

韩晓伟,曹楸伟,严玉平,等. 基于 ITS2 的北沙参药材及其伪品的分子鉴定[J]. 江苏农业科学,2019,47(17):71-75.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.17.017

基于 ITS2 的北沙参药材及其伪品的分子鉴定

韩晓伟¹, 曹楸伟², 严玉平¹, 刘 钊¹, 王 乾¹, 郑玉光¹

(1. 河北中医学院,河北石家庄 050200; 2. 河北沧州中西医结合医院,河北沧州 061001)

摘要:利用内部转录间隔区 2(ITS2)条形码来鉴定河北某药材市场北沙参的真伪品,探讨分子方法鉴定北沙参药材真伪品的可行性。提取 12 份北沙参样品的 DNA,利用 ITS2 引物进行 PCR 扩增,对扩增产物进行双向测序,利用 CodonCode Aligner 软件进行序列拼接。从 Genbank 下载 13 条北沙参序列,利用 MEGA 6.0 分析比对 25 份序列,计算其种间、种内的 Kimura 双参数遗传距离(K2P 距离)以及各序列的变异位点并进行聚类分析,利用 RNA 多重排列(locARNA)来预测北沙参及其伪品的二级结构。12 份样品中 10 份为北沙参,1 份为川明参,1 份为祁木香。ITS2 序列可以较好地地区分北沙参及其伪品,可作为北沙参鉴定的有效方法而加以推广。北沙参的 DNA 条形码鉴定体系的建立,为 DNA 条形码技术在临床及市场监管领域的实践应用提供了理论基础。

关键词:北沙参;真伪品;ITS2;DNA 条形码;临床用药

中图分类号: R282.710.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)17-0071-05

北沙参(*Glehnia littoralis*)为伞形科珊瑚菜的干燥根,为我国常用大宗中药材之一,临床上主要用于治疗肺燥干咳、热病伤津等症^[1]。北沙参主产于河北安国、山东莱阳、内蒙赤峰等地^[2],其中河北安国产北沙参为安国八大祁药之一,以其条粗顺直,无权无须,被誉为“一柱香”,《神农本草经》列其为上品。北沙参作为药食两用的药材,受到广大消费者喜爱,但是由于市场上常有許多北沙参的混伪品作北沙参来用,因此易产生混淆,从而对临床用药安全造成威胁。

一直以来利用理化性质对北沙参进行鉴定是主要的鉴定方式^[3-6],而 DNA 条形码鉴定技术的发展为中药材的鉴定提供了新的工具。陈士林等提出以内部转录间隔区 2(ITS2)作为药用植物鉴定的通用序列并在中药材鉴定方面进行了大量尝试^[7-8]。目前已有利用 ITS2 对北沙参进行鉴定的报道^[9-10],这些研究主要关注药材原植物的鉴别或原植物与药材的混合鉴别。本研究是利用 ITS2 的序列,对河北某中药材市场的北沙参药材进行检测,为 DNA 条形码技术应用于药材市场的监管和临床用药的安全提供理论和实践的基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

12 份北沙参药材的样品全部购自河北某药材市场,经河北中医学院郑玉光教授鉴定,凭证样本保存于河北中医学院药学院,其余 13 个样本来源于 GenBank,样品来源见表 1。

收稿日期:2018-05-25

基金项目:河北省中医药管理局科研计划(编号:2018107);河北中医学院国家级大学生创新创业项目(编号:201714432006);河北省二期现代农业产业技术体系创新团队项目(编号:HBCT2018060205)。

作者简介:韩晓伟(1978—),女,河北正定人,博士,讲师,主要从事植物系统发育和抗逆生理研究。E-mail:hanxiaowei2015@126.com。
通信作者:郑玉光,硕士,教授,主要从事中药质量标准研究。
E-mail:zyg314@163.com。

表 1 样品来源信息

编号	样品	药材来源	凭证样本号	GenBank 登录号
1	北沙参	河北省安国市	AG201701	MG793241
2	北沙参	河北省安国市	AG201702	MG793242
3	北沙参	河北省安国市	AG201703	MG793243
4	北沙参	河北省安国市	AG201704	MG793244
5	北沙参	河北省安国市	AG201705	MG793245
6	北沙参	河北省安国市	AG201706	MG793246
7	北沙参	河北省安国市	AG201707	MG793247
8	北沙参	河北省安国市	AG201708	MG793248
9	北沙参	内蒙古自治区赤峰市	AG201709	MG793249
10	北沙参	甘肃省岷县	GS201710	MG793250
11	川明参	四川省成都市	SC201711	MG793251
12	祁木香	河北省安国市	AG201712	MG793252
13	北沙参	GenBank		KF010586
14	北沙参	GenBank		KF010587
15	北沙参	GenBank		KF010588
16	轮叶沙参	GenBank		KM191311
17	轮叶沙参	GenBank		KM191312
18	轮叶沙参	GenBank		KM191313
19	轮叶沙参	GenBank		KM191314
20	轮叶沙参	GenBank		KM191315
21	沙参	GenBank		KM191316
22	沙参	GenBank		KM191317
23	沙参	GenBank		KM191318
24	沙参	GenBank		KM191319
25	沙参	GenBank		KM191320

1.2 试验设计

1.2.1 仪器与试剂 Taq 酶[宝日医生物技术(北京)有限公司];PCR 仪及凝胶成像系统[伯乐生命医学产品(上海)有限公司];核酸电泳仪(北京六一生物科技有限公司);离心机(Eppendorf 中国);胶回收试剂盒(北京全式金生物技术有限公司);其他均为进口分装或国产分析纯试剂。引物由上海

英骏生物技术有限公司合成,测序工作由华大基因完成。

1.2.2 DNA 提取、PCR 扩增和测序 提取北沙参干燥根的基因组 DNA,利用通用引物 ITS2 对所提取的 DNA 进行 PCR 扩增,引物序列如下:

ITS2F:5'-ATGCGATA-CTTGGTGTGAAT-3';
ITS2R:5'-GACGCTTCTCC-AGACTACAAT-3'。

扩增反应体系为 50 μL。反应体系按照韩晓伟等的方法^[11]配制,PCR 完成后利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测结果,每份样品 30 μL PCR 产物直接送深圳华大基因公司北京测序部进行测序。每份样品均进行 3 次生物学重复。

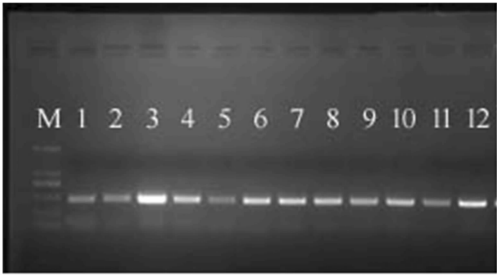
1.2.3 数据处理 数据处理方法按照韩晓伟等的数据处理方式进行^[11]。二级结构预测利用 RNA 多重排列 (locARNA) 方式进行。

1.2.4 试验时间和地点 试验时间为 2017 年,试验地点为河北中医学院橘泉校区科研楼。

2 结果与分析

2.1 北沙参样品 DNA 提取和 PCR 扩增结果

提取出 12 份样品的 DNA 后,利用 ITS2 引物进行 PCR 扩增,用琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,12 份样品均能扩出单一明亮的条带 (图 1),随后将扩增的产物测序。



M—DNA 标记; 1~9—AG201701~201709; 10—GS201710; 11—SC201711; 12—AG201712

图1 北沙参样品 PCR 产物电泳结果

2.2 序列的比对与提交

将扩增的 12 份样品的 ITS2 序列经 CodonCode Aligner 软件校对拼接后,在 NCBI 网站上进行 BLAST 比对,结果发现 12 份样品中有 10 份为北沙参,1 份为川明参,1 份是祁木香。重新进行取样,提取 DNA 后扩增测序,结果相同。这说明北沙参药材中混入了其他品种。将 12 条序列提交到 GenBank 数据库并获得了登录号 (表 1)。

2.3 北沙参样品序列的分析

北沙参样品的 ITS2 序列长度约为 227 bp,在确定的 10 份北沙参样品中,MG793244 有 15 个变异位点,MG793246 和 MG793247 序列相同,有 6 个变异位点,说明北沙参存在较明显的种间变异 (图 2)。而 MG793249 川明参与北沙参的序列差别较大,表明二者从遗传组成上是有差别的,不可混用。MG793252 祁木香的序列与北沙参基本不同。

2.4 北沙参及其混伪品的种内种间遗传距离分析

基于 K2P 模型计算北沙参与其混伪品的 K2P 距离,北沙参种内 K2P 遗传距离平均为 0.002,种内最大 K2P 遗传距离为 0.004。北沙参与其混伪品的种间遗传距离最小为 0.028,远远大于北沙参的种内最大遗传距离,表明 ITS2 能够准确区

分北沙参及其混伪品 (表 2)。

表 2 北沙参及其混伪品的种内种间遗传距离分析

关系	K2P 距离范围	平均 K2P 距离
北沙参种内	0.000 ~ 0.004	0.002
北沙参及其混伪品的种间	0.028 ~ 0.446	0.226

2.5 北沙参及其混伪品的聚类分析

基于得到的 12 条 ITS2 序列,然后从 GenBank 下载 13 条序列,利用邻接法 (NJ 法) 构建系统聚类树。可以看出, MG793241 ~ MG793243、MG793245、MG793248 ~ MG793250 共 7 条序列与 GenBank 下载的北沙参的序列 (KF010586 ~ KF010588) 聚为 1 支。MG793246 和 MG793247 因为与北沙参的种间变异较多而单独聚为 1 支, MG793244 也因为与北沙参的种间变异较多而单独聚为 1 支,这 3 个样品的外形与北沙参无异,但因为种间变异数较多,是否会影响药效,须要作更深一步研究。从 GenBank 下载的 KM191311 ~ KM191315 均为轮叶沙参,因此聚为 1 支, KM191316 ~ KM191320 均为沙参,因此聚为 1 支。祁木香 MG793252 与川明参聚为 1 支,说明祁木香与川明参有相似之处 (图 3)。

2.6 北沙参及其混伪品的二级结构比较

利用 locARNA 方式对北沙参及其混伪品的 ITS2 进行二级结构预测,图 4 表明,北沙参与川明参和轮叶沙参的二级结构存在较大差异,能够很明显的区分。祁木香的主环结构与北沙参相似,但其茎环结构与北沙参相差较大,区别也较明显 (图 4)。由此可以看出,利用二级结构也能够很好地区别北沙参及其混伪品。

3 讨论与结论

我国中药材资源丰富,种类繁多,但是在药材流通市场上仍然有掺杂使假现象发生。《中国药典》(2015 版)中对北沙参的鉴别方法有物理和化学 2 种方法,但是这 2 种方法已经不能满足市场对药材鉴别方法的需要^[12]。DNA 条形码技术的发展为中药材的鉴定提供了全新的技术手段,已经被《中国药典》中部分中药列为药材鉴定的方法之一。本研究说明了利用 DNA 条形码技术鉴定北沙参药材的可行性。

在利用 DNA 条形码技术鉴定北沙参药材的过程中,选择了不同产地的北沙参,结果发现河北安国产的北沙参中有种内变异的情况。将发生种内变异的 MG793244、MG793246、MG793247 3 个样品重新提取 DNA,PCR 后送测序,结果与先前相同,说明确实发生了种内变异,但该变异属于无害的变异,并未影响到北沙参的性状。

由于对干燥坚硬的北沙参药材进行 DNA 提取,因此在提取过程中进行了多种方法的试验^[13],通过钢珠振动将北沙参药材研磨得尽量细碎,同时通过延长 DNA 提取时间使干燥细胞充分裂解,从而提高所得 DNA 的浓度,保证后续 PCR 的效果。本试验中的 12 份样品均可扩增出单一明亮条带,基于 K2P 距离建立的 NJ 树以及二级结构的预测都能够很好地将北沙参及其伪品区分开来。12 份市场药材中正品 10 份,伪品 1 份,祁木香为阴性对照,正品率为 83.3%。虽然在 12 份样品中只有 1 份川明参,但是因为川明参和北沙参的功效是不同的,因此,如果误将川明参作北沙参入药,仍会给临床用

25 227

[illegible]

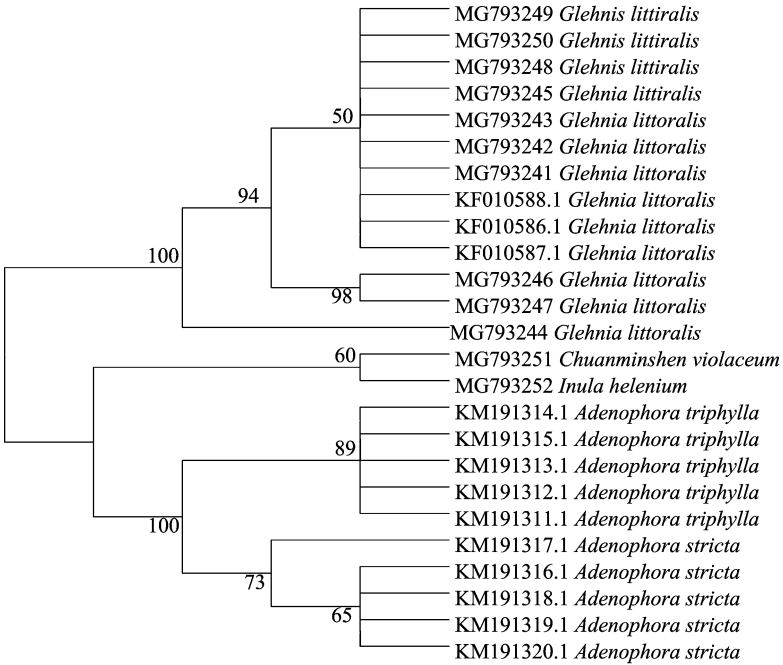
图2 北沙参及其混伪品种内、种间序列比对结果

药带来隐患。因此,中药材市场仍须净化以保证临床用药安全。

综上所述,DNA 条形码技术能够准确地鉴别北沙参及其伪品,本试验所鉴定的 12 份样品的结果与药材鉴定专家的鉴定结果一致,说明 DNA 条形码技术是安全、高效的药材鉴定技术,在中药材流通及市场监管中有很大的应用推广价值。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010.
- [2] 李忠祥,王育莹,原 忠. 北沙参及易混品的 ITS2 分子鉴定[J]. 沈阳药科大学学报,2013,30(10):803-806.



各分支置信度(bootstrap)设 1 000 次重复

图3 基于 ITS 序列构建北沙参及其混伪品 NJ 树

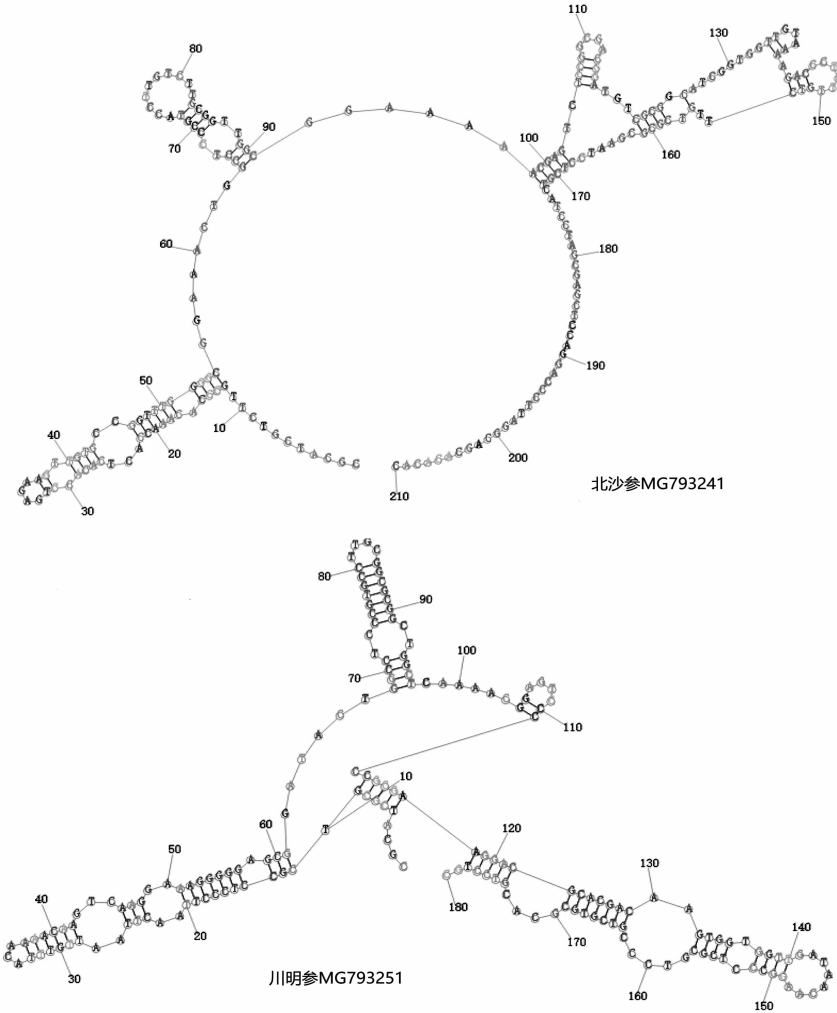


图4 北沙参及其混伪品 ITS2 二级结构

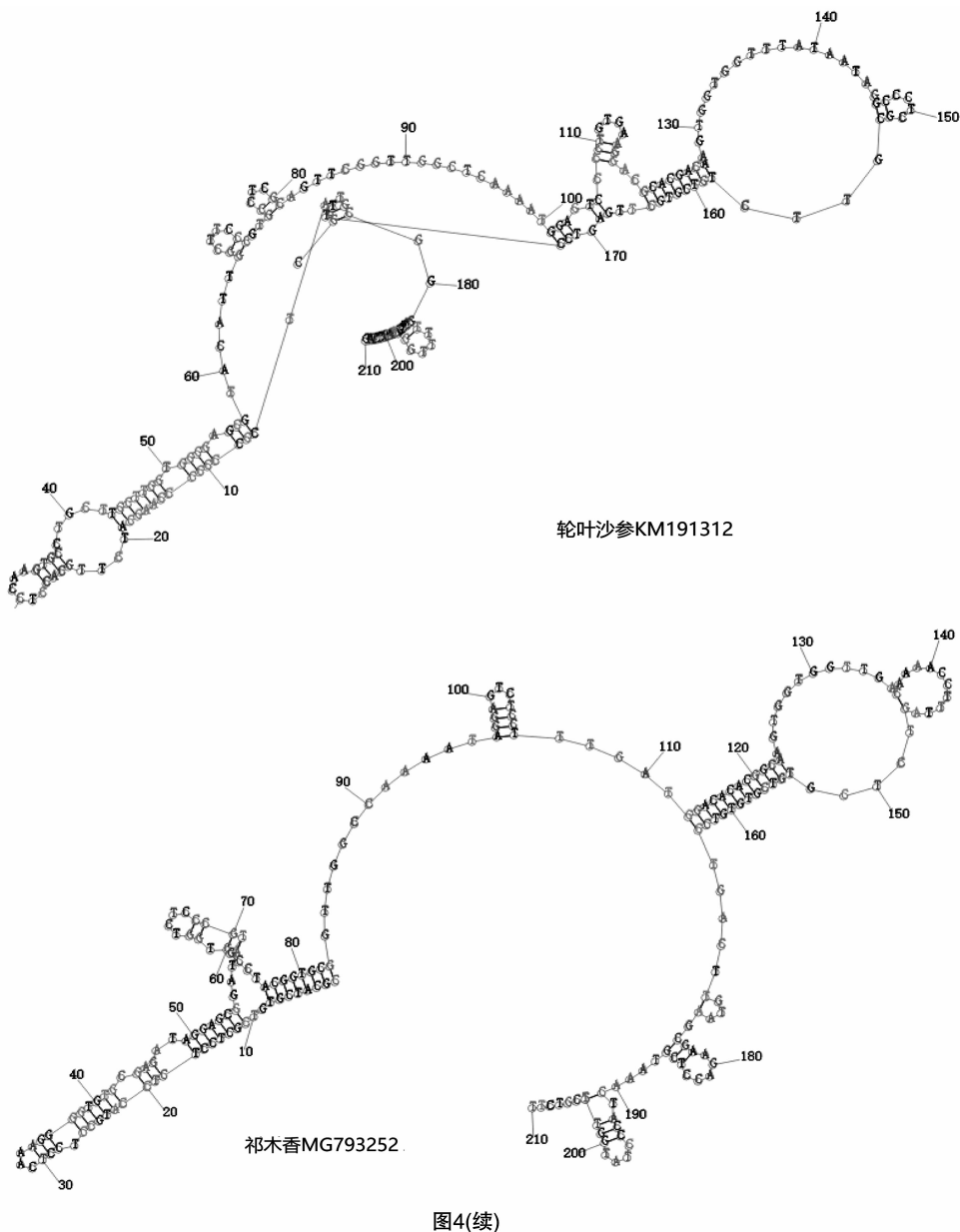


图4(续)

- [3]刘 伟,李中燕,田 艳,等. 北沙参的化学成分及药理作用研究进展[J]. 国际药学研究杂志,2013,40(3):291-294.
- [4]杨成俊. 北沙参及其6种混淆品的鉴别[J]. 安徽农业科学,2012,40(31):15189-15190.
- [5]杨飞飞,郭怀忠,王晓欢,等. 采用寡糖CZE指纹图谱鉴定北沙参和南沙参[J]. 中南药学,2015,13(5):455-457.
- [6]杨 维,冯 超,郑旭光,等. 液质联用同时测定北沙参中15种主要化学成分[C]// 药用植物化学与中药有效成分分析研讨会,2008.
- [7]陈士林. 中药DNA条形码分子鉴定[M]. 北京:人民卫生出版社,2012.
- [8]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.
- [9]张改霞,金 钺,贾 静,等. 中药材北沙参种子DNA条形码鉴定研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化,2016,18(2):179-183.
- [10]Zhu X Z, Zhang Y X, Liu X, et al. Authentication of commercial processed *Glehniae Radix* (Beishashen) by DNA barcodes[J]. Chinese Medicine, 2015, 10:35.
- [11]韩晓伟,严玉平,吴兰芳,等. 柴胡及其伪品的DNA条形码鉴定研究[J]. 中草药,2016,47(9):1583-1588.
- [12]刘美子,宋经文,罗 焜,等. DNA条形码序列对9种葛属药用植物的鉴定[J]. 中草药,2012,43(7):1393-1397.
- [13]南晓洁,郝媛媛,赵良贵,等. 柴胡药材干根DNA提取及RAPD分析[J]. 中草药,2009,40(3):447-451.