

· 资源与鉴定 ·

# 黄芩 ITS2 条形码数据库构建及其种子的 DNA 条形码 鉴定方法建立

刘金欣<sup>1,2</sup>, 魏妙洁<sup>2,3</sup>, 李耿<sup>4</sup>, 程硕涵<sup>1</sup>, 赵春颖<sup>1</sup>, 阿里穆斯<sup>3</sup>, 石林春<sup>2\*</sup>

(1. 承德医学院 河北省中药研究与开发重点实验室, 河北承德 067000;

2. 中国医学科学院, 北京协和医学院 药用植物研究所, 北京 100193;

3. 中央民族大学 药学院, 北京 100081; 4. 中日友好医院, 北京 100029)

**[摘要]** 目的:通过构建黄芩核糖体 DNA 内转录间隔区 2(ITS2)条形码数据库,建立黄芩种子 DNA 条形码鉴定新方法,保障黄芩种子基原准确。方法:收集黄芩对照药材、基原植物、生药材、公共数据库及其常见代用品的 ITS2 序列,构建黄芩 DNA 条形码数据库;收集 62 份市售黄芩种子样品,每份种子获取 3~4 条 ITS2 序列,基于 BLAST 方法、遗传距离法和邻接(NJ)系统发育树法进行物种鉴定。结果:共获得 101 条黄芩及其代用品的 ITS2 序列。黄芩的种内序列变异小于种间序列变异,黄芩、甘肃黄芩和粘毛黄芩在 NJ 系统发育树上分别聚为独立的支,可相互区分。共获得 195 条黄芩种子的 ITS2 序列, DNA 条形码鉴定结果表明 193 条为黄芩序列,2 条为真菌序列。结论:黄芩 ITS2 条形码数据库稳定可靠,可满足黄芩种子 DNA 条形码鉴定的需求。DNA 条形码技术可用于黄芩种子的物种鉴定。

**[关键词]** 黄芩; 种子; DNA 条形码; 内转录间隔区; 鉴定; 甘肃黄芩; 基原植物

**[中图分类号]** R282;F124.5;R931;Q785 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)09-0037-09

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20180906

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180227.0906.003.html>

**[网络出版时间]** 2018-02-27 13:33

## Construction of ITS2 Barcode Database of Scutellariae Radix and Establishment of DNA Barcode Identification Method for Its Seeds

LIU Jin-xin<sup>1,2</sup>, WEI Miao-jie<sup>2,3</sup>, LI Geng<sup>4</sup>, CHENG Shuo-han<sup>1</sup>, ZHAO Chun-ying<sup>1</sup>,  
BORJIGIDAI Almaz<sup>3</sup>, SHI Lin-chun<sup>2\*</sup>

(1. Hebei Key Laboratory of Research and Development of Chinese Medicine, Chengde Medical University, Chengde 067000, China; 2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China; 3. School of Pharmacy, Minzu University of China, Beijing 100081, China; 4. China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China)

**[Abstract]** **Objective:** In order to guarantee the seed base of Scutellariae Radix is accurate, an internal transcribed spacer 2 (ITS2) barcode reference library of Scutellariae Radix has been constructed and then a species identification method of Scutellariae Radix seeds based on DNA barcoding technology has been established. **Method:** ITS2 sequences were obtained from Scutellariae radix reference medicinal materials, original plant, crude medicinal materials, public database, and its substitutes. Totally 62 Scutellariae Radix seed specimens were collected from markets. For each Scutellariae Radix seed specimen, 3-4 ITS2 sequences were obtained and

**[收稿日期]** 20171102(018)

**[基金项目]** 河北省三三三人才项目(A2017002090);河北省教育厅青年拔尖人才项目(BJ201602);河北省自然科学基金项目(H2017406031);河北省中医药管理局项目(2017077);河北省高校重点学科建设项目(冀教高[2013]4号)

**[第一作者]** 刘金欣,博士,讲师,从事中药资源相关研究,E-mail:liujx\_23@163.com

**[通信作者]** \*石林春,博士,副研究员,从事中药资源相关研究,Tel:010-57833206,E-mail:linchun\_shi@163.com

then used for species assignment by BLAST method, genetic distance method and neighbor-joining phylogenetic tree method. **Result:** In total, 101 ITS2 sequences of *Scutellariae Radix* and its substitutes have been obtained. The data analysis result showed that the intraspecific distance of *Scutellariae Radix* was less than its interspecific distance. The three species of *Scutellaria baicalensis*, *S. rehderiana* and *S. viscidula* were showed separated branch in the neighbor-joining tree. Totally 195 ITS2 sequences have been obtained from *Scutellariae Radix* seeds, the identification results showed that 193 sequences were *Scutellariae Radix* and 2 sequences were fungi contaminations. **Conclusion:** The ITS2 barcode database of *Scutellariae Radix* is stable and reliable, it can satisfy the demand of DNA barcoding analysis of *Scutellariae Radix* seeds.

[ **Key words** ] *Scutellariae Radix*; seeds; DNA barcoding; internal transcribed spacer; identification; *Scutellaria rehderiana*; original plant

黄芩始载于《神农本草经》<sup>[1]</sup>,为中医临床上使用最广泛的常用大宗中药材之一。据 2015 年版《中国药典》记载<sup>[2]</sup>,黄芩为唇形科黄芩属植物黄芩的干燥根,其主要药效成分为<sup>[3]</sup>黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷、汉黄芩素等黄酮类衍生物,其中黄芩苷为该药材在 2015 年版《中国药典》中的特征性检测成分<sup>[2]</sup>。现代药理研究表明,黄芩具有抗菌、抗病毒、抗氧化、抗炎和抗过敏、抗肿瘤、神经保护、心血管保护、预防或治疗糖尿病等作用<sup>[4]</sup>。黄芩是《伤寒论》<sup>[5]</sup>中传统方剂黄芩汤和小柴胡汤的配伍组成药味,也是双黄连口服液、三九胃泰颗粒、清开灵胶囊等百余种现代中药的处方成分。随着黄芩药材使用量的增加,其野生资源难以满足临床应用的需求,栽培黄芩已成为主要商品来源。黄芩的道地产区为河北承德,称为“热河黄芩”<sup>[6]</sup>。除河北承德外,内蒙古、山西、陕西、甘肃等地也有大规模种植。近年来随着黄芩价格走出低谷,各产区都有扩种,对黄芩种子需求也大幅增加,供求关系导致黄芩种子价格稳步上扬、货源紧张、质量良莠不齐,存在部分混杂现象。准确鉴定黄芩种子基原,从源头上保证黄芩药材质量稳定可控,意义重大。

传统中药材种子鉴定方法常利用种子的形态结构特征与混淆品种子进行区分,但种子形态特征常受到遗传背景、栽培条件(如降水、施肥、温度等)的影响,同时种子的成熟度对种子形态特征也有较大影响,导致来源于不同群体甚至同一群体的种子形态特征往往存在较大差异<sup>[7]</sup>。DNA 条形码分子鉴定法是利用基因组中一段公认的、相对较短的 DNA 序列来进行物种鉴定的一种分子生物学技术,可摆脱传统鉴定方法对形态特征的依赖<sup>[8]</sup>。当前,探索 DNA 条形码分子鉴定法在中药材种子种苗鉴定中的应用,已成为中药材种子种苗质量控制的研究热点<sup>[9-11]</sup>。刘金欣等<sup>[10]</sup>利用 DNA 条形码技术对中药

材桔梗种子进行鉴定研究,发现单粒桔梗种子(约 1 mg)即可成功进行 DNA 提取、聚合酶链式反应扩增和序列测定,表明 DNA 条形码技术适合于微小种子的鉴定应用。方海兰等<sup>[11]</sup>基于构建的重楼中国药典物种标准条形码数据库,对市售的 26 份重楼种子种苗样品进行鉴定,结果表明核糖体 DNA 内转录间隔区(ITS)条形码可有效鉴别正品重楼及其混伪品的种子种苗。本研究拟构建黄芩 ITS2 条形码数据库,利用该数据库对市售的 62 份黄芩种子进行物种鉴定,建立黄芩种子的 DNA 条形码鉴定方法。

## 1 材料

T100 型聚合酶链式反应(PCR)扩增仪(美国 Bio-Rad 公司),1-14 型离心机(德国 Sigma 公司),MM400 型球磨机(德国 Retsch 公司),NanoDrop 2000 型超微量分光光度计和 ABI 3730XL 型测序仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。植物 DNA 提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司],PCR MasterMix 试剂(北京艾德莱生物科技有限公司)。

为构建黄芩核糖体 DNA 内转录间隔区 2 (ITS2)条形码数据库,共收集黄芩样品 93 份,见表 1。其中黄芩对照药材 1 份(HQR001),来自中国食品药品检定研究院;经形态学鉴定专家鉴定的黄芩基原植物样品 67 份,形态学鉴定专家包括中国医学科学院药用植物研究所林余霖研究员、北京师范大学孟繁蕴教授和承德医学院赵春颖教授;符合 2015 年版《中国药典》质量标准的药材样品 3 份;经中药材 DNA 条形码序列核验机制<sup>[12]</sup>核验的 GenBank 序列 22 条。另收集黄芩常见代用品甘肃黄芩 *Scutellaria rehderiana* 样品 2 份,粘毛黄芩 *S. viscidula* 样品 4 份,GenBank 序列各 1 条,见表 1。收集待鉴定黄芩种子样品 62 份,样品来源包括黄芩道地产区河北省承德市,以及黄芩主产地甘肃省、山西省、内蒙古自治区和山东省等,见表 2。

表 1 黄芩及其代用品的样品信息和 ITS2 序列登录号

Table 1 Specimen information and ITS2 sequence accession numbers of *Scutellaria baicalensis* and its substitutes

编号	物种名	拉丁学名	样本类型	样本来源	登录号
HQR001	黄芩	<i>Scutellaria baicalensis</i>	对照药材	中国食品药品检定研究院	MG269261
HQP001	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	基原植物	药用植物研究所	MG269262
HQP002	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	基原植物	河北省保定市阜平县	MG269211
HQP003	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	基原植物	河北省保定市阜平县	MG269246
HQP004	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	基原植物	河北省保定市阜平县	MG269247
HQP005	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	基原植物	河北省保定市阜平县	MG269248
HQP006	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	基原植物	河北省承德市承德县	MG269268
HQP007	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	基原植物	河北省承德市承德县	MG269228
HQP008	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	基原植物	河北省承德市承德县	MG269229
HQP009	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	基原植物	河北省承德市承德县	MG269230
HQP010	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	基原植物	河北省承德市承德县	MG269200
HQP011	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	基原植物	河北省承德市丰宁县	MG269240
HQP012	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	基原植物	河北省承德市丰宁县	MG269241
HQP013	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	基原植物	河北省承德市丰宁县	MG269242
HQP014	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	基原植物	河北省承德市隆化县	MG269206
HQP015	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	基原植物	河北省承德市隆化县	MG269221
HQP016	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	基原植物	河北省承德市隆化县	MG269222
HQP017	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	基原植物	河北省承德市隆化县	MG269223
HQP018	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	基原植物	河北省承德市隆化县	MG269224
HQP019	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	基原植物	河北省承德市隆化县	MG269225
HQP020	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	基原植物	河北省承德市隆化县	MG269226
HQP021	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	基原植物	河北省承德市隆化县	MG269227
HQP022	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	基原植物	河北省承德市滦平县	MG269218
HQP023	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	基原植物	河北省承德市滦平县	MG269219
HQP024	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	基原植物	河北省承德市滦平县	MG269220
HQP025	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	基原植物	河北省承德市滦平县	MG269239
HQP026	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	基原植物	河北省承德市围场县	MG269207
HQP027	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	基原植物	河北省承德市围场县	MG269269
HQP028	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	基原植物	河北省承德市围场县	MG269208
HQP029	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	基原植物	河北省承德市围场县	MG269209
HQP030	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	基原植物	河北省承德市围场县	MG269267
HQP031	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	基原植物	河北省承德市围场县	MG269210
HQP032	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	基原植物	河北省承德市围场县	MG269231
HQP033	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	基原植物	河北省承德市围场县	MG269232
HQP034	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	基原植物	河北省承德市围场县	MG269233
HQP035	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	基原植物	河北省承德市围场县	MG269234
HQP036	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	基原植物	河北省承德市围场县	MG269235
HQP037	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	基原植物	河北省承德市围场县	MG269236
HQP038	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	基原植物	河北省邯郸市武安市	MG269245
HQP039	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	基原植物	河北省张家口市崇礼县	MG269205

续表 1

编号	物种名	拉丁学名	样本类型	样本来源	登录号
HQP040	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	基原植物	河北省张家口市崇礼县	MG269244
HQP041	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	基原植物	河北省秦皇岛青龙满族自治县	MG269212
HQP042	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	基原植物	河北省秦皇岛青龙满族自治县	MG269213
HQP043	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	基原植物	河北省秦皇岛青龙满族自治县	MG269214
HQP044	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	基原植物	河北省秦皇岛青龙满族自治县	MG269215
HQP045	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	基原植物	河北省秦皇岛青龙满族自治县	MG269216
HQP046	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	基原植物	河北省秦皇岛青龙满族自治县	MG269199
HQP047	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	基原植物	河北省秦皇岛青龙满族自治县	MG269217
HQP048	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	基原植物	河北省张家口市赤城县	MG269266
HQP049	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	基原植物	河北省张家口市赤城县	MG269237
HQP050	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	基原植物	河北省张家口市赤城县	MG269238
HQP051	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	基原植物	河北省张家口市赤城县	MG269243
HQP052	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	基原植物	河北省张家口市张北县	MG269201
HQP053	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	基原植物	河北省张家口市张北县	MG269202
HQP054	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	基原植物	河北省张家口市张北县	MG269203
HQP055	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	基原植物	河北省张家口市张北县	MG269204
HQP056	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	基原植物	内蒙古自治区赤峰市红山区	MG269249
HQP057	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	基原植物	内蒙古自治区赤峰市红山区	MG269250
HQP058	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	基原植物	内蒙古自治区霍林郭勒市	MG269255
HQP059	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	基原植物	内蒙古自治区霍林郭勒市	MG269256
HQP060	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	基原植物	内蒙古自治区霍林郭勒市	MG269257
HQP061	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	基原植物	内蒙古自治区霍林郭勒市	MG269258
HQP062	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	基原植物	内蒙古自治区霍林郭勒市	MG269259
HQP063	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	基原植物	内蒙古自治区霍林郭勒市	MG269260
HQP064	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	基原植物	内蒙古自治区兴安盟阿尔山市	MG269251
HQP065	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	基原植物	内蒙古自治区兴安盟阿尔山市	MG269252
HQP066	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	基原植物	内蒙古自治区兴安盟阿尔山市	MG269253
HQP067	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	基原植物	内蒙古自治区兴安盟阿尔山市	MG269254
HQM001	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	生药材	吉林林村中药开发有限公司	MG269263
HQM002	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	生药材	吉林林村中药开发有限公司	MG269264
HQM003	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	生药材	吉林林村中药开发有限公司	MG269265
HQN001	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	公共数据	美国国家生物技术信息中心 (NCBI)	AB557593
HQN002	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	公共数据	NCBI	AY394851
HQN003	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	公共数据	NCBI	FJ609732
HQN004	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	公共数据	NCBI	KC535524
HQN005	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	公共数据	NCBI	KC535525
HQN006	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	公共数据	NCBI	KC535526
HQN007	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	公共数据	NCBI	KC535527
HQN008	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	公共数据	NCBI	KC535528
HQN009	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	公共数据	NCBI	KJ025067
HQN010	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	公共数据	NCBI	KT781106

续表 1

编号	物种名	拉丁学名	样本类型	样本来源	登录号
HQN011	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	公共数据	NCBI	KT781108
HQN012	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	公共数据	NCBI	KT781109
HQN013	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	公共数据	NCBI	KT781110
HQN014	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	公共数据	NCBI	KU204828
HQN015	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	公共数据	NCBI	KU204829
HQN016	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	公共数据	NCBI	KU204830
HQN017	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	公共数据	NCBI	KU204831
HQN018	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	公共数据	NCBI	KU204832
HQN019	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	公共数据	NCBI	KU204833
HQN020	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	公共数据	NCBI	KU204834
HQN021	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	公共数据	NCBI	KU204836
HQN022	黄芩	<i>S. baicalensis</i>	公共数据	NCBI	KU204837
HQA001	甘肃黄芩	<i>S. rehderiana</i>	基原植物	药用植物研究所	MG269274
HQA002	甘肃黄芩	<i>S. rehderiana</i>	基原植物	药用植物研究所	MG269275
HQN023	甘肃黄芩	<i>S. rehderiana</i>	公共数据	NCBI	JX893232
HQA003	粘毛黄芩	<i>S. viscidula</i>	基原植物	内蒙古自治区锡林郭勒盟东乌珠穆沁旗	MG269270
HQA004	粘毛黄芩	<i>S. viscidula</i>	基原植物	内蒙古自治区锡林郭勒盟东乌珠穆沁旗	MG269271
HQA005	粘毛黄芩	<i>S. viscidula</i>	基原植物	内蒙古自治区锡林浩特市	MG269272
HQA006	粘毛黄芩	<i>S. viscidula</i>	基原植物	内蒙古自治区锡林浩特市	MG269273
HQN024	粘毛黄芩	<i>S. viscidula</i>	公共数据	NCBI	MF193526

## 2 方法

**2.1 DNA 提取, PCR 扩增和测序** 对于原植物叶片样品, 称取约 20 mg; 对于药材样品, 先用酒精擦拭药材表面, 待药材表面酒精挥干, 称取约 40 mg; 对于种子样品, 挑选籽粒饱满的种子 1 粒, 将称取的样品或单粒种子置于 2.0 mL 离心管中, 使用球磨仪研磨 2 min (30 次/s)。使用植物 DNA 提取试剂盒提取总 DNA, DNA 提取操作步骤依试剂盒说明书并调整水浴条件, 其中原植物样品的水浴条件为 65 °C 水浴 2~4 h, 药材和种子样品的水浴条件为 56 °C 水浴 8~12 h 或过夜。使用超微量分光光度计进行 DNA 质量测定。ITS2 序列的扩增引物, PCR 体系和扩增程序依照《中药材 DNA 条形码分子鉴定指导原则》<sup>[8]</sup>。PCR 产物经纯化后, 使用测序仪进行双向测序, 测序峰图质量判断依照《中药材 DNA 条形码分子鉴定指导原则》<sup>[8]</sup>。

**2.2 序列拼接、遗传距离计算、邻接 (NJ) 系统发育树构建和 BLAST 分析** 利用 CodonCode Aligner V7.0.1 去除测序峰图的低质量区域、完成峰图校对拼接和引物序列切除; 基于隐马尔可夫模型<sup>[13]</sup> (hidden Markov model), 使用 Hmmer v3.1 软件去除

5.8S rRNA 和 28S rRNA 区段获得 ITS2 序列, 其中 5.8S rRNA 的保守区序列为 CGAGGGCACGCCTG CCTGGGCGTCA, 28S rRNA 的保守区序列为 CGACCCAGGTCAGGCGGGACTACC; 利用 Muscle 3.8 软件进行多序列比对<sup>[14]</sup>; 应用 PUAP 4.0 软件<sup>[15]</sup> 计算种内、种间遗传距离; 利用 MEGA 7.0 软件<sup>[16]</sup> 进行 NJ 树构建; 使用 NCBI 的 BLAST-2.6.0<sup>+</sup> 软件<sup>[17]</sup> 进行 BLAST 鉴定分析。

## 3 结果

**3.1 DNA 提取, PCR 扩增和测序** 原植物样品为黄芩、甘肃黄芩和粘毛黄芩的硅胶干燥叶片, 叶片<sup>[18]</sup> 较薄, 质地坚硬, 长 1.4~4.5 cm, 宽 0.25~1.7 cm, DNA 平均质量浓度 148.2 mg·L<sup>-1</sup>, A<sub>260 nm</sub>/A<sub>280 nm</sub> 平均值 1.96; 生药材样品为黄芩干燥根, 黄芩根<sup>[2]</sup> 肥厚, 肉质, 呈圆锥形, 扭曲, 长 8~25 cm, 直径 1~3 cm, 表面棕黄色或深黄色, 富含次生代谢产物, DNA 平均质量浓度 161.3 mg·L<sup>-1</sup>, A<sub>260 nm</sub>/A<sub>280 nm</sub> 平均值 1.97; 种子样品<sup>[19]</sup> 为小坚果, 长 1.8~2.4 mm, 宽 1.1~1.6 mm, 千粒质量约 1.5 g, 属微小类种子, DNA 平均质量浓度 143.7 mg·L<sup>-1</sup>, A<sub>260 nm</sub>/A<sub>280 nm</sub> 平均值 1.85。

表 2 待鉴定黄芩种子的样品信息和 ITS2 序列登录号

Table 2 Specimen information and ITS2 sequence accession numbers of *Scutellariae Radix* seeds waiting for authentication

编号	来源	登录号	编号	来源	登录号
HQS001	安徽省亳州市谯城区	MG269276, MG269307	HQS031	甘肃省定西市通渭县	MG269358, MG269359, MG269360, MG269361
HQS002	甘肃省定西市临洮县	MG269298, MG269299, MG269300	HQS032	甘肃省定西市通渭县	MG269379, MG269380, MG269381
HQS003	甘肃省定西市临洮县	MG269320, MG269321, MG269322	HQS033	甘肃省定西市通渭县	MG269392, MG269393, MG269394
HQS004	甘肃省定西市临洮县	MG269282, MG269323, MG269324	HQS034	甘肃省定西市通渭县	MG269395, MG269396, MG269397
HQS005	甘肃省定西市临洮县	MG269333, MG269334, MG269335	HQS035	甘肃省定西市通渭县	MG269398, MG269399, MG269400
HQS006	甘肃省定西市临洮县	MG269336, MG269337, MG269338	HQS036	甘肃省定西市通渭县	MG269413, MG269414, MG269415
HQS007	甘肃省定西市陇西县	MG269297, MG269343, MG269344	HQS037	甘肃省定西市通渭县	MG269416, MG269417, MG269418
HQS008	甘肃省定西市陇西县	MG269442, MG269443, MG269444, MG269445	HQS038	甘肃省定西市渭源县	MG269286, MG269401, MG269402
HQS009	甘肃省定西市陇西县	MG269345, MG269346, MG269347, MG269348	HQS039	甘肃省定西市漳县	MG269296, MG269437, MG269438
HQS010	甘肃省定西市陇西县	MG269279, MG269349, MG269350, MG269351	HQS040	甘肃省定西市漳县	MG269439, MG269440, MG269441
HQS011	甘肃省定西市陇西县	MG269293, MG269352, MG269353	HQS041	甘肃省陇南市宕昌县	MG269428, MG269429, MG269430
HQS012	甘肃省定西市陇西县	MG269354, MG269355, MG269356, MG269357	HQS042	甘肃省陇南市西和县	MG269419, MG269420, MG269421
HQS013	甘肃省定西市陇西县	MG269362, MG269363, MG269364, MG269365	HQS043	河北省安国市药材市场	MG269449, MG269450, MG269451
HQS014	甘肃省定西市陇西县	MG269372, MG269373, MG269374, MG269375	HQS044	河北省保定市易县	MG269304, MG269305, MG269306
HQS015	甘肃省定西市陇西县	MG269284, MG269390, MG269391	HQS045	河北省承德市承德县	MG269464, MG269465, MG269466
HQS016	甘肃省定西市陇西县	MG269403, MG269404, MG269405	HQS046	河北省承德市丰宁满族自治县	MG269301, MG269302, MG269303
HQS017	甘肃省定西市陇西县	MG269406, MG269407, MG269408	HQS047	河北省承德市隆化县	MG269311, MG269312, MG269313
HQS018	甘肃省定西市陇西县	MG269285, MG269287, MG269409	HQS048	河北省张家口市蔚县	MG269288, MG269388, MG269389
HQS019	甘肃省定西市陇西县	MG269410, MG269411, MG269412	HQS049	河南省三门峡市卢氏县	MG269455, MG269456, MG269457
HQS020	甘肃省定西市陇西县	MG269422, MG269423, MG269424	HQS050	河南省三门峡市卢氏县	MG269461, MG269462, MG269463
HQS021	甘肃省定西市陇西县	MG269425, MG269426, MG269427	HQS051	内蒙古自治区赤峰市喀喇沁旗	MG269317, MG269318, MG269319
HQS022	甘肃省定西市陇西县	MG269431, MG269432, MG269433	HQS052	内蒙古自治区赤峰市翁牛特旗	MG269314, MG269315, MG269316
HQS023	甘肃省定西市陇西县	MG269292, MG269341, MG269342	HQS053	山东省临沂市沂水县	MG269327, MG269328, MG269329
HQS024	甘肃省定西市岷县	MG269280, MG269366, MG269367, MG269368	HQS054	山东省临沂市沂水县	MG269278, MG269283
HQS025	甘肃省定西市岷县	MG269369, MG269370, MG269371	HQS055	山东省临沂市沂水县	MG269291, MG269339, MG269340
HQS026	甘肃省定西市岷县	MG269294, MG269376, MG269377, MG269378	HQS056	山东省日照市莒县	MG269295, MG269325, MG269326
HQS027	甘肃省定西市岷县	MG269382, MG269383, MG269384	HQS057	山东省日照市莒县	MG269330, MG269331, MG269332
HQS028	甘肃省定西市岷县	MG269281, MG269385, MG269386	HQS058	山西省临汾市襄汾县	MG269458, MG269459, MG269460
HQS029	甘肃省定西市岷县	MG269277, MG269289, MG269387	HQS059	山西省运城市绛县	MG269452, MG269453, MG269454
HQS030	甘肃省定西市岷县	MG269434, MG269435, MG269436	HQS060	山西省运城市绛县	MG269308, MG269309, MG269310
			HQS061	山西省运城市万荣县	MG269290, MG269467, MG269468
			HQS062	山西省运城市新绛县	MG269446, MG269447, MG269448

所获得的原植物样品、生药材样品和种子样品的 DNA 均满足后续 PCR 扩增需求,采用 ITS2 条形码通用引物均可获得 PCR 结果,通过琼脂糖凝胶电泳可检测到 1 条清晰、明亮的条带,长度约 470 bp。

原植物样品和生药材样品均可获得高质量的双向测序结果,部分种子样品由于存在插入/缺失同源序列,测序峰图在插入/缺失位置之后发生移码,但双向拼接可获得高质量拼接结果;部分种子样品测序

峰图存在单核苷酸多态性(SNP)位点。所有序列均可基于 5.8S rRNA 和 28S rRNA 的隐马尔可夫模型进行注释。

**3.2 黄芩标准 ITS2 条形码序列特征及其与代用品的序列差异** 黄芩 *S. baicalensis* 共 93 条 ITS2 序列,包含对照药材、基原植物、生药材和 GenBank 序列。黄芩标准 ITS2 条形码序列鸟嘌呤(G)和胞嘧啶(C)所占的比率为  $(70.31 \pm 0.43)\%$ ,序列长度  $(230.61 \pm 0.49)$  bp,序列比对后长度 231 bp,含 9 个变异位点,分别为 27,42,58,171,184 位点 A-G 变异,41,83,111 位点 C-T 变异,46 位点插入/缺失;93 条序列分为 8 个单倍型,H1 为主导单倍型,包含 46 条序列,H2 ~ H8 分别包含 27,10,

4,2,2,1,1 条序列,见图 1。黄芩 ITS2 序列二级结构具有 4 个相似的螺旋,分别为 I, II, III 和 IV,相似的反转角度,但不同单倍型各个螺旋的环大小、数量和位置存在差异,见图 2。黄芩种内 K-2P 遗传距离的平均值  $0.0037 \pm 0.0057$ ,种内 K-2P 遗传距离的最大值 0.022 2。黄芩代用品主要为甘肃黄芩和粘毛黄芩,其中黄芩与甘肃黄芩的种间距离平均值  $0.0436 \pm 0.0048$ ,种间距离的最小值 0.040 4。黄芩与粘毛黄芩的种间距离平均值  $0.0320 \pm 0.0072$ ,种间距离的最小值 0.027 1。由构建的 NJ 系统发育树可知,黄芩、甘肃黄芩、粘毛黄芩分别聚为独立的支,相互之间可以明确区分,见图 3。

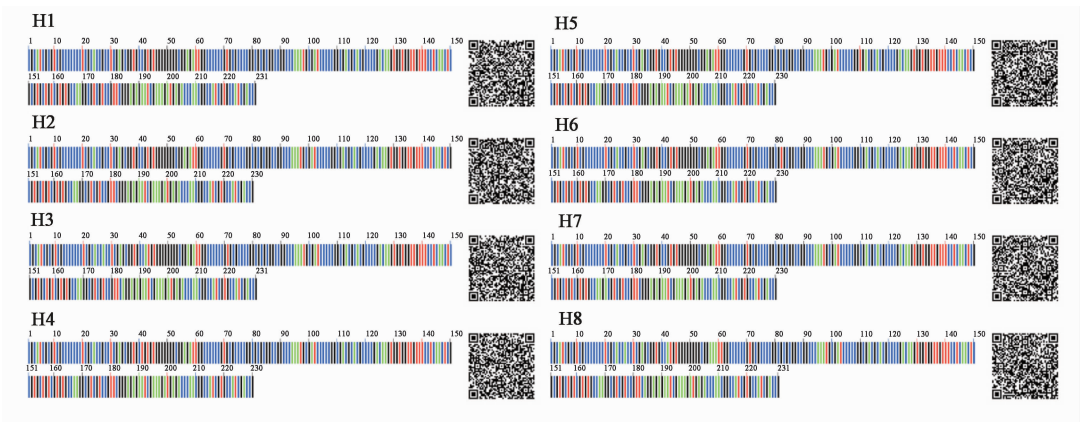


图 1 黄芩 ITS2 序列的 8 个单倍型  
Fig.1 Eight haplotypes of ITS2 sequences in *Scutellaria baicalensis*

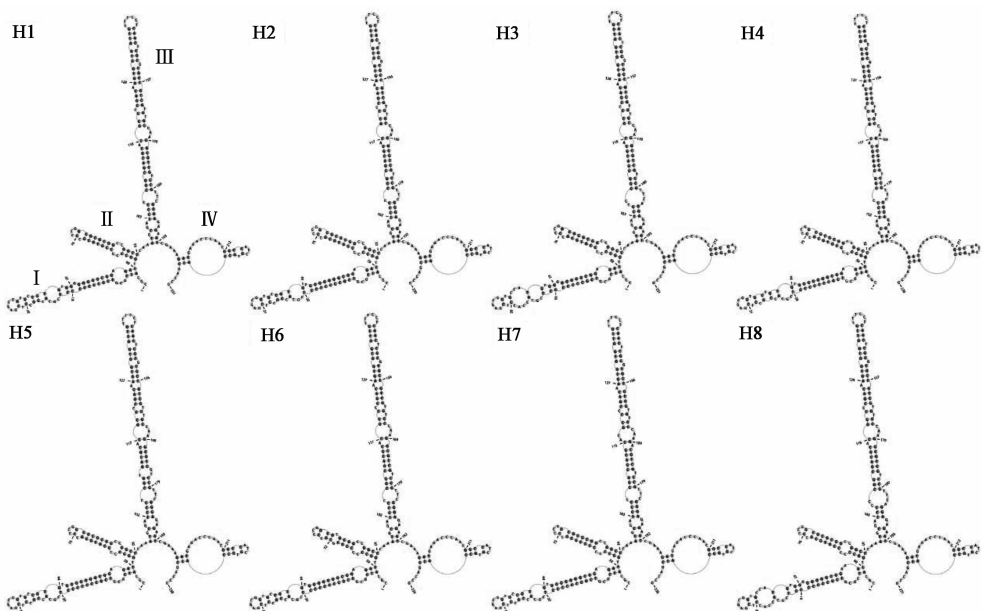


图 2 黄芩 ITS2 序列单倍型的二级结构  
Fig.2 Secondary structures of ITS2 haplotypes in *Scutellaria baicalensis*

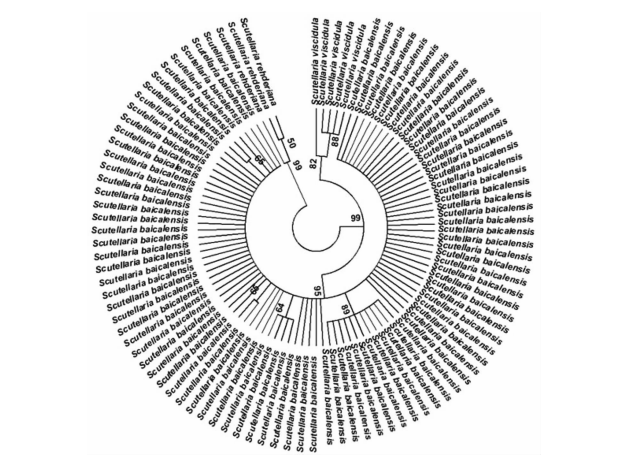


图 3 基于黄芩及其代用品的 ITS2 序列构建的 NJ 系统发育树  
Fig. 3 NJ phylogenetic tree constructed by ITS2 sequences of *Scutellaria baicalensis* and its substitutes

**3.3 市售黄芩种子的基原鉴定** 取收集的 62 份黄芩种子样品,每份样品挑取 3~4 粒进行 ITS2 条形码序列获取,共获得 195 条序列,相关序列已提交 NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>),见表 2。基于建立的黄芩 ITS2 条形码数据库,分别使用 BLAST 方法、遗传距离法和 NJ 系统发育树法进行基原物种鉴定,结果表明 193 条 ITS2 序列的基原物种为黄芩;2 条 ITS2 序列的基原物种非黄芩(HQS001 MT01, HQS054 MT03),进一步在 NCBI 中使用 BLAST 比对,表明二者均为真菌序列。见图 4。

为传统中药鉴定学的发展提供了新的理论和技术支撑。中药材 DNA 条形码技术可以对小块的中药材进行物种鉴定,如来源于植物的根、茎、叶、花、果、皮等组织的植物来源中药材<sup>[21]</sup>,来源于动物的肌肉、骨骼、角甲、内脏等组织的动物来源中药材<sup>[22-23]</sup>;对不同发育阶段的中药材进行物种鉴定<sup>[24]</sup>,如植物的种子、幼苗、花序、果实等,真菌的孢子、菌核、子实体等,动物的幼体、成体等;对不同加工阶段的中药材进行物种鉴定<sup>[9,25-27]</sup>,如原动物、原植物、生药材、部分饮片和部分中成药处方成分。由于中药鉴定的多数鉴定对象缺乏可准确鉴定到物种的形态特征,难以通过形态特征鉴定到物种,只能依靠 DNA 条形码序列将鉴定对象与基原物种的分类信息相联系,因此标准 DNA 条形码序列获取是中药材 DNA 条形码鉴定的基础和前提。根据《中药材 DNA 条形码分子鉴定指导原则》<sup>[8]</sup>和国际生命条形码联盟(CBOL)的相关要求,标准 DNA 条形码序列应具有 5 个特征。分别为①材料来源:对照药材和经形态学专家鉴定的基原物种样品;②测定步骤:依照中药材 DNA 条形码分子鉴定法指导原则<sup>[28]</sup>(指导原则 9107,2015 年版《中国药典》四部);③实验室:实验操作在规范的 DNA 条形码实验室或分子实验室完成,同时有 1~2 家实验室进行复验证;④质量控制:应符合中药材 DNA 条形码分子鉴定法指导原则;⑤其他来源序列:公共数据库中经校核认定的 DNA 条形码序列。

黄芩在中国具有悠久的用药历史,除中医配方外,大量用作中成药的原料。近年来,黄芩的需求量日益增加,加之不合理的过度开发加剧,导致黄芩的野生资源储量下降,当前该药材主要依靠人工栽培获得。黄芩种子是黄芩生产的源头,使用黄芩伪种将会造成严重的经济损失,增加黄芩临床安全用药风险。在实际生产中,除正品黄芩外,粘毛黄芩和甘肃黄芩是常见的黄芩代用品<sup>[29]</sup>。以粘毛黄芩为例,粘毛黄芩与黄芩在分类上同为黄芩属的黄芩系,两者的形态差异在于粘毛黄芩的茎被具腺的短柔毛,叶两面具多数黄色腺点<sup>[18]</sup>;黄芩茎近无毛或被上曲或平展短柔毛,但毛上均不具腺;叶两面无凹腺点或仅下面有凹腺点。粘毛黄芩与黄芩的种子形态特征差异不明显,需借助扫描电镜对两者种子的表面微形态进行观察后才能进行鉴定<sup>[30]</sup>,不仅仪器昂贵,同时对操作者的技能和经验要求较高。本研究通过分析黄芩和粘毛黄芩的 ITS2 序列特征发现,黄芩和粘毛黄芩具有稳定的 SNP 位点,两者的种间遗传距

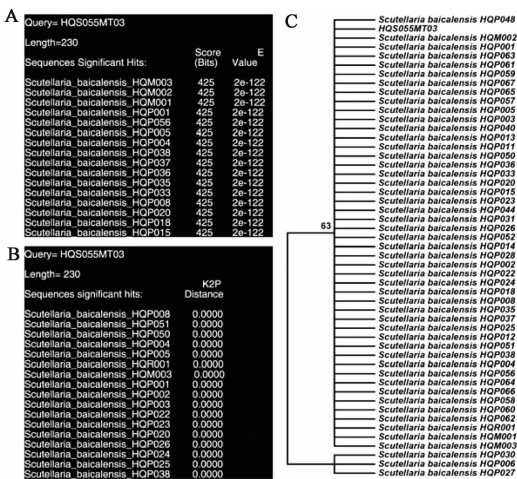


图 4 基于 ITS2 序列的黄芩种子鉴定(以序列 HQS055 MT03 为例)  
Fig. 4 Authentication of *Scutellariae Radix* seeds based on ITS2 sequences (take HQS055 MT03 as an example)

4 讨论

中药材 DNA 条形码技术经过 10 余年的发展,已经在中药鉴定领域及其他相关领域广泛应用<sup>[20]</sup>,

离最小值大于黄芩种内遗传距离最大值,在 NJ 系统树上两者聚为不同的支,表明两者可以通过 DNA 条形码技术进行鉴定。

[参考文献]

[1] 佚名. 神农本草经[M]. 顾观光, 辑. 杨鹏举, 校注. 北京: 学苑出版社, 2007: 159.

[2] 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: 301-302.

[3] 李琦, 章军, 崔文金, 等. 黄芩饮片标准汤剂的制备和质量标准评价[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(7): 36-40.

[4] 郑勇凤, 王佳婧, 傅超美, 等. 黄芩的化学成分与药理作用研究进展[J]. 中成药, 2016, 38(1): 141-147.

[5] 张仲景. 伤寒杂病论[M]. 桂林古本. 北京: 中国中医药出版社, 2014: 50, 86.

[6] 王丹, 张秋燕, 杨兴鑫, 等. 基于 HPLC 指纹图谱的黄芩道地药材与非道地药材的鉴别研究[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(12): 1951-1960.

[7] 孙丽娜, 严一字, 李美善, 等. 桔梗种群内种子形态的变异类型研究[J]. 延边大学农学学报, 2007, 29(1): 19-23.

[8] 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.

[9] 刘金欣, 李耿, 陈彩霞, 等. 基于 ITS2 序列的中药材苍术种苗 DNA 条形码鉴定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(2): 34-38.

[10] 刘金欣, 潘敏, 张改霞, 等. 基于 ITS2 序列的中药材桔梗种子 DNA 条形码鉴定[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2016, 18(2): 174-178.

[11] 方海兰, 夏从龙, 段宝忠, 等. 基于 DNA 条形码的中药材种子种苗鉴定研究——以重楼为例[J]. 中药材, 2016, 39(5): 986-990.

[12] 陈士林, 宋经元, 姚辉, 等. 药用植物 DNA 条形码鉴定策略及关键技术分析[J]. 中国天然药物, 2009, 7(5): 322-327.

[13] 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.

[14] Edgar R C. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity[J]. BMC bioinformatics, 2004, doi: 10.1186/1471-2105-5-113.

[15] Swofford D L. PAUP \*. Phylogenetic Analysis Using

*Parsimony (\* and Other Methods)* [M]. version 4. Massachusetts: Sinauer Associates, 2002: 27.

[16] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. Mol Biol Evol, 2016, 33(7): 1870-1874.

[17] Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, et al. BLAST+: architecture and applications[J]. BMC Bioinformatics, 2009, doi: 10.1186/1471-2105-10-421.

[18] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志. 第 65 卷. 第二分册[M]. 北京: 科学出版社, 1977: 194-198.

[19] 郭巧生, 王庆亚, 刘丽. 中国药用植物种子原色图谱[M]. 北京: 中国农业出版社, 2009: 316.

[20] CHEN S L, PANG X H, SONG J Y, et al. A renaissance in herbal medicine identification: from morphology to DNA[J]. Biotechnol Adv, 2014, 32(7): 1237-1244.

[21] 张彩云, 黄珊珊, 颜海飞. DNA 条形码技术在中药鉴定中的应用进展[J]. 中草药, 2017, 48(11): 2306-2312.

[22] 王孟虎, 许亮, 康廷国, 等. 动物类中药 DNA 条形码鉴定研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(15): 227-234.

[23] 刘旭朝, 周丽思, 刘金欣, 等. 基于 COI 序列的水牛角及其易混伪品 DNA 条形码鉴定研究[J]. 药学学报, 2017, 52(3): 494-499.

[24] 辛天怡, 雷美艳, 宋经元. 中药材 DNA 条形码鉴定研究进展[J]. 中国现代中药, 2015, 17(2): 170-176, 184.

[25] 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.

[26] 贾静, 石林春, 姚辉, 等. 市售动物药材僵蚕的 DNA 条形码鉴定研究[J]. 药学学报, 2016, 51(11): 1784-1790.

[27] 贾静, 石林春, 徐志超, 等. 市售鹿茸粉药材的 DNA 条形码鉴定[J]. 药学学报, 2015, 50(10): 1356-1361.

[28] 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: 383-385.

[29] 楼之岑, 秦波. 常用中药材品种整理和质量研究(北方编). 第二册[M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1995: 803.

[30] 赵丽丽, 李连怀, 聂凤褪. 黄芩及粘毛黄芩种子形态的电镜扫描比较[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(8): 1428-1429.

[责任编辑 刘德文]