

·资源与鉴定·

## 基于DNA条形码技术鉴别4种龙胆科 “地格达”类蒙药基原植物

崔占虎<sup>1,2</sup>, 李旻辉<sup>1,2\*</sup>, 袁庆军<sup>1</sup>, 王振旺<sup>2</sup>, 李虔全<sup>1,2</sup>, 周立社<sup>2</sup>

(1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 2. 内蒙古科技大学包头医学院, 内蒙古 包头 014060)

**[摘要]** 目的:建立一种快速、准确和标准化的龙胆科“地格达”类蒙药材的DNA条形码鉴别方法,为“地格达”类蒙药材的分子鉴定提供依据。方法:对蒙药地格达类药用植物进行通用引物PCR扩增,PCR扩增产物直接测序,并对序列进行分析。结果:测得4种“地格达”的rbcL, ITS, trnH-psbA和matK全长序列,4种序列长度的范围为388~940 bp, rbcL, ITS, matK序列都可以将其鉴别出来。结论:trnH-psbA序列不适合用于4种“地格达”的鉴别, ITS序列可作为地格达类蒙药材一种良好的分子标记。通过DNA条形码鉴别方法可对4种龙胆科“地格达”进行准确、可靠、有效的分子鉴别。

**[关键词]** 分子鉴定; DNA条形码; “地格达”类蒙药; 蒙药鉴别

**[中图分类号]** R282 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)10-0072-05

**[DOI]** CNKI:11-3495/R.20120313.1300.001 **[网络出版时间]** 2012-03-13 13:00

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120313.1300.001.html>

### Study on Identification of Four Kinds of Gentianaceae Mongolian Medicine Digeda with DNA Barcoding

CUI Zhan-hu<sup>1,2</sup>, LI Min-hui<sup>1,2\*</sup>, YUAN Qing-jun<sup>1</sup>, WANG Zhen-wang<sup>2</sup>, LI Qian-quan<sup>1,2</sup>, ZHOU Li-she<sup>2</sup>

(1. Institute of Chinese Materia Medica, Chinese Academy of Chinese Medical Science, Beijing 100700, China;  
2. Baotou Medical College, Baotou 014060, China)

**[ Abstract ] Objective:** To establish a rapid, accurate and standardized method for identifying Gentianaceae mongolian medicine Digeda with DNA barcoding method, and to provide the basis of molecular authentication of mongolian medicine Digeda. **Method:** The mongolian medicine Digeda was amplified by PCR with universal primer and sequenced directly, the sequence was aligned and analyzed. **Result:** The complete rbcL, ITS, trnH-psbA and matK sequence of four Digeda species have been obtained, and the length of four sequences region varied from 388 to 940 bp. They were distinguished by rbcL, ITS or matK sequence. **Conclusion:** The trnH-psbA sequence was not suitable to identify the four species of Digeda. The ITS region could be a pretty good marker to distinguish mongolian medicine Digeda. DNA barcoding identification method is accurate and reliable and can be applied to identify the four kinds of Gentianaceae Digeda-species mongolian medicine materials.

**[ Key words ]** molecular identification; DNA barcoding; Digeda; mongolian medicine identification

传统蒙药的鉴定方法存在主观性较大、特异性不强、通用性差、对观察者经验的要求高等缺陷,不利于规范化、标准化方法的建立及普及。分子标记

方法具有灵敏性高、准确性好、客观性较强等优势,但普通分子标记方法同时也存在重复性差或操作复杂等的不足,限制了其推广应用<sup>[1-2]</sup>。近年来DNA

**[收稿日期]** 20111009(004)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81060372);教育部科学技术研究重点项目(211033)

**[第一作者]** 崔占虎, 硕士, 从事蒙药鉴定与资源保护研究, Tel: 010-64014411-2956, E-mail: cuizhanhu@163.com

**[通讯作者]** \*李旻辉, 博士, 教授, 从事蒙药鉴定与资源保护研究, Tel: 010-64014411-2956, E-mail: li\_minhui@yahoo.cn

条形码由于其强大的物种鉴定与发现新种的能力而引起广泛关注,基于核基因和叶绿体基因结合的 DNA 条形码技术具有很高的物种鉴定可靠性,是目前常用的物种鉴定技术手段<sup>[3]</sup>。因此, DNA 条形码技术在蒙药研究中的应用与推广,将有利于实现蒙药鉴定客观化、规范化、标准化,对推动蒙药的现代化具有重大意义<sup>[4]</sup>。

“地格达”来自印度梵语音译,蒙语为苦的意思。作为蒙医常用药之一,具有清热解毒、凉血消肿、平息“协日”,愈伤之功效。然而由于内蒙古自治区区域广阔而药用资源物种分布的区域性差异明显,游牧生产过程中迁徙频繁而就地利用药用资源等诸多原因,在蒙药材中,同一品种的名称、基源、临床功效与使用等方面因地、因人而异的现象极为普遍。“地格达”类蒙药也不例外,根据文献记载和笔者的实际调查研究,内蒙古地区作为“地格达”类蒙药使用的植物多达 7 科 30 余种<sup>[4]</sup>。龙胆科植物是“地格达”类蒙药材的主要来源之一,其中,肋柱花 *Lomatogonium rotatum* (L.) Fries ex Nym、扁蕾 *Gentianopsis barbata* (Froel) Ma、花锚 *Halenia sibirica* Borkh 为《中华人民共和国卫生部药品标准-蒙药分册》与《内蒙古蒙药材标准》的收载品种<sup>[5]</sup>;尖叶假龙胆 *Gentianella acuta* (Michx.) Hultén 为地方常用药。因此建立准确可靠的鉴定方法鉴别来源于龙胆科的“地格达”类蒙药,对于这类蒙药材进行正本清源,保障药材质量具有重要的意义。

表 1 4 种“地格达”样品采集信息及其 GenBank 注册号

名称	采集地点	序列号	rbcL	ITS	matK	trnH-psbA
<i>Gentianopsis barbata</i> (1)	内蒙古根河	GEB08	-	JN591349	JN591345	JN591357
<i>G. barbata</i> (2)	内蒙古根河	GEB09	JN591353	-	-	-
<i>Lomatogonium rotatum</i> (1)	内蒙古锡盟	LOR01	JN591355	-	-	JN591359
<i>L. rotatum</i> (2)	内蒙古锡盟	LOR02	-	JN591351	JN591347	-
<i>Halenia sibirica</i> (1)	内蒙古根河	HAS03	-	JN591350	JN591346	JN591358
<i>H. sibirica</i> (2)	内蒙古根河	HAS04	JN591354	-	-	-
<i>Gentianella acuta</i> (1)	内蒙古根河	GEA0101	-	JN591348	JN591344	-
<i>G. acuta</i> (2)	内蒙古根河	GEA0102	JN591352	-	-	JN591356
<i>G. acuta</i> (3)	内蒙古根河	GEA0201	-	-	-	-

## 2 方法

**2.1 总 DNA 的提取** 取适量的样品(约 0.03 g),研磨成细粉后,采用改良的 CTAB 法提取获得总 DNA,于 -20 ℃ 保存备用。

**2.2 引物设计** 选择目前国际推荐的通用引物:rbcL(1F/724R),ITS(ITS4/ITS5, trnH-psbA(trnH/

由于上述 4 种“地格达”药材的粉末特征及为相似,外观上难以鉴别,传统的组织形态学以及理化鉴定等方法便显出巨大的缺陷和明显地不足。因而容易出现混乱,影响药品质量。针对现状,本实验对上述 4 种龙胆科“地格达”类药用植物共计 9 份样本进行提取 DNA 并测定其序列,探讨了 DNA 条形码对龙胆科“地格达”类蒙药材的识别鉴定特性,为这类蒙药的分子鉴别提供依据。

### 1 材料

**1.1 试剂** 2 × CTAB 提取液,1 × TAE 缓冲液,琼脂糖(Promega 公司),溴化乙锭(Fluka 公司),DNA Taq 聚合酶(Takara 公司),2 000 bp DNA Marker(Takara 公司),三氯甲烷、无水乙醇、异丙醇均为国产分析纯。

**1.2 仪器** PCR 仪(①英国 Techne, Tc-512 型;②德国 Eppendorf, 5332 型;③美国 MJ, PTC-100 型),电泳系统(北京市六一仪器厂, DYY-12 型),低温冷冻离心机(德国 Eppendorf, 5810R 型),紫外凝胶成像分析仪(英国 Syngene, GBOXHR 型),混合型球磨机(德国 Retsch, MM400 型),数控超声波清洗器(KQ-500DE 型),微量移液器(德国 Eppendorf)。

**1.3 药材** 肋柱花、扁蕾、花锚为硅胶快速干燥的叶片,尖叶假龙胆两份样品为干燥原植物茎,一份为干燥的标本叶片,名称、采集地点、序列号及 GenBank 注册号见表 1。所有样品均经内蒙古科技大学包头医学院李旻辉教授鉴定。

psbA), matK(AF/8R)。

724R:5'-TCG CAT GTA CCT GCA GTA GC-3', 1F:5'-ATG TCA CCA CAA ACA GAA AC-3', ITS4:5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3', ITS5:5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3', trnH:5'-CGC GCA TGG TGG ATT CAC AAT CC-3', psbA:

5'-GTT ATG CAT GAA CGT AAT GCT C-3', AF:  
5'-CTA TAT CCA CTT ATC TTT CAG GAG T-3',  
8R:5'-AAA GTT CTA GCA CAA GAA AGT CGA-  
3'。

**2.3 DNA 扩增** ①rbcL(1F/724R)片段:反应体系总体积为 20 μL,包括 10 × buffer 缓冲液 2 μL, dNTP 1.6 μL,引物各 0.5 μL, EX *Tap* 酶 0.2 μL, DNA 0.5 μL,灭菌蒸馏水 14.7 μL.反应条件:解链温度 95 °C,时间 5 min,退火温度 56 °C,时间 30 s,复性温度 72 °C,时间为 1 min 40 s,延伸温度 72 °C,时间为 7 min,循环次数为 35 个,最后 4 °C 保存。②ITS(ITS4/ITS5)片段:反应体系同 rbcL 片段。反应条件同 rbcL 片段。③trnH-psbA(trnH/psbA)片段:反应体系同 rbcL 片段。反应条件:解链温度 94 °C,时间 4 min,退火温度 58 °C,时间 45 s,时间为 1 min 30 s,循环次数为 30 个,其他条件同 rbcL 片段。④matK(AF/8R)片段:反应体系同 rbcL 片段。反应条件:退火温度 52 °C,时间 30 s,其他条件同 rbcL 片段。

**2.4 测序** 经过 PCR 扩增后,PCR 原产物由北京擎科新业生物技术有限公司测序部测序,各样品均采用正向和反向测序,以保证测序的准确性。

**2.5 序列分析** 将 4 种药材的 9 个个体进行 rbcL, ITS, trnH-psbA, matK 4 个序列的比对分析, DNA 的序列排序用 CONTIG 软件完成,选择一条严格一致序列作为该样本的代表序列,并在 GenBank 注册,所得序列号见表 1。排序后的序列使用 BioEdit 分析软件进行分析处理。

### 3 结果

**3.1 评价 4 种 DNA 条形码序列** 从 4 个不同物种中作者获得了 9 个 rbcL 序列,9 个 ITS 序列,9 个 trnH-psbA 序列,还有 9 个 matK 序列,至于引物的通用性、PCR 扩增的成功率以及序列扩增的成功率,所用引物的每一个比例都为 100% (表 2)。通过 rbcL 引物扩增后,对齐得到 666 bp 的序列,并且没有插入或缺失,其中得到的序列通过用 CONTIG 软件和 BioEdit 分析软件进行比对分析后,找出 18 个信息位点和 19 个变异位点。对于 matK 引物序列,通过扩增后,对齐得到 934 bp 的序列,找到 65 个信息位点和 66 个变异位点。而对于 ITS 序列,对齐后得到 662 bp 的序列,进行比对分析后,找出 103 个信息位点和 105 个变异位点。

**3.2 4 种龙胆科“地格达”植物经典分类学的探讨** 通过利用 MEGA 4 软件,以 NJ 法构建系统进化

表 2 评价 4 种 DNA 通用引物

评价指标	rbcL	ITS	matK	trnH-psbA
引物通用性	通用	通用	通用	通用
PCR 扩增率/%	100	100	100	100
测序成功率/%	100	100	100	100
对齐的序列长度/bp	666	662	934	-
缺失的长度/bp	0	5(1~3)	2(9~21)	-
信息位点/变异位点	18/19	103/105	65/66	-
辨别能力/%	100	100	100	-

树。从系统进化树及序列分析可知,3 种片段扩增后所构建的 NJ 树结果相同,其中基于 ITS 序列的 4 种龙胆科“地格达”植物 NJ 系统进化树见图 1。从图 1 可以看出,4 种龙胆科“地格达”植物的分化十分明显,笔者选择的 3 个 DNA 条形码候选序列对来源于龙胆科的 4 种“地格达”类蒙药能够很好地鉴别出来。同时这与经典植物学分类是相一致的。说明该实验所用的 3 种序列是比较适合用来鉴别 4 种龙胆科“地格达”类蒙药。

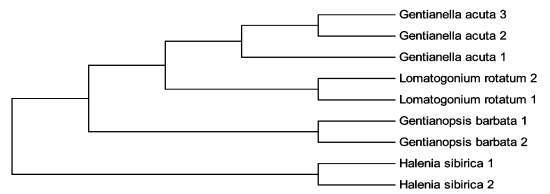


图 1 基于 ITS 序列的 4 种龙胆科“地格达”NJ 系统进化树

**3.3 matK 序列数据分析** 通过对 matK 序列进行比对分析后,发现本实验研究的 4 个种都有独特的与其他种不同的特征位点。比对出了 65 个信息位点(3~934 bp),这些位点的变化可以将本实验 4 个种很好的鉴别开来(表 3)。比如花锚与其他 3 个种有两个独特的位点(174 bp:A 或 289 bp:T),每一个都分别可以看成是一个特征的位点对于花锚。其他种的唯一的特征位点有:扁蕾(128 bp:C 或 188 bp:A),肋柱花(693 bp:T),尖叶假龙胆(165 bp:A 或 180 bp:T)。

**3.4 rbcL 序列数据分析** 通过对 rbcL 序列比对分析,发现从该序列获得的信息位点较少,共获得 18 个信息位点,但是通过这些位点的变化也可以将本实验的 4 个种进行较好的鉴别开来(表 4)。比如扁蕾(204 bp:T 或 345 bp:C),花锚(39 bp:A 或 363 bp:T),肋柱花(52 bp:C 或 654 bp:A),还有尖叶假龙胆(66 bp:G),这些位点的变化都可以把它们很好的鉴别出来。

表 3 4 种“地格达” matK 序列信息位点

Taxa(n)	128 bp	165 bp	174 bp	180 bp	188 bp	212 bp	289 bp	693 bp	818 bp
Gac(1)	A	A	T	T	C	G	G	C	T
Gac(2)	A	A	T	T	C	G	G	C	T
Gac(3)	A	A	T	T	C	G	G	C	T
Gba(1)	C	G	T	C	A	G	G	C	C
Gba(2)	C	G	T	C	A	G	G	C	C
Hsib(1)	A	G	A	C	C	G	T	C	C
Hsib(2)	A	G	A	C	C	G	T	C	C
Lrot(1)	A	G	T	C	C	-	G	T	C
Lrot(2)	A	G	T	C	C	-	G	T	C

表 4 4 种“地格达” rbcL 序列信息位点

Taxa(n)	39 bp	52 bp	66 bp	204 bp	345 bp	363 bp	420 bp	486 bp	654 bp
Gac(1)	G	T	G	C	T	C	A	C	G
Gac(2)	G	T	G	C	T	C	A	C	G
Gac(3)	G	T	G	C	T	C	A	C	G
Gba(1)	G	T	A	T	C	C	A	T	G
Gba(2)	G	T	A	T	C	C	A	T	G
Hsib(1)	A	T	A	C	T	T	G	C	G
Hsib(2)	A	T	A	C	T	T	G	C	G
Lrot(1)	G	C	A	C	T	C	A	C	A
Lrot(2)	G	C	A	C	T	C	A	C	A

**3.5 ITS 序列数据分析** 将测序得到的 9 个样品的 ITS 序列对齐比对后,获得 662 bp 长度的序列,发现该序列中的变异位点最多,其中也包括对于同一个种而言,在不同变异位点处变异的碱基是完全相同的,如扁蕾(34 bp:T 和 36 bp:T),两个位点处的碱基变化对于该种而言是完全相同的,从该序列比对结果中找出了 111 个变异位点,但是对于鉴别每个种的特征位点,总共获得了 103 个信息位点,通过这些位点碱基的变化也可以快速而又准确的将这几个种鉴别出来(表 5)。比如在位点(159 bp:A 或 530 bp:A)处,就可以把尖叶假龙胆与其他种鉴别出来,在位点 116 bp:T 或 273 bp:A 处,则可以将扁蕾鉴别出来,同样在位点 195 bp:C 或 564 bp:T 处,又可以把肋柱花同其他 3 个种鉴别开,位点 134 bp:G 或 472 bp:T 处,为花锚的特征位点,同样通过位点碱基的变化又可以把该种快速的鉴别出来。

表 5 4 种“地格达” ITS 序列信息位点

Taxa(n)	116 bp	134 bp	159 bp	195 bp	219 bp	439 bp	472 bp	530 bp	564 bp	604 bp
Gac(1)	C	T	A	T	G	T	C	A	C	C
Gac(2)	C	T	A	T	G	T	C	A	C	C
Gac(3)	C	T	A	T	G	T	C	A	C	C
Gba(1)	T	T	-	T	G	T	C	T	C	T
Gba(2)	T	T	-	T	G	T	C	T	C	T
Hsib(1)	C	G	-	T	G	C	T	T	C	T
Hsib(2)	C	G	-	T	G	C	T	T	C	T
Lrot(1)	C	T	-	C	A	T	C	T	T	T
Lrot(2)	C	T	-	C	A	T	C	T	T	T

## 4 讨论

**4.1 评价 4 个 DNA barcoding 候选序列对 4 种药材的鉴别能力** 综合上表可以看出,rbcL 序列,ITS 序列,还有 matK 序列,3 种序列都可以将本实验的 4 种龙胆科“地格达”类药材鉴别出来,而对于 trnH-psbA 序列,得到的数据不能进行 CONTIG 软件比对分析,用该引物序列扩增出的 4 个种的片段相互比较,不同的位点较其他 3 个引物序列相比非常多,无法进行序列比对,因此不适合 4 种龙胆科“地格达”类蒙药材的鉴别。然而对于另外两个叶绿体基因序列和一个核基因序列,虽然都可以将 4 种“地格达”类蒙药材鉴别出来,但是从报道和相关文献来看,rbcL 序列比较适合用于科级的鉴别,matK 序列通常用于鉴别属级的,而 ITS 序列和 trnH-psbA 序列更适合鉴别种级的不同个体<sup>[6]</sup>。本实验对于 matK 序列而言,从引物序列的扩增成功率和测序成功率来看,该引物序列同其他序列相对比较难扩增,而且双向测序也通常存在问题,目前对于 matK 序列而言,争议最大的就是该引物序列的通用性比较差<sup>[7]</sup>,虽然以往有人推荐用于属级鉴别<sup>[6]</sup>,但本实验不推荐该序列作为 4 种龙胆科“地格达”的鉴别,可以考虑作为组合的引物序列以后对“地格达”类蒙药材的多个种进行鉴别分析。rbcL 序列的变异通常存在于种以上的分类水平,该序列易扩增,同时测序的成功率也比较高,但是本实验的 4 种药材比对后发现变异位点只有 19 个,而信息位点只有 18 个,虽然能将其鉴别出来,但是特征位点比较少,有些局限。对于 ITS 序列,基因片段短,扩增和测序容易。文献报道,种内的差异小于 1%,种间差异值为 1.2%~10.2%,属间差异值为 9.6%~28.8%<sup>[8-9]</sup>。龙胆科 ITS 序列在种内不同的分布生境中均较为稳定,而

在种间却变异较大<sup>[10]</sup>。从测序结果看:4 种龙胆科“地格达”类药材的测序结果相比有较大的差异,4 种药材的 ITS 序列之间则有相当丰富的碱基缺失和变异位点。因此选择 ITS 序列来对 4 种“地格达”类蒙药材进行鉴别还是最为理想的片段之一。

**4.2 比较 GenBank 中已提交的相同种的序列** 一些学者对肋柱花、扁蕾和尖叶假龙胆 3 种“地格达”类药材提交过 GenBank 序列<sup>[11-13]</sup>,其中包括对于肋柱花提交过 matK 序列和 trnH-psbA 序列,对扁蕾提交过 trnH-psbA 序列,而对于尖叶假龙胆提交过 atpB-rbcL 序列和 trnL-trnF 序列,花锚则未见报道过。笔者分别提交了 4 种龙胆科“地格达”的 4 个序列,同时将得到的序列与 GenBank 中已经提交的相同序列进行了对比研究。对比 GenBank 中已提交的肋柱花 matK 序列,发现已提交的该序列只有 300~400 bp,而笔者提交的该序列则有 900 bp 左右,使得该物种的该序列更加完整,更方便以后对该种序列的比对分析。通过与 GenBank 中已经提交的肋柱花 trnH-psbA 序列比较之后发现,虽然都是采自同一个种,但是分别采自不同地方,用同一个引物序列扩增出来的结果也是不相同的。对于扁蕾 trnH-psbA 序列相互比较之后也能证明这一点,说明同一个种不同居群的样品扩增出来的同一引物序列也会是不相同的,因此考虑 DNA barcoding 是否可以适用于蒙药材居群水平的鉴别,还有待于进一步研究。

**4.3 利用分子手段鉴别“地格达”类蒙药的意义** “地格达”类蒙药材品种繁多,资源丰富且来源复杂,到目前为止,对其鉴别一直沿用经典的性状鉴定、显微鉴定及理化鉴定等方法。结果表明:DNA barcoding 这一高效准确的分子鉴定方法可在分子水平上解决 4 种“地格达”类蒙药材的鉴别问题。长期以来,蒙药材品种繁多、基原复杂等原因严重制约着蒙药的应用和发展,DNA barcoding 这种实用性强、准确度高的工具将在蒙药的鉴定和替代品等方面发挥重要的作用,为蒙药的正本清源提供有力的技术保障。而将 DNA 分子技术引进蒙药品种鉴定和质量标准研究也将是今后蒙药鉴定的一个新的发

展方向。

### [参考文献]

- [1] 巴根那,白明刚,包明兰. 蒙药协日嘎四味汤剂的定性鉴别研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2009,15(8):31
- [2] 何希荣. 中药材的鉴别[J]. 中国实验方剂学杂志,2008,14(4):41.
- [3] 许亮,谷丽艳,赵丹玉,等. DNA 条形码(DNA Barcoding)用于动物类中药鉴定的应用与展望[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(14):229.
- [4] 李虔全,周立社,郭兰萍,等. 分子生物学在蒙药研究中的应用[J]. 中国中药杂志,2011,36(19):14.
- [5] 布日额,其格玛,东格尔多尔吉. 蒙药地格达的本草考证[J]. 中药材,2006,29(1):80.
- [6] 闫化学,于杰. DNA 条形码技术在植物中的研究现状[J]. 植物学报,2010,45(1):102.
- [7] 曾明,马雅军,郑水庆,等. 中药葛根及其近缘种的 rDNA-ITS 序列分析[J]. 中国药学杂志,2003,38(3):173.
- [8] 任保青,陈之端. 植物 DNA 条形码技术[J]. 植物学报,2010,45(1):1.
- [9] 屈良鹄,陈月琴. 生物分子分类检索表——原理与方法[J]. 中山大学学报:自然科学版,1999,38(1):11.
- [10] 刘建全,陈之端,廖志新,等. “藏茵陈”原植物及其混淆种类的 ITS 序列比较[J]. 药学学报,2001,36(1):67.
- [11] Barbara A Whitlock, Amanda M Hale, Paul A Groff. Intraspecific inversions pose a challenge for the trnH-psbA plant DNA barcode [J]. PLoS ONE, 2010, 5(7):e11533.
- [12] Liu J Q, Zhang X L, Wang Y J, et al. Molecular phylogeny and biogeography of Gentiana sect. Cruciata (Gentianaceae) based on four chloroplast DNA datasets [J]. Taxon,2009,58(3):862.
- [13] K Bernhard von Hagen, Joachim W Kadereit. Phylogeny and flower evolution of the swertiinae (gentianaceae-gentianeae): homoplasy and the principle of variable proportions[J]. Systematic Botany,2002,27(3):548.

[责任编辑 邹晓翠]