

基于GenBank核酸数据库ITS2序列鉴定一枝蒿与其混淆品种^Δ

刘冲*, 杨伟俊#, 顾政一, 薛文采, 程波, 何江, 地力努尔·吐尔逊江(新疆维吾尔自治区药物研究所/新疆维吾尔药重点实验室, 乌鲁木齐 830004)

中图分类号 R284.1;R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)03-0278-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.03.28

摘要 目的:利用GenBank核酸数据库中ITS2序列鉴定维吾尔传统药材一枝蒿与其混淆品种。方法:提取一枝蒿药材基因组DNA、扩增ITS2序列并测序,采用CodonCode Aligner V3.0对测序峰图进行校对拼接,并提交至GenBank核酸数据库;运用分析相似性搜索法(BLASTI)进行序列鉴定,下载易混淆品种的ITS2序列,再应用MEGA5.0软件计算种内种间(K2P)遗传距离和构建邻接(NJ)系统聚类树。结果:一枝蒿与其混淆品种之间的K2P遗传距离分布于0.019~0.254之间,远大于一枝蒿种内遗传距离(0.008);NJ系统聚类树结果表明能将一枝蒿与其混淆品种区分开来,单独聚为一类。结论:ITS2序列适用于维吾尔药材一枝蒿与其混淆品种的鉴别,可为一枝蒿的质量和用药安全提供鉴定依据。

关键词 一枝蒿;ITS2序列;DNA条形码;混淆品种;鉴别

Identification of *Artemisia rupestris* and Its Confusable Species Based on GenBank Nucleotide Database ITS2 Sequence

LIU Chong, YANG Wei-jun, GU Zheng-yi, XUE Wen-cai, CHENG Bo, HE Jiang, Dilinuer·Tursunjiang(Xinjiang Institute of Materia Medica/Key Laboratory of Xinjiang Uygur Medicine, Urumqi 830004, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To identify *Artemisia rupestris* and its confusable species by using GenBank nucleic acid database ITS2 sequence. METHODS: Total genomic DNA was isolated from *A. rupestris*, and nuclear DNA ITS2 sequences were amplified; DNA sequencing were collated and matched by using CodonCode Aligner V3.0 and submitted to GenBank nucleic acid database. Identification analysis was performed with BLASTI, and ITS2 sequences of confusable species were downloaded. K2P Distances were calculated using MEGA 5.0 software and neighbor-joining (NJ) phylogenetic tree was established. RESULTS: K2P genetic distance between *A. rupestris* and confusable species ranged from 0.019 to 0.254, which was far more than intraspecific genetic distance of *A. rupestris* (0.008). Results of NJ phylogenetic tree showed that *A. rupestris* can be separated from its confusable species and classified into a separate one. CONCLUSIONS: DNA ITS2 sequence is suitable for the identification of *A. rupestris* and its confusable species and provides reference for quality and safety identification of *A. rupestris*.

KEYWORDS *Artemisia rupestris*; ITS2 sequence; DNA bar-coding; Confusable species; Identification

一枝蒿(*Artemisia rupestris* L.)为菊科(Compositae)蒿属植物,主产于新疆境内的天山、阿尔泰山和昆仑山脉的森林草原地带^[1]。一枝蒿药用地上部分,是维吾尔族和哈萨克族习用药材,具有抗炎、抗肿瘤、抗过敏、活血、保肝、解蛇毒等诸多功效^[1],故新疆民间流传“家有一枝蒿,百病都除掉”的谚语^[2]。

自古以来,新疆少数民族游牧迁徙都是以蒿草的分布来选择定居和放牧地点。蒿属在新疆分布有52种^[3],其中有多种植物可药用,如:湿地蒿(*A. tournefortiana*)具有清热、解毒、消炎、止血之功效;野艾蒿(*A. lavandulaefolia*)通常用来散寒、祛湿、温经、止血;北艾(*A. vulgaris*)常作妇科用药;中亚苦蒿(*A. absinthium*)全草入药,有消炎、健胃、驱虫之效^[4]。近年来,过

度的放牧和开采致使蒿属资源储量急剧下降,少数种如一枝蒿等已濒临灭绝。由于资源的匮乏和地区用药习惯,导致在不同地区出现了等同入药的现象^[5],药材市场上代用、误用现象屡屡发生,严重影响其药效及用药安全。因此,有必要准确鉴别一枝蒿药材及其同属密切相关种,以确保安全用药。

本课题组前期基于花粉形态学对主要蒿属植物进行了鉴定^[4],该方法可以有效鉴别带花粉的原植物和药材,但对于大多数药材而言,植物花粉常常在采收和运输中损失殆尽,作为药材通用鉴别方法尚存缺陷。目前,运用DNA条形码来作为药材鉴定方法已成为研究热点,在物种鉴定方面显示出巨大的应用前景^[6],其中ITS2序列成功地已应用于小茴香^[7]、麻黄^[8]、薄荷^[9]等与其混淆品的鉴定。本课题组应用ITS2条形码对一枝蒿药材及其混淆品进行鉴定研究,旨在为一枝蒿的快速准确鉴定及其安全应用提供科学依据和保障。

1 材料与方法

1.1 样本

本研究共包含来自5个物种的19个样本(19条种内序

^Δ 基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金面上项目(No. 2013211A109)

* 助理研究员。研究方向:中药质量控制和分子评价。E-mail: liu_chong02@163.com

通信作者:副研究员。研究方向:药材资源与药物研究。电话: 0991-2320292。E-mail: wilfred3106@163.com

列),包括实验样品及 GenBank[GenBank 为美国国家生物技术信息中心(NCBI)建立的 DNA 序列数据库]下载序列。其中,一枝蒿药材包含 3 个基原物种,总共 6 个样本;其余样本为一枝蒿的同属混淆品种。所有样本由新疆维吾尔自治区药物研究所何江副研究员鉴定,凭证标本保存于该单位。样品采集信息及 ITS2 GenBank 登录号见表 1。

表 1 样品采集信息及 ITS2 GenBank 登录号

Tab 1 Sample information and ITS2 GenBank accession number

种名	拉丁学名	采集地	GenBank 登录号
一枝蒿	<i>A. rupestris</i>	新疆伊犁果子沟	KC461127
一枝蒿	<i>A. rupestris</i>	新疆伊犁果子沟	KC461126
一枝蒿	<i>A. rupestris</i>	新疆阿尔泰吉木乃	KC461128
一枝蒿	<i>A. rupestris</i>		AF061391.1
一枝蒿	<i>A. rupestris</i>		AJ297261.1
一枝蒿	<i>A. rupestris</i>		JN861964.1
湿地蒿	<i>A. tournefortiana</i>		AF079936.1
野艾蒿	<i>A. lavandulaefolia</i>		GQ436484.1
野艾蒿	<i>A. lavandulaefolia</i>		GQ436036.1
野艾蒿	<i>A. lavandulaefolia</i>		GQ435131.1
北艾	<i>A. vulgaris</i>		AF079938.1
北艾	<i>A. vulgaris</i>		AF061389.1
北艾	<i>A. vulgaris</i>		AM398927.1
北艾	<i>A. vulgaris</i>		AY180199.1
北艾	<i>A. vulgaris</i>		AF079937.1
中亚苦蒿	<i>A. absinthium</i>		AF079946.1
中亚苦蒿	<i>A. absinthium</i>		AF079946.1
中亚苦蒿	<i>A. absinthium</i>		EF577289.1
中亚苦蒿	<i>A. absinthium</i>		JN861898.1

1.2 DNA 提取、PCR 扩增和测序

取样本各约 10 mg,于液氮冷冻后研磨成细粉,采用植物 DNA 提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]提取总 DNA。PCR 反应体积为 25 μ l,PCR 扩增程序、反应体系以及 ITS2 所用通用引物扩增参考文献^[10]方法。PCR 产物经纯化后,由北京华大基因公司进行双向测序。

1.3 序列处理

应用 Codon Code Aligner V3.0 软件对测序峰图进行校对拼接,去除低质量序列及引物区,获得 ITS2 序列。将基原物种一枝蒿的 ITS2 序列提交至 GenBank 核酸数据库,与其密切相关种的序列鉴定运用分析相似性搜索法(BLASTI),下载在 GenBank 核酸数据库比对相似度达到 99% 的序列。利用 NCBI 虚拟 PCR,引物为 ITS2,除去两端多余的序列,待用。

1.4 数据分析

利用 MEGA5.0 软件进行种内种间 Kimura 2-parameter (K2P)遗传距离分析。采用 BLAST1、最近距离法(Nearest distance)及构建邻接(NJ)系统聚类树对一枝蒿药材及其同属密切混淆种进行鉴定分析。

2 结果

2.1 序列分析

一枝蒿等 5 种原植物的 19 条 ITS2 序列分析结果表明:序列长度在 217~248 bp 之间;气相色谱(GC)分析各序列的差异较小,平均为 32.8%,其中北艾 *A. vulgaris* 最高,平均为 41.4%。经过分析查找发现,5 种原植物的 19 条 ITS2 序列均含有 3 个 Poly C 和 1 个 Poly G 结构。

2.2 种内种间分析

各样本种内种间分析结果表明,一枝蒿基原物种 6 个样本的种内变异较小,K2P 平均遗传距离分为 0.008;但基原物种与混淆种之间的变异位点较多,K2P 遗传距离分布于 0.019~0.254 之间,平均遗传距离为 0.076,远大于一枝蒿种内遗传距离。因此,ITS2 序列能够将一枝蒿与混淆种区分开。各样本 ITS2 序列的种间遗传距离见表 2。

表 2 各样本 ITS2 序列的种间遗传距离

Tab 2 K2P genetics distance of inter-specific ITS2 sequence

样本	<i>A. lavandulifolia</i>	<i>A. absinthium</i>	<i>A. tournefortiana</i>	<i>A. vulgaris</i>	<i>A. rupestris</i>
<i>A. rupestris</i>	0.019				
<i>A. lavandulifolia</i>	0.035	0.043			
<i>A. absinthium</i>	0.086	0.032	0.039		
<i>A. tournefortiana</i>	0.132	0.039	0.031	0.085	
<i>A. vulgaris</i>	0.254	0.028	0.028	0.072	0.041

2.3 系统聚类树鉴定结果

根据参比序列的评价筛选标准,本课题组对一枝蒿药材的 3 种基原植物进行 ITS2 序列测定,并在 GenBank 核酸数据库中注册,注册号分别为 KC461127、KC461126、KC461128。采用 BLASTI 在 GenBank 核酸数据库中比对下载相似度较高的同属植物密切相关种,如湿地蒿、野艾蒿、北艾、中亚苦蒿的 ITS2 序列,运用 Meg 5.0 软件构建 NJ 系统聚类树,详见图 1。

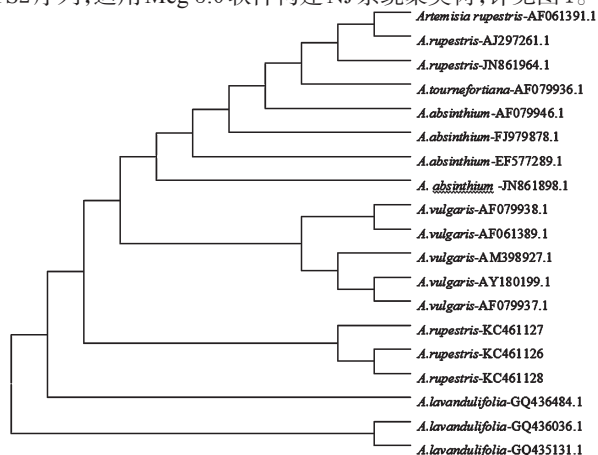


图 1 基于 NJ 法构建 ITS2 序列的一枝蒿药材与其混淆相关种的系统聚类树

Fig 1 Phylogenetic tree of *A. rupestris* and its confusable species based on NJ method

由图 1 可知,ITS2 条形码可将一枝蒿药材单独聚为一类;一枝蒿和湿地蒿、中亚苦蒿亲缘关系较近,可单独聚在一起。一枝蒿的 ITS2 序列聚类图与其他混淆种没有交叉,能够明显区分开,表明 ITS2 序列可准确鉴别一枝蒿药材正品及其混淆相关种。

3 讨论

Gao T 等^[10]对菊科植物 3 490 个样本进行分析后,提出了 ITS2 可以作为菊科通用鉴定条形码的结论;但其对属属 91 份样本的鉴定率仅为 59.3%。本研究运用分子生物学的手段鉴定了新疆维吾尔医习用药材一枝蒿 (*A. rupestris*) 及其混淆品湿地蒿 (*A. tournefortiana*)、野艾蒿 (*A. lavandulaefolia*)、北艾 (*A. vulgaris*)、中亚苦蒿 (*A. absinthium*) 基原植物核基因组 ITS2 序列的 K2P 遗传距离,并根据遗传距离建立了正品和混淆品的系统聚类树,为一枝蒿及其混淆品的鉴别提供了分子水平的鉴定依据。

中药制剂质量控制研究的发展趋势

梁小银^{1*}, 陈少旭¹, 吴 垠²(1.佛山市中医院三水医院, 广东 佛山 528100; 2.广东省食品药品检验所, 广州 510180)

中图分类号 R284.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)03-0280-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.03.29

摘要 目的:探讨中药制剂质量控制研究的发展趋势。方法:查阅近年有关中药制剂质量控制研究的相关文献,对其研究现状进行评述,总结与归纳中药制剂质量控制的新技术和新方法。结果:目前以单一化学指标成分为中心的质量控制模式已不适合中药现代化发展要求,而以多指标成分和生物活性测定的质量控制模式成为其新的发展趋势。结论:多指标成分和生物活性测定的质量控制模式能较为真实地反映中药制剂的“内在”“综合”质量,能更好地确保民众用药安全、有效。

关键词 中药制剂;质量控制;研究方法;发展趋势

中药在我国医疗卫生事业中扮演着极其重要的角色,对中华民族的繁荣昌盛做出了巨大贡献。以中医药理论为指导,中药材为原料,按一定处方和工艺加工制成的中药制剂,在临床上更是以其疗效独特、毒副作用少、服用方便等优势日益受到世人关注。中药制剂质量的优劣直接影响到临床用药的安全性和有效性,也关系到患者的健康和生命,因此必须建

立严格的质量控制标准。然而,目前我国中药质量控制的基本模式大多是参照国外植物药的质量控制方法、借鉴化学药品的质量控制模式建立的,即通过测定某一“指标成分”“有效成分”或“活性成分”建立相应的定性、定量标准来控制中药制剂的质量。对于化学药品,因其结构清楚、构效关系明确,有效性和安全性与该药品的成分直接相关,所以其质量控制中

之前,本课题组通过市场调研和民族医院走访,发现流通的一枝蒿药材均来源自该属植物的全草,而切断后得到饮片很容易掺假或混伪,其特征和《维吾尔药志》、《新疆维吾尔药材质量标准》记载的一枝蒿药材的性状、显微特征极其相近,难以区分,容易混为正品药材使用;但其化学成分有很大差异,临床疗效和功能主治也不尽相同。传统的鉴定方法容易受环境、植物生长发育等外在条件的影响,具有较大的主观性;本课题组运用ITS2条形码鉴定一枝蒿及其混淆品,具有通用性好、重复性高、易于推广和标准化等独特优势^[11-15],故建议用本方法鉴定蒿属植物。

参考文献

[1] 刘勇民. 维吾尔药志[M]. 乌鲁木齐:新疆科技卫生出版社, 1999: 1-2.
[2] 盛萍. 新疆一枝蒿体外抗肿瘤物质基础及制备工艺研究[D]. 乌鲁木齐:新疆医科大学, 2008.
[3] 安争夕, 魏岩. 新疆植物志:第五卷[M]. 乌鲁木齐:新疆科技卫生出版社, 1999: 153-178.
[4] 杨伟俊, 何江, 罗玉琴, 等. 维吾尔药材龙蒿、黄花蒿、野艾蒿的鉴别研究[J]. 中国民族医药杂志, 2011, 17(9): 67.
[5] 刘冲, 杨伟俊, 顾政一, 等. 维吾尔药材易混品种整理及分子生物学应用的研究进展[J]. 西北药学杂志, 2013, 28(4): 440.
[6] Yao H, Song JY, Liu C, *et al.* Use of ITS2 region as the universal DNA barcode for plants and animals [J]. *PLoS*

ONE, 2010, 5(10): e13 102.
[7] 刘义梅, 罗焜, 陈科力, 等. ITS2序列鉴定小茴香及其常见混伪品[J]. 环球中医药, 2011, 4(4): 260.
[8] 庞晓慧, 宋经元, 徐海滨, 等. 应用ITS2条形码鉴定中药材麻黄[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(8): 1 118.
[9] 庞晓慧, 徐海滨, 韩建萍, 等. 中药材薄荷的DNA条形码鉴定研究[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(8): 1 114.
[10] 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.
[11] Hebert PD, Cywinska A, Ball SL, *et al.* Biological identifications through DNA barcodes[J]. *Proc Biol Sci*, 2003, 270(1 512): 313.
[12] Schindel DE, Miller SE. DNA barcoding a useful tool for taxonomists[J]. *Nature*, 2005, 435(7 038): 17.
[13] Miller SE. DNA barcoding and renaissance of taxonomy [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(12): 4 775.
[14] Mizukami H, Ohbayashi K, Umetsu K, *et al.* Restriction fragment length polymorphisms of medicinal plants and crude drugs. II. Analysis of *Glehnia littoralis* of different geographical origin[J]. *Biol Pharm Bull*, 1993, 16(6): 611.
[15] Liu C, Gu ZY, Yang WJ, *et al.* Advances of biological taxonomy and species identification in Medicinal Plant Species by DNA barcodes[J]. *AJS*, 2011, 7(5): 147.

(收稿日期:2013-01-31 修回日期:2013-05-21)

* 中药师, 硕士。研究方向: 创新中药研发、医院药学。电话: 0757-87797915。E-mail: lxyin2006@163.com