

中药地枫皮及其伪品假地枫皮的 DNA 条形码鉴定

叶晓霞^{1*}, 王小敏¹, 陈善兰², 赵仕花¹, 吴仕蔓¹, 杨玲¹

(1. 玉林师范学院, 广西 玉林 537000; 2. 钦州合浦师范学校, 广西 钦州 535000)

[摘要] **目的:** 评价和比较几个常用 DNA 条形码候选序列对地枫皮及伪品假地枫皮的鉴定作用。**方法:** 采集不同产地的地枫皮及假地枫皮样品, 进行总 DNA 提取, 选取核基因内转录间隔区 2 (ITS2) 序列、叶绿体 *rbcL*, *matK* 基因序列进行聚合酶链式反应 (PCR) 扩增, 纯化产物测序, 利用 CondonCode Aligner V3. 7. 1 校对拼接。**结果:** 地枫皮及假地枫皮 *rbcL* 序列进行多次 PCR 扩增及测序结果均不理想, 初步推测地枫皮及假地枫皮 *rbcL* 序列太长, 进化较慢, 不适合作为地枫皮及假地枫皮种间鉴别; 地枫皮及假地枫皮的 *matK* 基因序列测序成功率分别为 0 和 76. 8%, 可能是不同类群的植物 *matK* 序列的引物标准不一; 对地枫皮及假地枫皮的 ITS2 序列 PCR 扩增及测序结果最为理想, 测序的成功率分别为 89. 3% 及 91. 2%, 对测序结果序列进行分析, 地枫皮的 ITS2 序列总长度均为 268 个碱基, 存在 2 个变异位点; 假地枫皮的 ITS2 序列总长度均为 430 个碱基, 存在 4 个或 3 个变异位点。实验结果说明地枫皮及假地枫皮 ITS2 序列较短, 有明显的变异性, 便于扩增, 表明 ITS2 序列用于地枫皮及假地枫皮的分子鉴定优于 *rbcL* 和 *matK* 序列。**结论:** ITS2 序列作为标准的 DNA 条形码能够有效地鉴定地枫皮及其伪品假地枫皮。

[关键词] 地枫皮; 假地枫皮; DNA 条形码; 分子鉴定

[中图分类号] R284. 2; R289; R22; R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)15-0185-06

[doi] 10. 13422/j. cnki. syfjx. 20191511

[网络出版地址] <http://kns. cnki. net/kcms/detail/11. 3495. r. 20190403. 1716. 013. html>

[网络出版时间] 2019-04-08 11:27

Identification of *Illicium difengpi* and Its Fake *I. jiadifengpi* Using DNA Barcoding

YE Xiao-xia^{1*}, WANG Xiao-min¹, CHEN Shan-lan², ZHAO Shi-hua¹, WU Shi-man¹, YANG Ling¹

(1. Yulin Normal University, Yulin 537000, China;

2. Qinzhou Hepu Normal School, Qinzhou 535000, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate and compare the identification of several DNA barcoding candidate sequences on *Illicium difengpi* and its fake *I. jiadifengpi*. **Method:** Samples from different origins of *I. difengpi* and *I. jiadifengpi*, were collect extraction of total DNA, nuclear gene ITS2 sequence, chloroplast *rbcL*, *matK* gene sequence were selected for PCR amplification, product purification and sequencing, and CondonCode Aligner V3. 7. 1 was used to proofread stitching. **Result:** PCR amplification and sequencing of *rbcL* sequences of *I. difengpi* and *I. jiadifengpi* were not satisfactory. It is assumed that their *rbcL* sequences were too long with slow evolution, which was unsuitable for interbreeding. The success rate of *matK* sequencing of *I. difengpi* and *I. jiadifengpi* was 0 and 76. 8%, which may be because primer standards were different for *matK* sequences of different groups. The results of PCR amplification and sequencing of ITS2 on *I. difengpi* and *I. jiadifengpi* were successful, with the success rate of sequencing was 89. 3% and 91. 2%. Analysis sequencing results, the total length of ITS2 sequences was 268 bases, and there were 2 variation sites of *I. difengpi*. The total length of ITS2 sequences was 430 bases, and there were 4 or 3 variation sites of *I. jiadifengpi*. It shows that ITS2 sequences of *I. difengpi* and *I. jiadifengpi* were short and has obvious variability and can be amplify, that ITS2 sequence was

[收稿日期] 20190402(005)

[基金项目] 广西高校科研项目 (KY2015YB245); 玉林师范学院高等教育本科教学改革工程项目 (2018XJJG38)

[通信作者] * 叶晓霞, 硕士, 讲师, 主要从事植物分类学及资源学研究, Tel: 0775-2679937, E-mail: yexiaoxia1015@163. com

better than *rbcL* and *matK* sequence in molecular identification of *I. difengpi* and *I. jiadifengpi*. **Conclusion:** DNA barcoding based on ITS2 sequence was a powerful and efficient tool for identification of *I. difengpi* and its fake *I. jiadifengpi*.

[**Key words**] *Illicium difengpi*; *Illicium jiadifengpi*; DNA barcoding; identification

地枫皮又名枫榔、追地风、钻地风、山八角,为八角科八角属植物,属国家 II 级重点保护野生植物^[1]。地枫皮是历版《中国药典》收录的广西特产中药材,是多种中成药产品的主要原材料,具有祛风除湿,行气止痛等功效,可用于治疗风湿痹痛,腰肌劳损等^[2-3]。地枫皮的生长环境恶劣,仅分布在广西西南部石灰岩山区,通常生长在悬崖峭壁石山山顶^[4]。随着其需求量不断增加,地枫皮资源日益减少,因而市场上出现地枫皮的混伪品的数量和种类也越来越混杂,目前市场上出现最多的伪品地枫皮为假地枫皮。假地枫皮和地枫皮在形态上较相似,尤其是可入药的根茎经过加工后,更难以通过形态特征鉴别,用伪品假地枫皮替代地枫皮,在药效上相差甚远,甚至造成中毒事故^[5]。而传统的形态鉴定、显微鉴定和理化鉴定等方法^[6-11],由于鉴定人的主观因素、植物不同的生长环境、药粉直径大小等因素的影响,其鉴定结果缺乏准确性,因此急需寻求一种快捷且准确的新方法来鉴定中药地枫皮及伪品假地枫皮,为其的安全使用提供保障。

DNA 条形码技术是近年来在物种鉴定领域发展的一种新方法。2003 年,由加拿大动物学家等提出^[12],即通过比较一段通用 DNA 片段,对物种进行快速、准确的识别和鉴定。陈士林等首次提出将内转录间隔区 2 (ITS2) 序列作为药用植物鉴定的通用条形码^[13]。目前,此技术已广泛应用在植物分类、中药材鉴定等方面,并且在姜科 (Zingiberaceae)^[14],五味子 (*Schisandra chinensis*)^[15],千斤拔属 (*Flemingia*)^[16],威灵仙 (*Clematis chinensis*)^[17],黄芩 (*Scutellaria baicalensis*)^[18] 等植物上得到验证,也得到了国内外同行专家的认可。总结前人的研究成果,中药材 DNA 条形码的分子鉴定基本是以 ITS2 序列为核心,*psbA-trnH*,*rbcL*,*matK* 序列为辅的植物 DNA 条形码鉴定体系^[19],如基于 *matK* 序列对几种重要大戟科 (Euphorbiaceae) 植物系统发育进行研究^[20],利用 *rbcL* 条形码对鸡血藤 (*Kadsura interior*) 进行真伪鉴别^[21],利用 *psbA-trnH* 基因序列对中药材茜草 (*Rubia cordifolia*) 进行分子鉴定^[22]。因此,为了评价和比较几个常用 DNA 条形码候选序列对地枫皮及伪品假地枫皮的鉴定作用,本研究对地枫

皮及假地枫皮共 25 份样品的 ITS2 序列,*rbcL* 和 *matK* 3 条序列进行 PCR 扩增和测序,比较各序列扩增和测序的成功率,筛选出快速、准确的 DNA 条形码用于地枫皮及假地枫皮的分子鉴定。

1 材料

地枫皮样品采自于广西靖西、平果、马山、龙州、那坡,共计 16 份样品,假地枫皮采自于广西桂林银竹老山、桂林千家洞、桂林雁山,共计 9 份样品。所有样品经玉林师范学院朱宇林教授鉴定,凭证标本保存于玉林师范学院生物与制药学院植物学标本室。见表 1。

表 1 地枫皮及假地枫皮来源

Table 1 Origin of materials of *Illicium difengpi* and *I. jiadifengpi*

样品	拉丁名称	采集地	采集号	份数
地枫皮	<i>Illicium difengpi</i>	马山	Ye1206	3
地枫皮	<i>I. difengpi</i>	平果	Ye450	3
地枫皮	<i>I. difengpi</i>	靖西	Ye228	3
地枫皮	<i>I. difengpi</i>	那坡	Ye245	4
地枫皮	<i>I. difengpi</i>	龙州	Ye322	3
假地枫皮	<i>I. jiadifengpi</i>	桂林银竹老山	Ye831	3
假地枫皮	<i>I. jiadifengpi</i>	桂林千家洞	Ye877	3
假地枫皮	<i>I. jiadifengpi</i>	桂林雁山	Ye936	3

TaKaRa MiniBEST Plant Genomic DNA Extraction 试剂盒, DNA Marker DL5000 (宝生物工程公司,批号 AHE4572A, AHF1916A)。Taq DNA Polymerase (上海生物工程有限公司,批号 B500010-0005),引物由上海生物工程有限公司合成。快速琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 (北京康为世纪生物科技有限公司,批号 BS351)。Trans2K plus DNA Marker (北京全式金公司,批号 BM111)。

Trio 型聚合酶链式反应 (PCR) 仪 (TPProfessional), DYY-12 型电泳系统 (北京市六一仪器厂), VILBER Infinity CX5 型凝胶成像系统 (北京五洲东方), Hiseqxten 型测序仪 (Illumina 公司), MIKRO220R 型高速冷冻离心机 (德国 Hettich 公司)。

2 方法

2.1 DNA 提取 选取各产地干燥的地枫皮和假地

枫皮叶子样品, 基于 TaKaRa MiniBEST Plant Genomic DNA Extraction 试剂盒的方法提取总 DNA, 具体操作方法按试剂盒说明书。

2.2 PCR 扩增 本实验选用核基因组 DNA 的 ITS2 序列、叶绿体基因组 DNA 的 *rbcL* 和 *matK* 3 条 DNA 条形码序列进行了扩增, 引物参照相关文献^[23-25], 各引物序列见表 2。不同序列的 PCR 扩增体系及程序参考相关文献进行。PCR 反应条件: 98 ℃ 预变性 5 min, 94 ℃ 变性 5 min, 55 ℃ 退火 1 min, 72 ℃ 延伸 1 min, 30 个循环, 72 ℃ 终延伸 10 min。

表 2 候选条形码片段扩增引物

Table 2 Primers for each candidate barcoding sequences amplification

基因名称	引物名称	引物序列(5'-3')
ITS	ITS2-F	ATGCCGATACTTGGTGTGAAT
	ITS2-R	GACGCTTCTCCAGACTACAAT
<i>matK</i>	<i>matK390F</i>	CGATCTATTCAATCAATATTTTC
	<i>matK1326R</i>	TCTAGCACACGAAAGTCGAAGT
<i>rbcL</i>	<i>rbcL-F</i>	ATGTCACCACAAACAGAAGCT
	<i>rbcL-R</i>	GATTGGGCCGAGTTTAATTAC

2.3 琼脂糖凝胶电泳 PCR 扩增产物以 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 根据溴酚蓝指示剂的位置来判断电泳程度, 待蓝色指示条带泳动到胶块三分之二时结束电泳, 凝胶成像分析系统分析。

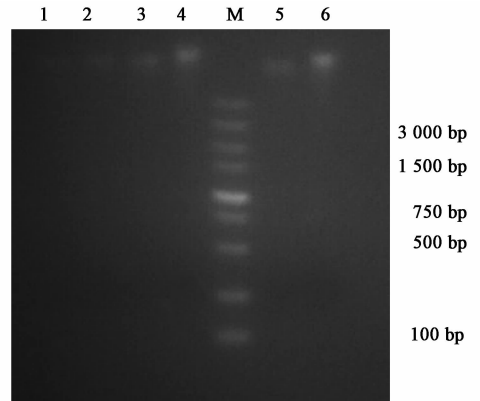
2.4 DNA 片段回收和测序 经电泳后, 割取带 DNA 片段的胶。使用康为世纪的快速琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒进行胶回收, 详细操作步骤参见回收试剂盒说明书, 回收产物送往上海生工进行双向测序。

2.5 数据处理 测序所得的峰图利用 CondonCode Aligner V3. 7. 1 (CondonCode Co., USA) 校对拼接, 去除低质量序列及引物区, 利用 ClustalX V2. 0 进行多序列比对并查错, 可用数据纳入后续分析。所得序列与 GenBank 数据库下载的序列利用 ClustalX 进行比对。

3 结果与分析

3.1 定性分析 对 5 个不同产地的地枫皮和 3 个不同产地的假地枫皮叶片样品提取了总 DNA, 部分样品电泳鉴定图见图 1, 地枫皮与假地枫皮的 DNA 长度均大于 5 000 bp, 与预期片段长度相符。从图 1 可见, 部分样品的条带单一、清晰, DNA 降解较少,

纯度较高, 可用于后续的实验。



1. 地枫皮(那坡); 2. 地枫皮(龙州); 3. 地枫皮(靖西); 4. 假地枫皮(桂林雁山); 5. 地枫皮(平果); 6. 假地枫皮(桂林千家洞); M. DNA Marker DL5000

图 1 部分地枫皮及假地枫皮样品 DNA 凝胶电泳

Fig. 1 Electrophorogram of genomic DNA extracted of partial *Illicium difengpi* and *I. jiadifengpi*

3.2 不同序列的 PCR 扩增结果 挑选出条带较完整清晰的 DNA 样品, 以 ITS2, *rbcL*-F/R, *matK390F* 和 *matK1326R* 作为引物进行 PCR 扩增。结果显示, 以通用引物 ITS2 扩增的 rDNAITS, 地枫皮及假地枫皮的扩增片段长度约 600 bp, 条带清晰、完整、无拖尾, 部分样品的 PCR 产物电泳图见图 2。叶绿体基因组 DNA 的 *rbcL* 序列部分样品扩增结果见图 3, 利用 *rbcL*-F 和 *rbcL*-R 作为引物, 经过多次实验均扩增不出条带, 不符合测序要求, 需要进一步回收与纯化。利用 *matK390F* 和 *matK1326R* 引物对部分样品的 *matK* 基因序列扩增结果, 从图 4A 可见, 1 号的条带较暗但条带单一, 2 号条带清晰、明亮、单一, 3 号未能检测出条带。图 4B 显示, 2 号有特异性条带且条带单一, 1 号无条带。需要进一步对目的条带进行回收与纯化。

3.3 DNA 回收检测 对采集的样本进行 PCR 扩增后进一步的回收与纯化, 割下的凝胶利用 DNA 回收试剂盒(康为世纪)纯化目的片段, 再次电泳检测回收结果, 回收结果符合测序要求, 部分样品 DNA 回收电泳见图 5。

3.4 序列测定 对 5 不同个产地的地枫皮和 3 个不同产地的假地枫皮, 共 25 个样品, 用 3 条候选序列进行 PCR 扩增, 经回收后送上海生工进行双向测序。结果发现地枫皮的 *matK*, *rbcL*, ITS2 序列的测序成功率分别为 0, 0 和 89. 3%; 假地枫皮的 *matK*, *rbcL*, ITS2 序列的测序成功率分别为 76. 8%, 0 和 91. 2%, 部分样品测序的序列峰图如图 6, 7。图中

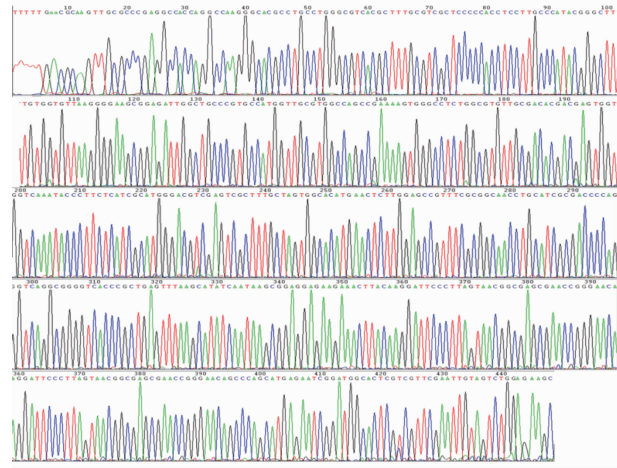


图 7 假地枫皮 ITS2 序列峰

Fig. 7 ITS2 sequence peak map of *Illicium jiadifengpi*

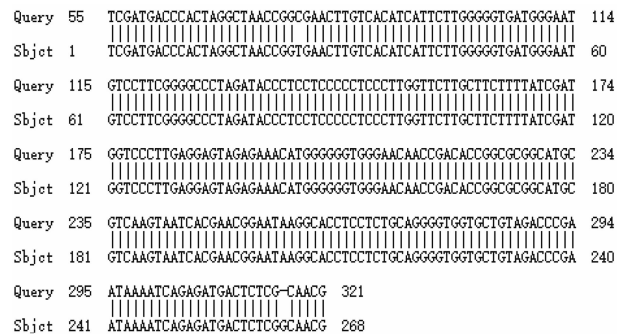


图 8 地枫皮及其对应基原的 ITS2 序列比对

Fig. 8 Result map of ITS2 sequence alignment of *Illicium difengpi* and its corresponding primordium

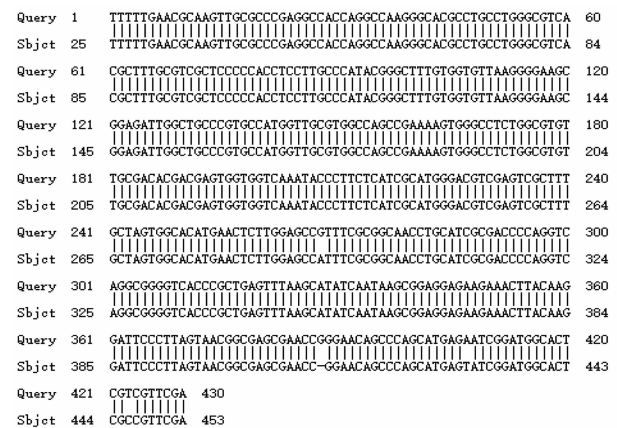


图 9 假地枫皮及其对应基原的 ITS2 序列比对

Fig. 9 Result map of ITS2 sequence alignment of *Illicium jiadifengpi* and its corresponding primordium

地的地枫皮和 3 个不同产地的假地枫皮共 25 份样品的叶绿体的 *matK*, *rbcL* 基因序列及核基因 ITS2 序列进行 PCR 扩增和测序,比较各序列扩增成功率

及测序成功率,评价 3 个不同序列的鉴定能力。

综合分析实验结果发现,地枫皮及假地枫皮是一种含多糖、酚类物质的植物,会干扰 DNA 的提取。在实验中为了获得高质量的 DNA,在试剂盒法的基础上进行了改良,由于地枫皮及假地枫皮采集的困难性,所以将样品由硅胶干燥保存的方法改进为液氮速冻后再保存于 - 80 °C 冰箱保存;在加 Buffer WB 后静置 5 min 左右,有助于提高洗涤效果,同时适当延长 56 °C 水浴时间,使细胞充分裂解;在加入 Elution Buffer 前将其 56 °C 预热,也有助于提高 DNA 提取效率。

rbcL 基因序列位于叶绿体基因编码区,具有易扩增、易对比等特点,被建议作为植物 DNA 条形码候选序列之一^[26]。但在本研究中,对地枫皮及假地枫皮 *rbcL* 序列进行多次 PCR 扩增及测序,实验结果均不理想,推测地枫皮及假地枫皮 *rbcL* 序列太长,进化较慢,不适合作为地枫皮及假地枫皮种间鉴别,建议与其他序列组合使用。*matK* 序列也是叶绿体基因组中进化速率较快,种间差异较高的 DNA 序列,可单独作为植物分子鉴定的 DNA 条形码^[27]。本研究中,以 *matK* 序列进行 PCR 扩增及测序,地枫皮及假地枫皮都能完成 PCR 扩增,但在多次的测序结果中,只有假地枫皮 *matK* 序列成功完成了测序,地枫皮 *matK* 序列测序不成功,说明了本研究中所用的 *matK* 序列引物不能扩增地枫皮的 *matK* 基因片段,进一步验证了方强强等提出的 *matK* 序列作为叶绿体 DNA 条形码有很好的鉴别能力,但不同类群的植物 *matK* 序列的引物标准不一,难以找到通用引物的观点^[19],可继续深入研究。核基因组含有丰富的 DNA 序列,ITS 序列满足了 DNA 条形码进化速率快、有足够变异位点的标准,而 ITS2 序列更是国内外许多专家学者选择作为 DNA 条形码鉴别物种的研究^[28]。对地枫皮及假地枫皮的 ITS2 序列 PCR 扩增及测序结果最为理想,扩增得到的条带清晰,测序的成功率分别为 89.3% 及 91.2%,说明地枫皮及假地枫皮 ITS2 序列较短,有明显的变异性,便于扩增,表明 ITS2 序列用于地枫皮及假地枫皮的分子鉴定优于 *rbcL* 和 *matK* 序列。因此,ITS2 序列可用于地枫皮及伪品假地枫皮的鉴定,为中药地枫皮的分子鉴定及候选序列提供参考和依据。

[参考文献]

[1] 王洪禄,何永志,史利利,等.地枫皮研究进展[J].实用中医药杂志,2011,27(8):577-578.

- [2] 黄宝优,吴庆华,柯芳. 中药地枫皮的研究概况[J]. 大众科技,2008(1):126,117.
- [3] 刘元,韦焕英,姚树汉,等. 地枫皮类药理作用研究[J]. 湖南中医药导报,1997(Z1):72-75.
- [4] 唐辉,史艳财,孔德鑫,等. 岩溶特有植物地枫皮的种质资源调查及地理分布[J]. 广东农业科学,2011,38(12):113-117.
- [5] 梁惠凌,王满莲,孔德鑫,等. 地枫皮及其伪品假地枫皮的研究进展[J]. 广西科学院学报,2013,29(3):164-168.
- [6] 陈瑞生,陈相银,张露露. 地枫皮真伪鉴别[J]. 首都医药,2013,20(17):41.
- [7] 孔德鑫,李雁群,梁惠凌,等. 地枫皮营养器官解剖结构特征及其叶片结构的生态适应性[J]. 基因组学与应用生物学,2012,31(3):282-288.
- [8] 孔德鑫,唐辉,韦霄,等. 中药地枫皮及其伪品的 FTIR 分析与鉴定[J]. 光谱实验室,2010,27(6):2417-2421.
- [9] 高秀清,刘敏,李永升. 地枫皮与其伪品的鉴别[J]. 时珍国医国药,2002,13(11):665-666.
- [10] 赖茂祥,饶伟源,杨敏,等. 地枫皮及其混伪品的生药鉴别[J]. 中药材,1997(12):601-604.
- [11] 梅学伟,刘艳新,门婧,等. 地枫皮与伪品地枫皮的 UV 光谱鉴定[J]. 中医药信息,1995(3):40.
- [12] Schmidt G J, Schilling E E. Phylogeny and biogeography of *Eupatorium* (Asteraceae: eupat orieae) based on nuclear ITS sequence data [J]. Amer J Bot, 2000, 87: 716-726.
- [13] CHEN S L, YAO H, HAN J P, et al. Validation of the ITS2 region as a novel DNA bar code for identifying medicinal plant species [J]. PLoS One, 2010, 5 (1): e8613.
- [14] 任瑶瑶,江南屏,张良,等. 峨嵋山区姜科药用植物 ITS2 序列分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(1):217-223.
- [15] LI X K, WANG B, HAN R C, et al. Identification of medicinal plant *Schisandra chinensis* using a potential DNA barcode ITS2 [J]. Acta Soc Bot Pol, 2013, 82 (4): 283-288.
- [16] 张忠廉,宋美芳,李海涛,等. 千斤拔属药用植物 DNA 条形码鉴定研究[J]. 中草药,2015,46(1):118-122.
- [17] 冯杉杉,郑司浩,李亚康,等. 中药材威灵仙及其伪品 DNA 条形码鉴别研究[J]. 药学学报,2014,49(2):260-266.
- [18] 夏至,冯翠元,高致明,等. 黄芩及其同属近缘种的 DNA 条形码鉴定研究 [J]. 中草药, 2014, 45 (1): 107-112.
- [19] 方强强,王燕,彭春,等. 中药 DNA 条形码分子鉴定技术的应用与展望[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(22):197-205.
- [20] 王海燕,刘石生,文明富,等. 基于 *matK* 序列的几种重要大戟科植物系统发育初步研究[J]. 热带作物学报,2011,32(4):715-719.
- [21] 黄琼林,马新业,詹若挺,等. 基于 *rbcL* 条形码的鸡血藤真伪鉴别[J]. 江苏农业科学,2016,44(6):57-60.
- [22] 夏至,王璐静,李贺敏,等. 基于 *psbA-trnH* 基因序列对中药材茜草的分子鉴定[J]. 时珍国医国药,2016,27(2):374-376.
- [23] 杨慧洁,杨世海,张淑丽,等. 药用植物 DNA 条形码研究进展[J]. 中草药,2014,45(18):2581-2587.
- [24] 刘义梅. 杜鹃花属药用植物 DNA 条形码的鉴定研究 [D]. 武汉:湖北中医药大学,2011.
- [25] 李保进. 叶籽银杏 *matK* 和 ITS 序列分析及系统发育研究 [D]. 泰安:山东农业大学,2008.
- [26] Kress W J, Wurdack K J, Zimmer E A, et al. Use of DNA barcodes to identify flowering plant [J]. PNAS, 2005 (102): 8369-8374.
- [27] 谢伟玲,邹蓉,杨雪,等. 珍稀濒危植物 DNA 条形码研究进展[J]. 北方园艺,2015(4):178-183.
- [28] 费希同,巨苗苗,林源,等. ITS2 序列在植物 DNA 条形码鉴定中的应用(综述)[J]. 亚热带植物科学,2014,43(4):339-342.

[责任编辑 顾雪竹]