

艾叶及其常见混伪品的分子鉴定[△]

李恩波^{1*}, 孙稚颖^{2#}(1.济南市第五人民医院, 济南 250022; 2.山东中医药大学药学院, 济南 250355)

中图分类号 R282.5; R944.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)43-4037-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.43.02

摘要 目的:对艾叶及其几种常见混伪品进行分子鉴定。方法:通过聚合酶链式反应(PCR)法直接测序,对艾及其8种混伪品进行核糖体DNA内转录间隔区片段2(ITS2)扩增并双向测序,所得序列经CodonCode Aligner拼接后,用系统发育软件MEGA4.0进行相关数据分析,同时利用邻接(NJ)法构建系统聚类树。结果:艾叶基原植物艾ITS2序列长度为225 bp,种内平均Kimura-双参数(K2P)遗传距离(0.000)小于其与混伪品的种间平均K2P遗传距离(0.022);由所构建的系统聚类树图可以看出,艾具有单系性,同时又与其他混伪品明显分开。结论:ITS2序列作为DNA条形码可以方便快捷地鉴别中药材艾叶及其混伪品,可为其质量评价及临床安全用药提供重要的分子鉴别依据。

关键词 艾叶; 蒿属; DNA条形码; 核糖体DNA内转录间隔区片段2; 分子鉴定

Molecular Identification of *Artemisia argyi* and Its Adulterants

LI En-bo¹, SUN Zhi-ying²(1.Jinan Municipal Fifth People's Hospital, Jinan 250022, China; 2.College of Pharmacy, Shandong University of TCM, Jinan 250355, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To identify the molecule of *Artemisia argyi* and its adulterants. METHODS: The second internal transcribed spacer (ITS2) of ribosomal DNA were amplified and sequenced by direct sequencing of PCR products. Sequence assembly and consensus sequence generation were performed by using the CodonCode Aligner. Phylogenetic study was performed by using MEGA 4.0 software, meanwhile the phylogenetic tree was constructed by using the neighbor-joining (NJ) methods. RESULTS: The length of ITS2 sequence of *A. argyi* was 225 bp. Its mean intraspecific genetic distance (K2P distance, 0.000) was lower than that (0.022) of adulterants. In the cluster dendrogram, *A. argyi* showed monophyletic, and meanwhile, distinguished from their adulterants. CONCLUSIONS: ITS2 sequence can be used as DNA barcode to identify *A. argyi* and its adulterants effectively, and then provide important molecular evidence for quality evaluation and the safety of drug use in the clinic.

KEY WORDS *Artemisia argyi*; Artemisia Linn; DNA barcode; ITS2; Molecular identification

艾叶为传统常用中药,据2010年版《中国药典》记载,其来源为菊科蒿属植物艾 *Artemisia argyi* Levl.et Vant.的干燥叶,具有温经止血,散寒止痛的功效,外用可祛湿止痒^[1]。然而,由于蒿属植物形态相近,分类难度大,同名异物或同物异名现象比较严重,故现代中药书籍中记载的艾叶,实际上也包括艾蒿的许多近缘种。据报道,目前全国有十几种蒿属植物在各地作

艾叶使用,主要有野艾蒿 (*A. lavandulaefolia* DC.)、魁蒿 (*A. princeps* Pamp)、蒙古蒿 (*A. mongolica* (Fisch. ex Bess.) Nakai)、五月艾 (*A. indica* Willd.)、宽叶山蒿 [*A. stolonifera* (Maxim.) Komar.]、红足蒿 (*A. rubripes* Nakai)、阴地蒿 (*A. sylvatica* Maxim.)等^[2-4]。药材来源的复杂与混乱,必然影响到中药的质量与疗效,所以有必要对这些外形相似的近缘种作进一步鉴

资源的简单重复序列区间分析[J].中国药房,2011,22(11):1026.
[7] 王翀,周天华,杨雪,等.ISSR-PCR鉴别绞股蓝属七种植物[J].中草药,2008,39(4):588.
[8] 朱田田,晋玲,杜弢,等.中麻黄基因组DNA不同提取方法的比较[J].中国实验方剂学杂志,2012,40(4):316.
[9] 欧立军,颜旺,廖亚西,等.天门冬 ISSR 分子标记技术的建立与体系优化[J].中草药,2011,42(2):353.

[10] 张福生,郭顺星.金线莲 ISSR 反应体系的建立与优化[J].中草药,2011,42(1):137.
[11] 吴生,熊宇婷,谢颀,等.正交设计优化翼梗五味子 ISSR-PCR 反应体系[J].中草药,2011,42(5):976.
[12] 廖丽,郭巧生.夏枯草 ISSR 分子标记技术的建立与体系优化[J].中草药,2009,40(7):1131.
[13] 申彦晶,赵翊,赵树进.正交实验设计优化白木香 ISSR-PCR 反应体系的研究[J].药物生物技术,2008,15(1):31.
[14] 赵振华,严萍,焦旭文,等.何首乌 ISSR-PCR 反应体系建立与优化[J].时珍国医国药,2008,19(3):567.

(收稿日期:2013-02-21 修回日期:2013-04-26)

△ 基金项目:山东省高等学校科技计划项目(No.J12LM05)

* 主管药师。研究方向:中药学。电话:0531-82679916

通信作者:副教授,博士。研究方向:药用植物资源与鉴定。

E-mail:szyww@126.com

别研究。

DNA 条形码是利用基因组中一段公认标准的、相对较短的 DNA 片段来对物种进行准确鉴定的新技术^[6],是当今生物分类和鉴定的研究热点和方向,该技术简便高效,不受样品的形态性状以及研究者的专业水平限制,避免了主观人为的判断和客观条件的影响,能真实反映中药材的本来面貌,适用于进行真伪鉴定^[6-7]。目前,药用植物的 DNA 条形码虽未最终确定,但作为候选序列的核糖体 DNA 内转录间隔区片段 2 (ITS2) 片段以其特有的优势被大家所广泛关注^[8-9]。该片段一般较短,有利于对发生降解的样品进行扩增^[10],同时 ITS2 片段在物种水平的变异较快,有更多的突变位点以区分不同的物种。目前,对于艾叶及其常见混伪品的分子鉴定尚未见报道,笔者利用 DNA 条形码片段 ITS2 序列,对艾叶及其 8 种混伪品进行了比较研究,以为其准确鉴别提供新的分子证据。

1 材料

1.1 仪器

MM400 型 DNA 提取研磨仪(德国 Retsch 公司);1-14 型小型台式离心机(德国 Sigma 公司);HH-2 型数显恒温水浴锅(常州国华电器有限公司);PTC0200 型 PCR 仪、凝胶紫外成像系统(美国 Bio-Rad 公司);DYY III 型电泳仪(北京六一仪器厂);ICE MAKER SIM-F140 型制冰机(日本 Sanyo 公司);3730XL 型测序仪(美国 ABI 公司)。

1.2 药材

材料来源见表 1,包括实验样品及来自 GenBank 所下载序列,试验样品经中国医学科学院药用植物研究所林余霖副研究员鉴定,凭证标本保存于中国医学科学院药用植物研究所。

表 1 材料来源

Tab 1 Material source

药材	拉丁学名	采集地	标本号	GenBank 号
艾	<i>A. argyi</i>	中国医学科学院药用植物研究所广西分所	PS0590MT01	GU724311
艾	<i>A. argyi</i>	中国医学科学院药用植物研究所广西分所	PS0590MT04	GU724270
艾	<i>A. argyi</i>	广西壮族自治区南宁市	PS0590MT05	GQ434470
艾	<i>A. argyi</i>	广西壮族自治区南宁市	PS0590MT05	DQ925700
艾	<i>A. argyi</i>	广西壮族自治区南宁市	PS0590MT05	FJ528302
野艾蒿	<i>A. lavandulifolia</i>	北京东灵山	PS0703MT01	GQ434533
魁蒿	<i>A. princeps</i>	北京东灵山	PS0703MT01	JF755943
宽叶山蒿	<i>A. stolonifera</i>	北京东灵山	PS0703MT01	JF755947
蒙古蒿	<i>A. mongolica</i>	北京东灵山	PS0703MT01	JF755944
红足蒿	<i>A. rubripes</i>	北京东灵山	PS0703MT01	GQ379334
五月艾	<i>A. indica</i>	北京东灵山	PS0703MT01	AY038222
菱蒿	<i>A. selengensis</i>	北京东灵山	PS0703MT01	AY038219
阴地蒿	<i>A. sylvatica</i>	北京东灵山	PS0703MT01	U78474

1.3 试剂

植物 DNA 提取试剂盒(天根生化科技(北京)有限公司);dNTP、TaqDNA 聚合酶(北京赛百盛基因技术有限公司);引物、DL2000 marker、琼脂糖[生工生物工程(上海)股份有限公司];其余试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 DNA 提取

试验样品为硅胶干燥叶,取约 10 mg,用 DNA 提取研磨仪研磨 1 min (30 次/s)后,利用植物 DNA 提取试剂盒提取总 DNA。

2.2 聚合酶链式反应(PCR)扩增与测序

扩增与测序引物相同,上游引物:5'-GCGATACTTGGT-GTGAAT-3',下游引物:5'-GACGCTTCTCCAGACTACAAT-3'。PCR 反应体积为 25 μ l,反应体系与扩增程序参照陈士林等的文献^[8]。PCR 扩增产物经纯化后,使用测序仪双向测序。

2.3 数据处理

测序峰图利用 CodonCode Aligner V 3.0 校对拼接,去除引物区。对于网上所获得的 ITS 序列,使用基于隐马尔可夫模型(HMMer)注释方法去除两端 5.8S 和 26S 区段获得 ITS2 间隔区序列^[11]。然后,将所有序列用软件 MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis)4.0 分析比对并进行遗传距离等分析,用邻接(NJ)法构建系统聚类树。

3 结果

3.1 序列比较

艾叶基原植物艾 ITS2 间隔区序列长度均为 225 bp,鸟嘌呤和胞嘧啶所占比率(GC 含量)为 56.1%。艾种内不同来源样品 5 条序列比对后,碱基无差异,表明艾种内平均 Kimura-双参数遗传距离(K2P)为 0.000;与其 8 种混伪品 ITS2 序列比对后,序列长度为 225 bp,具有 14 个位点碱基变异和 2 位点碱基插入缺失,艾与所研究 8 种混伪品的 ITS2 序列间均有碱基差异。基于 K2P 双参数模型计算遗传距离,艾叶与其混伪品种间平均遗传距离为 0.022。艾叶及其混伪品序列比对见图 1(图中灰底字表示变异位点,黑框字表示特有序列,“?”表示无法判断)。

3.2 聚类分析

基于 ITS2 序列,利用 Mega4.0 构建的 NJ 系统聚类树图显示,艾叶不同来源样品聚为一支,表现出单系性,与其混伪品可以明显区分开,同时树图中各混伪品间基于 ITS2 序列的差异性,也可以彼此区分开。艾叶及其混伪品基于 ITS2 序列构建的 NJ 聚类树见图 2。

4 讨论

作为中医常用临床中药之一,艾叶用药历史悠久。由于蒿属植物近缘种之间外部形态相似,彼此不易区分,因此在全国各地作为艾叶使用的混伪品较多。本研究采集了艾叶及其部分混伪品,又从 GenBank 上下载了部分物种的相关序列,利用目前被大家所广泛认可的 DNA 条形码 ITS2 序列片段,对艾叶及其混伪品进行鉴别,发现艾叶的 ITS2 条形码序列长度为 225 bp,种内平均 K2P 遗传距离(0.000)小于其与混伪品的种间平均 K2P 遗传距离(0.022),艾与所研究 8 种混伪品 ITS 序列间均有明显的碱基差异;在基于邻接法构建的系统聚类树中,艾叶基原植物不同来源样品首先聚为一支,表现出了单系性,而同时又与其他混伪品明显区分开。因此,利用 ITS2 序列作为 DNA 条形码,可以有效鉴定中药材艾叶。

中药材 DNA 条形码鉴定是中药鉴定方法的创新,与传统中药鉴别方法相比较,DNA 条形码技术具有快速、准确、微量、

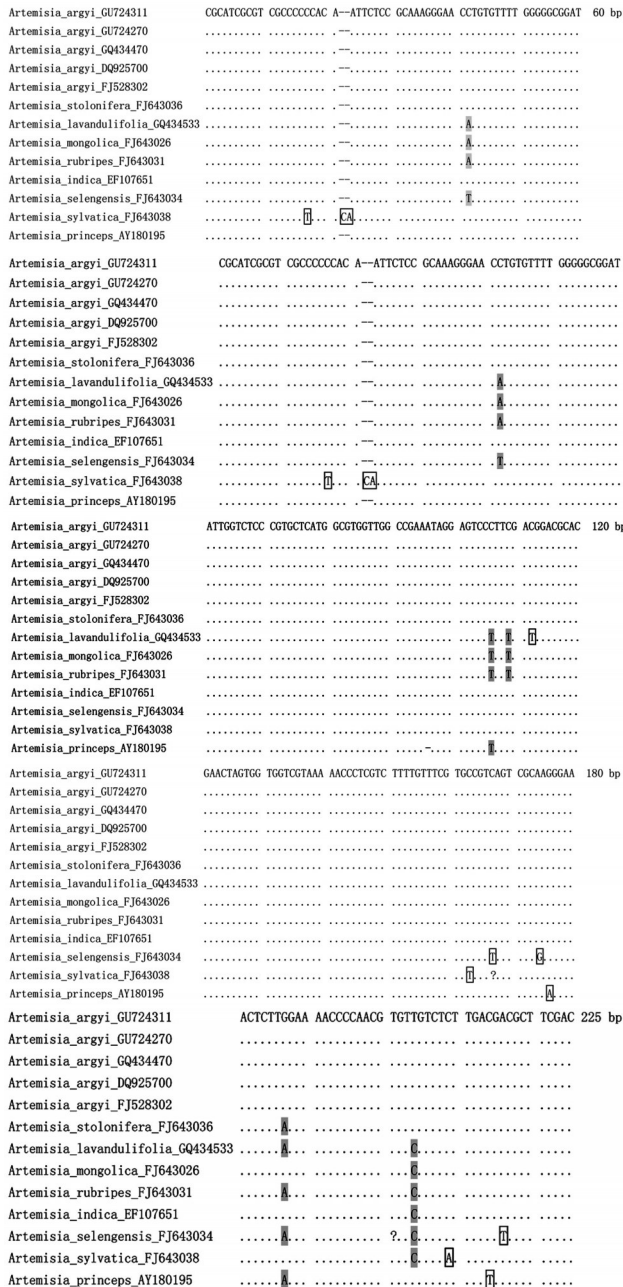


图1 艾叶及其混伪品序列比对

Fig 1 Multiple sequence alignment of *A. argyi* and its adulterants

通用性强的特点,不受样品个体形态、发育阶段、供试部位、环境条件的影响,能直接从基因水平上提供丰富的鉴别依据,有助于克服中药鉴定中的一些难题,提高中药鉴定水平,在中药鉴定中展示了广阔的应用前景。Chen SL等^[9]于2010年经过大样本量研究,首次提出将核基因间隔区ITS2作为药用植物鉴定的通用条形码序列。目前,该序列作为中药材DNA条形码在许多研究中得到应用,本研究再次证明了ITS2序列作为DNA条形码的鉴定能力。总之,中药DNA条形码鉴定研究的

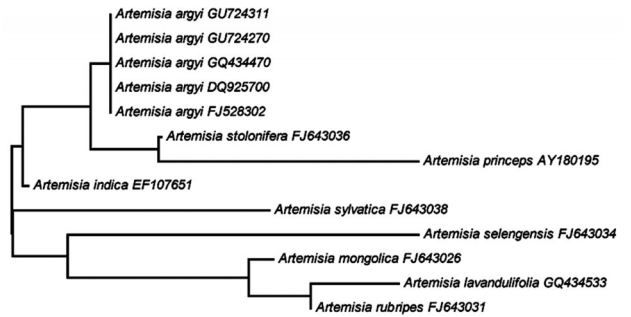


图2 艾叶及其混伪品基于ITS2序列构建的NJ聚类树

Fig 2 Phylogenetic tree of *A. argyi* and its adulterants based on ITS2 sequences using NJ method

广泛深入开展,必将大大加快中药鉴定标准化的进程,对完善中药质量和安全性检测方法体系可以起到重要的作用。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:82.
- [2] 林有润.中国植物志[M].北京:科学出版社,1991,76(2):78.
- [3] 楼之岑,秦波.常用中药材品种整理和质量研究:第一册[M].北京医科大学/中国协和医科大学联合出版社,1995:874.
- [4] 中国医学科学院药用植物资源开发研究所.中药志:第五册[M].北京:人民卫生出版社,1994:48.
- [5] Schindel DE, Miller SE. DNA barcoding, a useful tool for taxonomists [J]. *Nature*, 2005, 435(7 038): 17.
- [6] 陈士林,姚辉,宋经元,等.基于DNA barcoding(条形码)技术的中药材鉴定[J].世界科学技术:中医药现代化,2007,9(3):7.
- [7] 韦健红,李薇,吴文如,等.基于CO I与16SrRNA基因对广地龙的DNA分子鉴定研究[J].中国药房,2012,23(35):3 274.
- [8] Chen SL, Yao H, Han JP, et al. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species [J]. *PLoS One*, 2010, 5(1):e8 613.
- [9] Gao T, Yao H, Song J, et al. Identification of medicinal plants in the family Fabaceae using a potential DNA barcode ITS2[J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 130(1):116.
- [10] Kress WJ, Wurdack KJ, Zimmer EA, et al. Use of DNA barcodes to identify flowering plants[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(23):8 369.
- [11] Keller A, schleicher T, Schultz J, et al. 5.8S-28S rRNA interaction and HMM-based ITS2 annotation[J]. *Gene*, 2009, 430(1/2):50.

(收稿日期:2013-02-22 修回日期:2013-03-22)