湖北恩施 GenBank	HB0783MT01	AF443697
线叶蓟	<i>C. lineare</i>	湖北恩施	HB0785MT01-02	
马刺蓟	<i>C. monocephalum</i>	湖北恩施	HB0786MT01-02	
牛口蓟	<i>C. shansiense</i>	湖北恩施	HB0788MT01-02	
翼蓟	<i>C. vulgare</i>	GenBank		KT249792, JX867640
丝路蓟	<i>C. arvense</i>	GenBank		KT249782, JX867624
烟管蓟	<i>C. pendulum</i>	GenBank		JX274255, JX274259
丝毛飞廉	<i>Carduus crispus</i>	GenBank		KT249746, KT249749, KT249751
节毛飞廉	<i>Carduus acanthoides</i>	GenBank		JX867641, KT249745, KT249741
苣荬菜	<i>Sonchus arvensis</i>	GenBank		L48308, DQ507957, DQ507958, HQ161952
花叶滇苦菜	<i>Sonchus asper</i>	GenBank		KT249862, KT249859, KT249856

2 方法

2.1 DNA 提取 取干燥叶片经 75% 乙醇擦拭表面后称取 30 mg,用球磨仪(Retsch MM400, Germany)研磨 2 min(30 Hz),采用改良的 CTAB 法提取实验样品总 DNA。

2.2 PCR 扩增及测序 ITS2 通用引物:正向引物 ITS2-P3:5'-YGACTCTCGCAACGGATA-3',反向引物 ITS2-E4:5'-RGTTCCTTTCCTCCGCTTA-3';反应体系:2 × Taq PCR Master Mix 12.5 μL,正反向引物(2.5 μmol · L⁻¹)各 1.0 μL,总 DNA 2 μL,加 ddH₂O 至 25 μL;扩增程序:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,56 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 45 s,进行 40 个循环;72 °C 延伸 10 min^[11]。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测,选择条带单一且清晰的产物进行双向测序。

2.3 数据处理 测序所得峰图采用 CondonCode Aligner V4.2.4(CondonCode Co., USA)软件进行校对

拼接,基于隐马尔可夫模型的 HMMer 注释方法,去除 5.8S 端和 28S 端,获得 ITS2 间隔区序列^[25]。使用软件 MEGA(Molecular Evolutionary Genetics Analysis)6.0 进行序列变异分析,计算种内种间 K2P(Kimura2-Parameter)遗传距离,构建系统邻接(Neighbor Joining, NJ)树。

3 结果与分析

3.1 序列变异分析 大蓟药材基原物种蓟共获得 11 条 ITS2 序列,序列比对后长度为 227 bp,有 3 个单倍型,产生 2 个变异位点。见表 2;小蓟药材基原物种刺儿菜共有 14 条 ITS2 序列,序列比对后长度为 228 bp,未产生变异位点;蓟属 10 个物种共 41 条 ITS2 序列,序列比对后长度为 231 bp,共产生 40 个变异位点;蓟属及其混伪品 14 个物种共 54 条序列,序列比对后长度为 222 bp,共产生 99 个变异位点,远多于以上蓟属物种种间变异位点数(40 个)。

表 2 大蓟药材基原物种蓟 ITS2 序列变异位点

单倍型	59 bp	185 bp
A1(7)	G	C
A2(1)	*	T
A3(3)	A	C

注:括号中数字代表单倍型序列条数,“*”表示与第一行碱基相同。

3.2 遗传距离分析 应用 MEGA6.0 分析大蓟、小蓟药材及其混伪品的种内种间 K2P 距离,结果见表 3。由结果可知,大蓟药材最大 K2P 距离(0.009)小于其与混伪品的最小 K2P 距离(0.019),平均 K2P 距离(0.003)小于其与混伪品的种间平均 K2P 距离(0.112);小蓟药材最大 K2P 距离(0.000)小于其与混伪品的最小 K2P 距离(0.059),平均 K2P 距离(0.000)小于其与混伪品的种间平均 K2P 距离(0.139),这说明 K2P 距离可很好地区分开大蓟、小蓟药材及其混伪品。

表 3 大蓟、小蓟药材及其混伪品 K2P 距离

类别	最大 K2P 距离	最小 K2P 距离	平均 K2P 距离
大蓟药材	0.009	0.000	0.003
大蓟药材与混伪品	0.430	0.019	0.112
小蓟药材	0.000	0.000	0.000
小蓟药材与混伪品	0.419	0.059	0.139

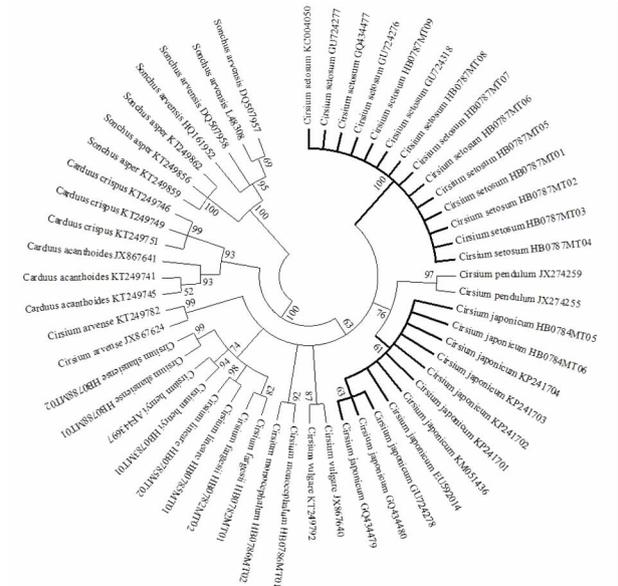


图 1 基于 ITS2 序列构建的大蓟、小蓟药材及其近缘混伪品 NJ 树图

注:Bootstrap 1000 次重复,枝上数值仅显示自展支持率 ≥50%。

3.3 系统聚类分析 基于 ITS2 序列构建的大蓟、小蓟药材及其混伪品的系统 NJ 树见图 1。从 NJ 树可知,大蓟药材基原物种蓟 11 条序列单独聚为一小

支,与烟管蓟聚成的一小支共同聚在一大支上,支持率为 76%,说明两者的亲缘关系很近;小蓟药材基原物种刺儿菜 14 条序列单独聚为一支,支持率为 100%;同时其余所有近缘混伪品也各自聚为一支,均能很好地区分开。

4 讨论

近年来,中药材市场快速发展,药材掺伪现象屡有发生,为中医用药安全带来隐患。大蓟、小蓟药材因其混伪品主要来自于同科或同属植物,极易产生药材混用情况。中药材的准确鉴定直接影响到临床用药的有效性和安全性,故应选择准确有效的方法以鉴定大蓟和小蓟药材。由于传统的鉴别方法鉴定困难,而 DNA 条形码技术抛开了植物形态及药材性状上的假象,摆脱了传统鉴定方法依赖专业鉴定人才的障碍,故本研究采用了该技术以鉴定大蓟、小蓟药材及其近缘混伪品。

ITS2 序列变异结果可知,大蓟、小蓟药材种内变异位点数(2 个和 0 个)远小于其与混伪品的种间变异,蓟属物种种间变异位点数(40 个)远小于该属物种与其近缘混伪品种间变异位点数(99 个),此结果与物种分类学的结论相吻合。K2P 距离分析结果表明,大蓟和小蓟药材及其混伪品的种内最大(平均)K2P 距离均小于其各自与混伪品的种间最小(平均)K2P 距离,说明 K2P 距离可将以上 2 种药材及其混伪品很好地区分开。基于 ITS2 序列构建的系统 NJ 树可知,大蓟和小蓟药材均单独成支,显示良好的单系性,且其余各物种均单独聚为一支。NJ 树结果表明,ITS2 序列不仅能很好地区分大蓟和小蓟药材,且对本研究涉及的相关近缘混伪品均具有较好的鉴定效果。

本研究结果表明,ITS2 序列可以很好地鉴定大蓟、小蓟药材及其近缘混伪品,为这 2 种药材的临床用药安全提供了可行的物种基原鉴定技术,且从基因水平上为蓟属及近缘物种的分子鉴定分类系统研究及资源开发利用奠定了基础。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京:中国医药科技出版社,2015:25,48-49.

[2] 张鹏云,张耀中. 中国植物志[M]. 北京:科学出版社,2004.

[3] 魏彦,邱乃英,欧阳青. 大蓟、小蓟的鉴别与临床应用[J]. 北京中医杂志,2002,21(5):296-297.

[4] 倪晓霓. 大蓟与小蓟的研究现状及展望[J]. 时珍国医国药,2005,16(6):548-549.

[5] 李媛. 大蓟及其混伪品鉴别[J]. 时珍国医国药,2000,11(8):711.

- [6] 金延明,李胜华,楼之岑. 大蓟与小蓟品种的本草考证[J]. 中药材,1995,18(3):152-154.
- [7] 吴蜀星,李治昊,宋良科,等. 大蓟的基源调查与鉴定[J]. 现代中药研究与实践,2013,27(1):21-23.
- [8] 金延明,李胜华,楼之岑. 中药大蓟和小蓟植物资源调查[J]. 中国中药杂志,1994,19(12):710-711.
- [9] 陈士林,庞晓慧,姚辉,等. 中药 DNA 条形码鉴定体系及研究方向[J]. 世界科学技术-中医药现代化,2011,13(5):747-754.
- [10] Chen S L, Yao H, Han J P, et al. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plants species [J]. PLoS ONE,2010,5(1):e8613.
- [11] 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.
- [12] 郭力城,胡志刚,涂媛,等. 基于 ITS2 序列鉴定中药材金沸草、旋覆花及其近缘混伪品[J]. 世界科学技术-中医药现代化,2014,16(2):307-312.
- [13] 辛天怡,姚辉,罗焜,等. 羌活药材 ITS/ITS2 条形码鉴定及其稳定性与准确性研究[J]. 药学学报,2012,47(8):1098-1105.
- [14] 熊超,周红,贺海波,等. 基于 ITS2 序列鉴定谷物芽类药材及其混伪品[J]. 世界科学技术-中医药现代化,2014,16(11):2343-2348.
- [15] 明孟碟,张超,严绪华,等. ITS2 序列鉴定十大功劳属药用植物[J]. 中国现代中药,2015,17(10):993-1003.
- [16] 魏蒙,邹兰,涂媛,等. 基于 ITS2 序列鉴别牡丹皮药材及其混伪品[J]. 中国中药杂志,2014,39(12):2180-2183.
- [17] Han, J. et al. An authenticity survey of herbal medicines from markets in China using DNA barcoding[J]. Sci. Rep. 2016,6,18723.
- [18] Kelch D G, Baldwin B G. Phylogeny and ecological radiation of New World thistles (Cirsium, Cardueae-Compositae) based on ITS and ETS rDNA sequence data[J]. Mol Ecol,2003,12(1):141-151.
- [19] Choi Y J, Thines M. Host Jumps and Radiation, Not Co-Divergence Drives Diversification of Obligate Pathogens. A Case Study in Downy Mildews and Asteraceae[J]. PLoS ONE,2015,10(7):E0133655.
- [20] Boto Slotta T A, Horvath D P, Foley M E. Phylogeny of Cirsium spp. In North America: Implications for Biological Control [J]. Plants, 2012,1(2):61-73.
- [21] Chen S, Yao H, Han J, et al. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species [J]. PLoS ONE,2010,5(1):E8613.
- [22] Gao T, Yao H, Song J, et al. Evaluating the feasibility of using candidate DNA barcodes in discriminating species of the large Asteraceae family [J]. BMC Evol Biol,2010,10:324.
- [23] Kim S C, Crawford D J, Francisco-Ortega J, et al. A common origin for woody Sonchus and five related genera in the Macaronesian islands: molecular evidence for extensive radiation [J]. Proc Natl Acad Sci USA,1996,93(15):7743-7748.
- [24] Kim S C, Chunghee L, Mejias J A. Phylogenetic analysis of chloroplast DNA matK gene and ITS of nrDNA sequences reveals polyphyly of the genus Sonchus and new relationships among the subtribe Sonchinae (Asteraceae:Cichorieae) [J]. Mol Phylogenet Evol,2007,44(2):578-597.
- [25] Keller A, Schleicher T, Schultz J, et al. 5S-28S rRNA interaction and HMM-based ITS2 annotation [J]. Gene,2009,430(1/2):50-57.

(2016-04-12 收稿 责任编辑:洪志强)

(上接第 2125 页)

- [10] 蒋淑云,李红,蒋孟良,等. 七厘散凝胶剂中血竭素含量的 HPLC 测定[J]. 中国药师,2016,19(3):589-591.
- [11] 邵艳秋,杜昌文,申亚珍,等. 基于中红外衰减全反射光谱的氮同位素标记硝态氮的快速测定[J]. 分析化学,2014,16(5):745-752.
- [12] 秦建平,李家春,吴建雄,等. 基于 UPLC 结合化学计量学方法的龙血竭指纹图谱研究[J]. 中国中药杂志,2015,40(6):1114-1118.
- [13] 易珍奎. 傅里叶变换近红外漫反射光谱法结合化学计量学技术高通量分析草麻黄药材的方法学研究[D]. 重庆:重庆医科大学,2012.
- [14] 王钢力,聂黎行,张继,等. 应用近红外光谱技术鉴别红参药材[J]. 中草药,2008,39(3):438-440.
- [15] 吴利敏. 近红外光谱法快速检测某些中药及中成药品质的应用研究[D]. 重庆:西南大学,2013.
- [16] 王宁,武卫红. 近红外光谱技术在中药分析领域中的应用[J]. 山东中医药大学学报,2007,7(4):350-353.
- [17] 邱雁. 漫反射光谱的理论与应用研究[D]. 上海:同济大学,2007.
- [18] 饶伟文,钟建理,张治军. 中药近红外鉴别法的初步研究[J]. 首都医药,2009,16(20):54-56.
- [19] 刘杰,杨瑶璐,王文祎,等. 基于电子鼻技术的国产血竭与进口血竭快速鉴别研究[J]. 世界中医药,2015,10(4):583-585,589.
- [20] 汤小燕,陈越,李炯. HPLC 测定神农镇痛膏中血竭素的含量[J]. 中国执业药师,2014(4):14-16.
- [21] 徐玉玲,梁慧,凌娅,等. 龙血竭 HPLC 指纹图谱研究[J]. 成都大学学报:自然科学版,2014,33(1):1-3.

(2015-10-06 收稿 责任编辑:洪志强)