

基于 ITS2 序列的丹参及其混伪品分子鉴定研究

张萍¹, 黎先军², 杜微波¹, 陈敬然¹, 付静¹, 张志强¹, 沈建梅^{1*}

(1. 北京康仁堂药业有限公司, 北京 101301; 2. 天津红日药业股份有限公司, 天津 301700)

摘要 [目的]采用 DNA 条形码及特异性引物 PCR 技术对中药材丹参及其混伪品进行分子鉴定研究。[方法]以核基因 ITS2 序列作为 DNA 条形码, 对研究材料进行 PCR 扩增并双向测序, 将所得序列构建 NJ 系统发育树。利用 Koetschan 等建立的 ITS2 数据库及其网站预测 ITS2 二级结构, 同时采用自设引物进行特异性引物 PCR 鉴别研究。[结果]ITS2 序列长度为 470 bp 左右; 从系统聚类树图可以看出, 丹参及其伪品分别聚在不同支, 表现出单系性; 比较二级结构发现, 丹参与甘西鼠尾差异甚微, 与牛蒡在螺旋茎环的数目、大小、位置以及螺旋臂由中心环伸出时的转角等方面具有明显区别; 通过特异性引物 PCR 技术可将丹参及其伪品进行区分。[结论]DNA 条形码技术和特异性引物 PCR 技术均能够有效地区别丹参及其混伪品, 在中药材的鉴定中具有重要的应用前景。

关键词 丹参; DNA 条形码; 二级结构; PCR 技术

中图分类号 R 282.5 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2017)30-0122-03

Molecular Identification of *Salvia Miltiorrhiza* Bge. and Its Adulterants Based on ITS2 Sequences

ZHANG Ping¹, LI Xian-jun², DU Wei-bo¹, SHEN Jian-mei^{1*} et al (1. Beijing Tcmages Pharmaceutical Co. Ltd., Beijing 101301; 2. Tianjin Chsse Sun Pharmaceutical. Co. Ltd., Tianjin 301700)

Abstract [Objective] The research aimed to study the molecular identification of *Salvia miltiorrhiza* and its adulterants by DNA barcode and specific primers PCR. [Method] The ITS2 sequence was used as DNA barcoding, and the materials were amplified by PCR and sequenced, and the NJ phylogenetic tree was constructed. The secondary structure of ITS2 was predicted by database established and its website by Koetschan et al., and the self-designed primers were used to carry out specific primer PCR identification. [Result] ITS2 sequence length was around 470 bp. The results of cluster analysis showed that *Salvia miltiorrhiza* and its adulterants were clustered in different branches and showed single character. Compared with secondary structure, *Salvia miltiorrhiza* and Ganxi rat tail had little difference, and there were significant difference on the number, size, location of burdock in the spiral stem, and the rotation angle of the spiral arm from the central ring with burdock. The specific primers could distinguish the *Salvia miltiorrhiza* and its counterfeit by PCR technique. [Conclusion] DNA barcoding and specific primers PCR are effective in distinguishing *Salvia miltiorrhiza* and its adulterants, and it has an important application foreground in the identification of Chinese herbal medicines.

Key words *Salvia Miltiorrhiza* Bge.; DNA barcoding; Secondary structure; PCR technique

丹参在 2015 年版《中国药典》一部中记载为唇形科植物丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bge.) 的干燥根和根茎, 是我国传统中药, 具有活血祛瘀、通经止痛、凉血消痈等功效^[1]。目前丹参的主产区主要集中于山东日照、陕西商洛、四川中江、河南内乡等地, 多数为栽培品种, 采用野生驯化、种子繁殖、根段无性繁殖等方式保存种质资源^[2]。丹参作为我国十大常用大宗药材之一, 在临床应用上已有 2 000 多年的历史, 由于其对心血管疾病有显著疗效, 且具有抗凝、促纤溶、扩血管、改善微循环、清除自由基、保护线粒体等广泛的药理作用, 其需求量正在逐年增大^[3]。但是中药品种繁多、真伪混杂, 有不少商贩趁机掺假、造假现象屡见不鲜。因此, 在保证药材质量及临床有效性的同时, 建立一种科学、可靠、方便的鉴定方法成为当务之急^[4]。

DNA 条形码作为分子标记的最新发展, 近年来逐渐应用于中药的分类和鉴定研究^[5]。DNA 序列信息可为系统学研究提供大量可靠的信息数据, 并且其分析结果可对现存的分类学结果进行验证。DNA 条形码技术具有特异性强、微量、便捷、准确等特点, 从分子水平对中药材的真伪进行鉴定^[6-7]。陈士林^[5]经过十余年的潜心研究提出以 ITS2 序列为主、psbA - tmH 序列为辅的鉴定体系。ITS2 序列是去除

5.8 S rRNA 序列和 28 S rRNA 序列的核糖体 DNA 序列间隔区, 可以鉴定大多数植物类药材及其易混品种^[8-10]。该研究利用 ITS2 序列对丹参原植物及其同属混伪品进行 DNA 条形码鉴别研究, 同时采用特异性引物 PCR 技术对其进行真伪鉴别, 以期为该药材在分子水平的鉴别研究提供试验数据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试材。材料来源见表 1, 包括试验样品及来自 Genbank 下载序列。

1.1.2 试剂。植物 DNA 提取试剂盒购自北京艾德莱生物科技有限公司; 琼脂糖 (Biowest) 购自青岛秀佰锐生物器材有限公司; Gene 核酸染料、2 * Taq PCR Mixture、Marker 均购自天根生化科技有限公司; 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成; 其余试剂均为分析纯。

1.1.3 仪器。ProFlex 型梯度 PCR 扩增仪 (Applied Biosystem 公司), THZ-82 型双数显旋转水浴振荡器 (金坛市城东新瑞仪器厂), JS-680D 型凝胶成像仪 (上海培清科技有限公司), MBE-150 型电泳仪 (美国 MS), Micro 21R 台式高速低温离心机 (美国 Thermo)。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取。样品根使用 70% 乙醇擦洗表面后晾干, 用冷冻研磨仪 60 Hz 研磨 90 s, 研磨 2 次, 称取 20 mg, 使用稍作修改的北京艾德莱生物科技有限公司生产的新型植物基

作者简介 张萍 (1989—), 女, 满族, 黑龙江宁安人, 硕士, 从事中药材的鉴定与质量评价研究。* 通讯作者, 工程师, 硕士, 从事中药材的鉴定与质量评价研究。

收稿日期 2017-08-31

因组 DNA 快速提取试剂盒提取总 DNA。

表 1 材料来源
Table 1 Material sources

编号 No.	材料 Materials	拉丁学名 Latin name	标本号 Specimen number	GenBank 登录号 GenBank accession number
D1	丹参	<i>Salvia miltiorrhiza</i> Bge.	—	—
D2	丹参	<i>Salvia miltiorrhiza</i> Bge.	—	—
D3	丹参	<i>Salvia miltiorrhiza</i> Bge.	160403117	—
D4	丹参	<i>Salvia miltiorrhiza</i> Bge.	160401117	—
D5	丹参	<i>Salvia miltiorrhiza</i> Bge.	160401117	—
D6	丹参	<i>Salvia miltiorrhiza</i> Bge.	160402117	—
D7	丹参	<i>Salvia miltiorrhiza</i> Bge.	160403117	—
D8	丹参	<i>Salvia miltiorrhiza</i> Bge.	160404117	—
D9	丹参	<i>Salvia miltiorrhiza</i> Bge.	160405117	—
D10	丹参	<i>Salvia miltiorrhiza</i> Bge.	—	—
D11	丹参	<i>Salvia miltiorrhiza</i> Bge.	120923 - 201113	—
G1	甘西鼠尾	<i>Salvia przewalskii</i> Maxim.	—	—
G2	甘西鼠尾	<i>Salvia przewalskii</i>	—	FJ883526.1
G3	甘西鼠尾	<i>Salvia przewalskii</i>	—	KC473272.1
N1	牛蒡	<i>Arctium lappa</i>	—	—
N2	牛蒡	<i>Arctium lappa</i>	—	FJ440323.1
N3	牛蒡	<i>Arctium lappa</i>	—	FJ528300.1
N4	牛蒡	<i>Arctium lappa</i>	—	AF319102.1

1.2.2 PCR 扩增及测序。 ITS2 通用引物序列上游 5' AT-GCGATACTTGGTGTGAAT - 3'、下游 5' GACGCTTCTC-CAGACTACAAT - 3'，特异性引物序列上游 5' CG-CATCGCGTGCAGCC - 3'、下游 5' CGGTCCAAGGTT-GGGCGCC - 3'，总反应体系 25 μ L，包括 12.5 μ L 2 * Taq PCR Mixture、1.0 μ L DNA 模版、9.5 μ L ddH₂O、10 μ mol/L 上游和下游引物各 1.0 μ L。反应在 ProFlex 型梯度 PCR 扩增仪上进行，扩增后取 PCR 反应液 6 μ L 加入到 2.0% 琼脂糖凝胶孔中，在 120 V 电压、70 mA 电流下进行电泳。用凝胶成像系统检测目的基因表达情况并照相。用一代测序仪进行测序分析。

1.2.3 数据分析。 测序峰型用 Chromas 软件查看，成功的序列利用 DNAMAN 进行序列拼接，对于 Genbank 中的 ITS2 序列，使用基于隐马尔可夫模型的 HMMer 注释方法获得 ITS2 间隔区序列。将所有序列利用 MEGA 5.0 软件分析比对，进行遗传距离分析，利用 NJ 邻接树法构建聚类分析图，Bootstrap 1 000 次检验各分支支持率。根据 Koetschan 等^[11]建立的 ITS2 数据库及其网站预测功能，预测 ITS2 二级结构。

2 结果与分析

2.1 序列比较及聚类分析 通用引物 ITS2 序列长度均为 461 bp，丹参序列内变异位点有 5 个，多态性位点 2 个，G 碱基和 C 碱基的平均占比为 60.8%，根据 Kimura 2-parameter model 计算的种内平均遗传距离为 0.004，最小遗传距离为 0.000，出现在 D2、D4、D5、D6、D9、D11 样品两两之间，说明这 6 个样品亲缘关系最近，属同一物种。基于 ITS2 序列，通过邻接法(NJ)所构建的系统聚类树图(图 1)可以看出，丹参与其伪品甘西鼠尾和牛蒡分别聚在不同的支，表现出单系性，分支支持率在 50% 以上，能够将三者区分开。

2.2 丹参及其混伪品 ITS2 序列二级结构 从丹参基原植物与其个别混伪品二级结构比较(图 2)可以看出，丹参与甘

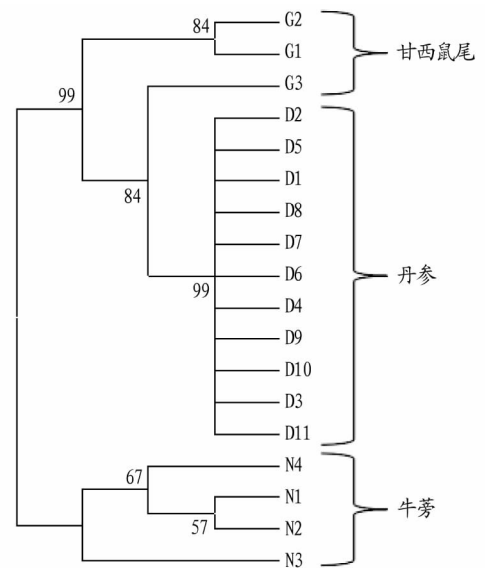


图 1 基于 ITS2 序列构建的丹参及其混伪品的邻接 (NJ) 树
Fig. 1 Adjacent (NJ) trees of *Salvia miltiorrhiza* Bge. and its adulterants based on ITS2 sequences

西鼠尾差异较小，仅在 III 区顶端的 2 个茎环有甚微差异；与牛蒡差异较大，4 个区均有差异，差异相对较小的位于 II 区。通过 ITS2 二级结构比较，可以将丹参与其混伪品区别开来。

2.3 特异性引物鉴别 通过 PCR 扩增(图 3)可以看出，丹参样品均能扩增出目的条带，而伪品甘西鼠尾和牛蒡均不能扩增出目的条带，阴性对照无条带。表明采用特异性引物 PCR 技术能够将丹参及其伪品进行区分。

3 讨论

丹参始载于《神农本草经》，在我国有悠久的历史，因其色红且形状似参而得名“丹参”。近年来随着丹参野生资源的减少，家种丹参其遗传资源多样性的不确定性导致市场上出现了不少丹参伪品，例如甘西鼠尾草、三叶鼠尾草、毛地黄鼠尾草、云南鼠尾草等鼠尾草属植物。此外，经市场调研发现，有些商贩还用牛蒡根染色充当丹参售卖，使得丹参品质存在重要的安全隐患。另外，也有相关文献报道将鼠尾草属 40 多个种的根及根茎作丹参使用，经化学成分含量的研究发现，其中有 30 多个种的脂溶性化学成分含量与丹参相当，可作为丹参的新资源^[12]。该研究选取了甘西鼠尾和牛蒡根 2 个伪品与丹参进行比较研究，通过 NJ 聚类分析表明，11 个丹参样品先聚为一支后，再与甘西鼠尾聚为一支，二者亲缘关系很近，该结果可为前人的新资源观点提供数据支持；牛蒡根单独聚为一支，从遗传多样性分析可知，丹参与牛蒡亲缘关系较远，这与二者属不同科属有关。

中国药典四部指导原则推荐的植物药主序列为 ITS2 片段扩增通用引物 ITS2F 和 ITS3R，辅序列为 psbA-trnH 片段扩增通用引物 psbAF 和 trnHR^[13]。该研究在试验过程中首先选用了通用主引物，结果显示 PCR 扩增后，丹参及其混伪品均能扩增成功，经测序分析后可将丹参及其伪品进行区分。此外，该研究拟通过 PCR 技术进行鉴别，通过对 ITS2 序列的筛选以及引物的设计后，最终选取了一对特异性引物，

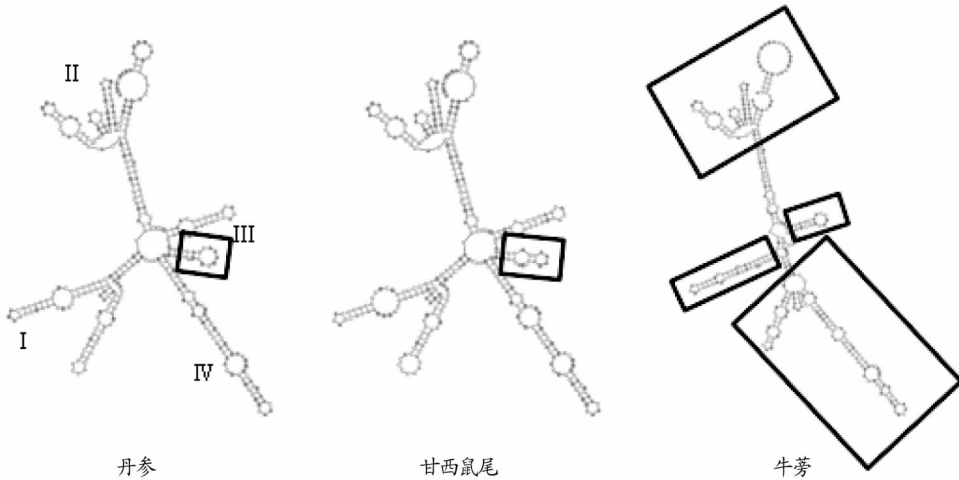
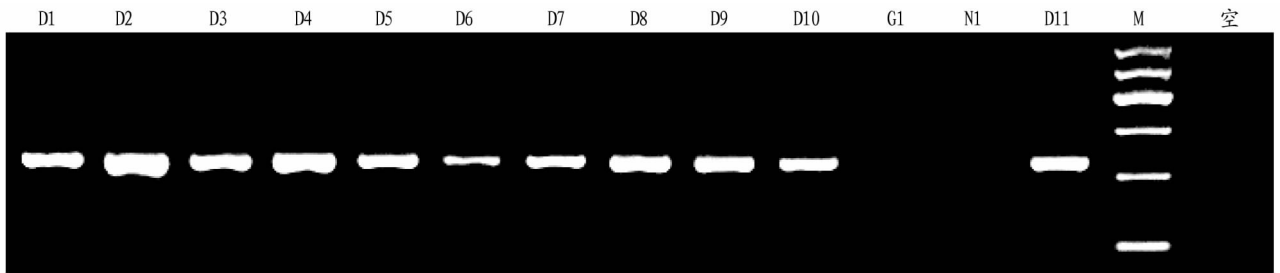


图2 丹参及其混伪品的 ITS2 二级结构比较

Fig.2 Comparison of ITS2 secondary structure of *Salvia miltiorrhiza* Bge. and its adulterants



注: M 为 Marker1; D1 ~ D10 为丹参样品; G1 为甘西鼠尾; N1 为牛蒡; D11 为丹参对照药材; 空为空白对照

Note: M is the Marker1; D1 - D10 is the sample of *Salvia miltiorrhiza*; G1 is *Salvia przewalskii*; N1 is *Arctium lappa*; D11 is the control herbs of *Salvia miltiorrhiza*; empty is blank control

图3 丹参及其混伪品的凝胶电泳图

Fig.3 Gel electrophoresis diagram of *Salvia miltiorrhiza* Bge. and its adulterants

通过特异性引物的扩增, 扩增成功率非常高且条带清晰稳定, 表明此方法也能够对丹参及其伪品进行鉴别, 该研究可为丹参提供更加简便、快速的鉴别方法。

4 结论

该研究采用 DNA 条形码和特异性引物 PCR 技术, 通过二级结构分析、NJ 树的建立以及特异性引物的 PCR 扩增, 均实现了对丹参的鉴别。试验结果表明, ITS2 序列能够有效鉴定丹参与其混伪品, 对丹参药材进行源头把关, 为丹参资源的合理开发利用提供重要的参考价值。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 76 - 77.
- [2] 宋振巧, 王建华, 陈为序, 等. EST - SSR 分析不同产地丹参的遗传多样性[J]. 核农学报, 2014, 28(2): 193 - 199.
- [3] 赵晓兰. 丹参的药用研究进展[J]. 品牌, 2015(6): 301 - 302.

- [4] 唐晓清, 王康才, 陈喧, 等. 丹参不同栽培农家类型的 AFLP 鉴定[J]. 药物生物技术, 2006, 13(3): 182 - 186.
- [5] 陈士林. 中国药典中药材 DNA 条形码标准序列[M]. 北京: 科学出版社, 2015.
- [6] 张甜甜, 金海珠, 王洪涛. 分子标记技术在丹参种质资源研究中的应用进展[J]. 中国农学通报, 2015, 31(32): 68 - 71.
- [7] 黄璐琦, 袁媛, 袁庆军, 等. 中药分子鉴定发展中的若干问题探讨[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(19): 3663 - 3667.
- [8] 张蓝飞, 陈士林. 中药借 DNA 条形码深呼吸[N]. 医药经济报, 2014 - 12 - 24(010).
- [9] 熊波, 赵志礼, 倪梁红, 等. DNA 条形码技术在中药鉴定中的应用、局限性与展望[J]. 中药材, 2015, 38(10): 2202 - 2206.
- [10] 陈珂蕊, 何震宇. DNA 条形码技术在中药领域的应用进展[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(1): 208 - 210.
- [11] KOETSCHAN C, FÖRSTER F, KELLER A, et al. The ITS2 database III: Sequences and structures for phylogeny[J]. Nucleic acids research, 2011, 38(S1): 275 - 279.
- [12] 李瑞芳. 山东产丹参药材的指纹图谱研究[D]. 济南: 山东大学, 2012.
- [13] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 四部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 383 - 384.

(上接第 95 页)

- [4] 国家卫生和计划生育委员会, 农业部, 国家食品药品监督管理总局. 水果和蔬菜中 500 种农药及相关化学品残留量的测定 气相色谱 - 质谱法: GB 23200. 8—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
- [5] 中华人民共和国秦皇岛出入境检验检疫局, 山东农业大学. 水果和蔬菜中 450 种农药及相关化学品残留量的测定 液相色谱 - 串联质谱法: GB/T 20769—2008[S]. 北京: 中国标准出版社, 2009.
- [6] 李玉美, 谭龙波, 卢平, 等. 毛细管气相色谱法测定辣椒中菊酯类农药

- 残留量[J]. 农药, 2006, 45(1): 45 - 46, 56.
- [7] 李海畅, 张钰萍, 胡德禹, 等. 气相色谱法检测辣椒中 7 种拟除虫菊酯类农药残留[J]. 农药学报, 2013, 15(1): 117 - 120.
- [8] 董静, 潘玉香, 朱莉萍, 等. 果蔬中 54 种农药残留的 QuEChERS /GC - MS 快速分析[J]. 分析测试学报, 2008, 27(1): 66 - 69.
- [9] 胡西洲, 程运斌, 胡定金. QuEChERS 法测定蔬菜中有机磷类农药多残留分析[J]. 中国测试技术, 2006, 32(3): 132 - 134.