

## · 基础研究 ·

DNA 条形码技术在新疆进口民族民间药材  
基原考证中的应用<sup>△</sup>李亚伟<sup>1</sup>, 刘强<sup>2</sup>, 樊丛照<sup>3</sup>, 李晓瑾<sup>3\*</sup>, 刘富铭<sup>3</sup>

(1. 新疆出入境检验检疫局 检验检疫技术中心, 新疆 乌鲁木齐 830063;

2. 新疆维吾尔自治区人民医院 药学部, 新疆 乌鲁木齐 830001;

3. 新疆维吾尔自治区中药民族药研究所 国家中医药管理局新疆中药  
民族药资源重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830002)

**[摘要]** **目的:** 采用 DNA 条形码技术, 研究探索新疆进口民族民间药材基原考证。**方法:** 使用试剂盒法提取药材总 DNA, 采用 ITS2 序列、*psbA-trnH* 序列对 30 份进口维吾尔药材样品进行 PCR 扩增并双向测序, 利用 MEGA7.0 等软件分析序列信息, 将序列在 DNA 条形码基原植物鉴定数据库及 GenBank 数据库中进行比对, 搜索相似性最高的植物, 判定药材可能的基原。**结果:** 综合 ITS2 及 *psbA-trnH* 实验结果, 30 份药材中有 28 份样品测序成功并得到有效的鉴定序列, 相似性对比结果显示有 15 种药材与文献记载基原植物一致, 7 份与基原植物为近缘种, 6 种药材与文献记载基原植物不同属。**结论:** 进口维吾尔药材的基原调查与考证工作迫在眉睫。

**[关键词]** 进口药材; DNA 条形码; ITS2; *psbA-trnH*; 基原植物

Application of DNA Barcoding Technology in Studying the Original Species  
of Imported Ethnical Medicinal Materials in XinjiangLI Ya-wei<sup>1</sup>, LIU Qiang<sup>2</sup>, FAN Cong-zhao<sup>3</sup>, LI Xiao-jin<sup>3\*</sup>, LIU Fu-ming<sup>3</sup>

(1. Testing center of xinjiang entry exit inspection and quarantine portal, Urumqi 830063, China;

2. Department of pharmacy, People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830063, China;

3. Xinjiang Institute of Chinese Materia Medica and Ethnical Materia, State Administration of traditional Chinese medicine  
Key Laboratory of traditional Chinese medicine and ethnic medicine resources, Urumqi 830002, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the validity of using DNA barcoding technology to identify the original species of imported ethnical medicinal materials in Xinjiang. **Methods:** Total DNA was extracted by DNA extraction kit from thirty samples, ITS2 and *psbA-trnH* sequences were amplified by PCR method and bidirectional sequenced. Sequence informations were analysed by MEGA7.0 software, all ITS2 and *psbA-trnH* sequences were identified by comparison of sequence similarity in professional nucleic acid sequence database, the most similar plant sequence were searched to determine the original species. **Results:** According to ITS2 and *psbA-trnH* sequences, twenty-eight medicinal samples obtained effective sequences. The comparison of sequence similarity results showed that fifteen kinds of medicinal materials were consistent with the original species as recorded in the literature, seven samples were closely related to their original species, and six samples were different with the original species as recorded. **Conclusion:** It is urgent to investigate and study the original species of imported Uygur medicinal materials.

**[Keywords]** Imported medicinal materials; DNA barcode; ITS2; *psbA-trnH*; original species

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20171208005

孕育于古丝绸之路的维吾尔医学, 为当地民众的健康保健发挥了不可替代的作用。基于其融合不同医学而成的特点, 维吾尔医用药呈现多元性, 其

中大约三分之一的药材源于北非的埃及、南欧(地中海一带)、亚洲阿拉伯半岛、伊朗、中亚、印度、巴基斯坦等国家和地区进口, 如牛舌草等约 150 多

<sup>△</sup> [基金项目] 国家质量监督检验检疫总局科技计划项目(2016IK262); 乌鲁木齐市科技局项目(G151010003)

\* [通信作者] 李晓瑾, 研究员, 研究方向: 中药资源; Tel: (0991)2665614, E-mail: xjljxj@126.com

种<sup>[1]</sup>。由于“古丝绸之路”的3条以上起点的线路,分别进入新疆后交汇入关,因此,源于不同传播线路的进口药材,不仅在与沿线当地民族民间医融合中演变,而且部分药材基原也在扩大或变迁,逐步形成了维吾尔药材“同名异物”、“异物同名”、“药材多基原”等现象,致使其药材的基原考证十分困难,基原问题成为了维吾尔药产业发展的壁垒<sup>[2]</sup>,因此,维吾尔进口药材正本清源,考证植物基原对维吾尔药产业的发展具有重要意义。

随着科技的不断进步,现代生物技术、现代仪器分析技术和计算机技术开始大量的应用于中药鉴定研究,以DNA条形码ITS2序列为主、*psbA-trnH*序列为辅的分子鉴定体系已初步建立<sup>[3]</sup>,并被载入《中华人民共和国药典》2010版第三增补本<sup>[4]</sup>和2015版<sup>[5]</sup>。DNA信息不受生物个体发育阶段、外界

环境因素及器官组织差异的影响,在同种内遗传稳定性很高,具有高效快速、微量、特异性强、可靠、准确等优点<sup>[6]</sup>,已经被广泛的应用到中药民族药材致使鉴定研究中,并展示出广阔的应用前景<sup>[7-9]</sup>。随着植物DNA条形码鉴定工作的不断开展,GenBank数据库中已收录了大量植物ITS2、*psbA-trnH*的DNA序列信息,为开展药材的分子鉴定提供参考依据<sup>[10]</sup>。本研究采取DNA条形码鉴定技术,选择检测药材DNA条形码ITS2和*psbA-trnH*序列,进行进口维吾尔药材的基原考证,为维吾尔药标准化提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、试剂与仪器

1.1.1 材料 来源于新疆出入境检验检疫局近年在卡拉苏口岸收集的药材样品30份(见表1)。

表1 实验材料信息

药材标本号	药材名称	药用部位	文献记载的基原植物
YC320001	香茅	全草	香茅属多种植物
YC319001	奶桃	成熟果实	椰子 <i>Cocos nucifera</i>
YC318001	防己	果实	印度防己 <i>Anamirta cocculus</i>
YC317001	玉竹	根茎	欧玉竹 <i>Polygonatum odoratum</i>
YC316001	锦灯笼	带果实的宿萼	酸浆 <i>Physalis minima</i>
YC315001	细辛	带根全草	欧细辛 <i>Asarum europaeum</i>
YC314001	药西瓜	果实	药西瓜 <i>Citrullus colocynthis</i>
YC313001	红茶	种子	茶树 <i>Camelia sinensis</i>
YC312001	甘松	根及根茎	甘松 <i>Nardostachys chinensis</i>
YC302005	阿勃勒	果实	腊肠树 <i>Cassia fistula</i>
YC279002	天仙子	种子	莨菪 <i>Hyoscyamus niger</i>
YC196003	罗望子	果实	酸角 <i>Tamarindus indica</i>
YC195006	刺糖	分泌物	骆驼刺 <i>Alhagi pseudoalhagi</i>
YC181036	秋水仙	鳞茎	秋水仙 <i>Colchium autumnale</i>
YC175007	洋甘菊	全草	洋甘菊 <i>Matricaria chamomilla</i>
YC174008	洋菝葜根	根	马兜铃叶菝葜 <i>Smilax aristolochiaefolia</i>
YC173007	薰衣草	全草	薰衣草 <i>Lavandula angustifolia</i>
YC170006	甜瓜子	种子	甜瓜 <i>Cucumis melo</i>
YC131010	石榴花	花	石榴 <i>Punica granatum</i>
YC130012	神香草	茎叶	硬尖神香草 <i>Hyssopus cuspidatus</i>
YC117006	蹂漆树果	果实	蹂漆树 <i>Rhus coriaria</i>
YC110011	马齿苋子	种子	马齿苋 <i>Portulaca oleracea</i>
YC092006	野苜蓿子	种子	野苜蓿 <i>Medicago falcata</i>
YC088034	玫瑰花	花蕾	玫瑰 <i>Rosa rugosa</i>
YC043019	欧龙胆	根及根茎	欧龙胆 <i>Gentiana lutea</i>
YC011010	白蜡树子	种子	白蜡树及同属多种植物
YC009006	白花丹	茎枝	白花丹 <i>Plumbago zeylanica</i>
YC006005	阿月浑子	果实或种子	阿月浑子 <i>Pistacia vera</i>
YC004013	阿纳其根	根	罗马除虫菊 <i>Anacyclus pyrethrum</i>
YC096010	牛舌草	全草	意大利牛舌草 <i>Anchusa italica</i>

1.1.2 试剂 PCR 扩增所用引物由上海生工生物工程有限公司合成, ITS2 正向序列<sup>[3]</sup>: 5'-ATGCGATACTTGGTGTGAAT-3', 反向序列: 5'-GACGCTTCTC-CAGACTACAAT-3'; *psbA-trnH* 正向序列: 5'-GTTATGCATGAACGTAATGCTC-3', 反向序列: 5'-CGCGCATGGTGGATTACAATCC-3'; DNA 提取试剂盒、2 × Taq Master Mix 等购自天根生物。

1.1.3 仪器 DNA 提取研磨仪 (GRINDER, GT-100), 离心机 (ZENTRIFUGEN, MIKRO 220R), PCR 扩增仪 (An Analytik Jena company, 070-851), 电子天平 (上海民桥精密科学仪器有限公司, JA1103N), 电泳仪 (JUNYI), 凝胶成像系统 (JUNYI, JY045-3C)。

## 1.2 方法

1.2.1 DNA 提取及检测 称取干燥药材样品 30 mg, 用 DNA 提取研磨仪 1000 r·min<sup>-1</sup> 研磨 3 min, 使用植物 DNA 提取试剂盒提取总 DNA。

1.2.2 PCR 扩增及测序 总反应体积 25 μL, 2 × Taq Master Mix 缓冲液 12.5 μL, 上下游引物各 1.0 μL, DNA 模板 2 μL, 纯净水 8.5 μL。ITS2 序列扩增程序: 94 °C 变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s, 40 个循环; 72 °C 延伸 10 min。*psbA-trnH* 序列扩增程序: 95 °C 变性 4 min; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min<sup>[3]</sup>。扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 有 PCR 扩增条带的样品送美吉生物测序公司进行双向测序。

## 1.3 数据分析

测序峰图用 CodonCode Aligner V 4.0.4 (CodonCode Co., USA) 校对拼接, 去除引物区<sup>[11]</sup>。

ITS2 序列采用基于隐马尔可夫模型的 HMMer 注释方法, 去除两端 5.8S 和 28S 区段获得 ITS2 间隔区序列<sup>[12]</sup>, 使用 MEGA6.0 (molecular evolutionary ge-

netics analysis) 分析序列信息<sup>[13]</sup>。

## 1.4 相似性比对

将测序获得的药材样本序列在基原植物 DNA 条形码鉴定数据库<sup>[14-15]</sup> 及 GenBank 数据库 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) 进行相似性比对, 结果中相似性最高的序列对应物种为最接近的物种。

## 2 结果

### 2.1 PCR 扩增及测序结果

使用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 所有药材样品 ITS2 和 *psbA-trnH* 均得到扩增条带。引物 ITS2 测序结果表明, 奶桃、防己、玉竹、甘松及洋菝葜根等 5 种药材测序结果为多峰, 未获得有效结果, 其余药材测序成功。引物 *psbA-trnH* 测序结果表明, 防己、甘松、洋甘菊及牛舌草等 4 种药材测序失败, 其余药材测序成功。

### 2.2 序列信息分析结果

ITS2 序列分析结果显示, 除测序失败的 5 种药材外, 其余 25 种药材 ITS2 序列长度由 211 ~ 242 bp 变化不等, 长度最短的为锦灯笼与玫瑰花, 最长的是甜瓜子; GC 含量变化范围为 42.8 ~ 71.6, 最小的为牛舌草, 最大的为锦灯笼。*psbA-trnH* 序列分析结果显示, 除测序失败的 4 种药材外, 其余 26 种药材 *psbA-trnH* 序列长度变化范围为 255 ~ 688 bp, 最短的为甜瓜子 255 bp, 最长为阿月浑子 688 bp, GC 含量最大的为药西瓜 38.8%, 最小的是欧龙胆 25.9%。

### 2.3 序列相似性比对结果

综合 25 种药材 ITS2 序列及 26 种药材 *psbA-trnH* 序列在基原植物 GenBank 数据库中 BLAST 鉴定结果 (表 2), 30 种维吾尔进口药材中, 防己与甘松鉴定失败, 其余 28 份药材得到有效的鉴定结果, 其中香茅、奶桃、玉竹、阿勃勒、天仙子、罗望子、薰衣草、甜

表 2 序列相似性对比结果

药材名称	ITS2 序列对比结果		<i>psbA-trnH</i> 序列对比结果	
	相似度最高植物名称	相似度 (%)	相似度最高植物名称	相似度 (%)
香茅	曲序香茅 <i>Cymbopogon flexuosus</i>	98	曲序香茅 <i>Cymbopogon flexuosus</i>	100
奶桃	—	—	椰子 <i>Cocos nucifera</i>	100
防己	—	—	—	—
玉竹	—	—	玉竹 <i>Polygonatum odoratum</i>	100
锦灯笼	珊瑚樱 <i>Solanum pseudocapsicum</i>	100	珊瑚樱 <i>Solanum pseudocapsicum</i>	97

表2(续)

药材名称	ITS2 序列对比结果		<i>psbA-trnH</i> 序列对比结果	
	相似度最高植物名称	相似度(%)	相似度最高植物名称	相似度(%)
细辛	西藏延龄草 <i>Trillium govatianum</i>	99	卵叶延龄草 <i>Trillium ovatum</i>	98
药西瓜	西瓜 <i>Citrullus lanatus</i>	98	西瓜 <i>Citrullus lanatus</i>	100
红茶	香港红山茶 <i>Camellia hongkongensis</i>	92	红茶 <i>Camellia sinensis</i>	100
甘松	—	—	—	—
阿勃勒	阿勃勒 <i>Cassia fistula</i>	100	阿勃勒 <i>Cassia fistula</i>	100
天仙子	天仙子属的一种 <i>Hyoscyamus kurdicus</i>	99	天仙子 <i>Hyoscyamus niger</i>	100
罗望子	酸角 <i>Tamarindus indica</i>	100	酸角 <i>Tamarindus indica</i>	100
刺糖	疏叶骆驼刺 <i>Alhagi sparsifolia</i>	100	疏叶骆驼刺 <i>Alhagi sparsifolia</i>	99
秋水仙	秋水仙属的一种 <i>Colchicum robustum</i>	88	秋水仙属的一种 <i>Colchicum robustum</i>	100
洋甘菊	菊蒿属的一种 <i>Tanacetum semenovii</i>	96	—	—
洋菝契根	—	—	土茯苓 <i>Smilax glabra</i>	100
薰衣草	狭叶薰衣草 <i>Lavandula angustifolia</i>	100	法国薰衣草 <i>Lavandula stoechas</i>	93
甜瓜子	甜瓜 <i>Cucumis melo</i>	100	甜瓜 <i>Cucumis melo</i>	99
石榴花	石榴 <i>Punica granatum</i>	100	石榴 <i>Punica granatum</i>	100
神香草	荆芥属的一种 <i>Nepeta assurgens</i>	96	牛至属的一种 <i>Origanum ramonense</i>	94
蹂漆树果(蹂木果)	西西里漆树 <i>Rhus coriaria</i>	100	光滑漆树 <i>Rhus glabra</i>	91
马齿苋籽	马齿苋 <i>Portulaca oleracea</i>	100	马齿苋 <i>Portulaca oleracea</i>	100
野苜蓿	黄耆属的一种 <i>Astragalus hamosus</i>	100	华黄芪 <i>Astragalus chinensis</i>	96
玫瑰花	玫瑰 <i>Rosa rugosa</i>	100	软条七蔷薇 <i>Rosa henryi</i>	99
欧龙胆	新疆假龙胆 <i>Gentianella turkestanorum</i>	99	龙胆属的一种 <i>Gentianodes tianschanica</i>	99
白蜡树子	蓝树 <i>Wrightia laevis</i>	97	倒吊笔属的一种 <i>Wrightia tinctoria</i>	100
白花丹	白花丹 <i>Plumbago zeylanica</i>	100	白花丹 <i>Plumbago zeylanica</i>	97
阿月浑子	阿月浑子 <i>Pistacia vera</i>	100	阿月浑子 <i>Pistacia vera</i>	100
阿那其根	阿纳其根 <i>Anacyclus pyrethrum</i>	97	<i>Anacyclus</i> sp.	100
牛舌草	意大利牛舌草 <i>Anchusa italica</i>	100	—	—

注：“—”表示未获得有效测序结果。

瓜子、石榴花、蹂漆树果、马齿苋籽、玫瑰花、白花丹、阿月浑子及牛舌草等15种药材与本草中记载的基原植物相似度为100%；药西瓜、红茶、刺糖、秋水仙、洋菝契根、欧龙胆及阿那其根等7种药材与其基原植物为同属植物；锦灯笼、细辛、洋甘菊、神香草、野苜蓿及白蜡树子等6种药材与本草中记载的为不同属植物。

### 3 讨论

**3.1** 以ITS2序列为主、*psbA-trnH*为辅的DNA条形码鉴定体系已经作为药材鉴定的指导原则载入药典，与*psbA-trnH*相比，ITS2扩增效率较高，GenBank数据库中可参照的数据量大，并且同属间鉴定效率高

与其他DNA条形码序列<sup>[16]</sup>，但ITS2序列基因组内是多拷贝，协同进化不完全，基因组内多样性导致产物测序出现多峰现象<sup>[17]</sup>。本研究从30种维吾尔进口药材中提取了基因组DNA，PCR扩增及测序结果显示，ITS2序列的测序成功率为83.3%，*psbA-trnH*序列的测序成功率为86.7%，ITS2序列测序成功率略低于*psbA-trnH*序列，可能是由于奶桃、防己、玉竹、甘松及洋菝契根等药材存在多拷贝现象，测序出现了多峰。从理论角度，针对多峰现象可使用克隆后测序获得单一的序列，克隆测序会花费更长的时间，本研究基于DNA条形码鉴定指导原则及标准流程<sup>[5,18]</sup>，未对多峰的样本克隆测序，有待于进一步研究确定基原。

**3.2** 为保证鉴定的准确性,本研究以基原植物 DNA 条形码鉴定数据库<sup>[3,14-15]</sup>中的数据为主,参考使用 GenBank 数据库中部分药材的数据对所有测序成功的序列进行对比。在获得有效鉴定结果的 28 种药材中,香茅等 15 种药材 ITS2 或 *psbA-trnH* 序列鉴定结果与文献记载的基原植物一致,印证了文献记载的准确性至少在 50% 以上,这也是维吾尔医药能传承至今的基础。刺糖等 7 种药材的鉴定结果显示与文献记载的基原为同属不同种植物,锦灯笼、细辛、洋甘菊、神香草、野苜蓿及白蜡树子等 6 种药材与文献记载的基原植物为不同属植物,推测其原因:一是源于药材在传承和传播过程中,在沿线本土化演变中增加或改变了基原,如文献中记载刺糖基原为骆驼刺 *Alhagi pseudoalhagi*<sup>[19]</sup>,但本次鉴定结果表明刺糖基原与目前维吾尔医实际使用结果一致;其次则多因药物文献记载与植物分类学上的物种命名历史演变不同步造成,或因取样的被动与局限性所致,本研究获样品即为药材近源替代品,因此,需要进一步研究调查考证,修订或扩大药材植物基原。

**3.3** 基原问题是维吾尔药多年来标准化进程缓慢的主要原因,传统的显微、化学等鉴定基原考证中发挥了一定的作用,但植物遗传物质相对稳定,具有更广阔的应用前景<sup>[20]</sup>,因此,将多种方法相结合对维吾尔药材溯源,以提高溯源的准确性。维吾尔药材的基原考证是以植物学溯源为基础,同时需要与维吾尔医文化传承相结合,因此,维吾尔药材的溯源不仅是药材的基原考证,也是对医学理论的考证。

### 参考文献

- [1] 王宇真,吕凤民,韩勇明. 维吾尔医药资源及药物学简介[J]. 中国中药杂志,2005,30(4):77-78.
- [2] 苏来曼·哈力克,孙磊,沈晓丽,等. 维吾尔药质量标准现状分析及发展建议[J]. 中国药事,2015,29(12):1256-1262.
- [3] 陈士林. 中国药典中药材 DNA 条形码标准序列[M]. 北京:科学出版社,2015.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部,第三增补本[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:92-94.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:四部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2015:383-384.
- [6] Kress W J, Wurdack K J, Zimmer E A, et al. Use of DNA barcodes to identify flowering plants[J]. Proc Natl Acad Sci U S A,2005,102(23):8369-8374.
- [7] 杨璐,樊丛照,李晓瑾. 基于 ITS2 序列的维吾尔药材神经香草鉴定研究[J]. 中国现代中药,2017,19(5):625-629.
- [8] 杨璐,樊丛照,李晓瑾,等. 维吾尔药材红豆杉植物基原研究[J]. 生物资源,2017,39(1):30-35.
- [9] Fan C, Li X, Zhu J, et al. Endangered Uyghur Medicinal Plant *Ferula* Identification through the Second Internal Transcribed Spacer[J]. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine,2015,2015(1):1-6.
- [10] 张雨欣,刘川,刘悦,等. 藏药 DNA 条形码研究现状及应用前景[C]// 中华中医药学会第八次中药分析学术交流会议论文集. 北京:中华中医药学会,2015:903-910.
- [11] 陈士林,庞晓慧,姚辉,等. 中药 DNA 条形码鉴定体系及研究方向[J]. 世界科学技术-中医药现代化,2011(5):747-754.
- [12] Keller A, Schleicher T, Schultz J, et al. 5S-28S rRNA interaction and HMM-based ITS2 annotation[J]. Gene,2009,430:50-57.
- [13] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28(10): 2731-2739.
- [14] 李晓瑾,贾晓光,朱国强. 维吾尔药用植物 DNA 条形码集[M]. 乌鲁木齐:新疆人民出版社,2015.
- [15] Chen S, Song J, Yao H, et al. A renaissance in herbal medicine identification: From morphology to DNA[J]. Biotechnol Adv. 2014,32(7):1237-1244.
- [16] H. Yao, J. Y. Song, S. L. Chen, et al. Use of ITS2 region as the universal DNA barcode for plants and animals[J]. PLoS ONE,2010,5(10):e13102.
- [17] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准:维吾尔药分册[M]. 乌鲁木齐:新疆科学出版社,1999:51.
- [18] 陈士林,姚辉,宋经元,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.
- [19] Jingyuan Song, Linchun Shi, Shilin Chen, et al. Extensive Pyrosequencing Reveals Frequent Intra-Genomic Variations of Internal Transcribed Spacer Regions of Nuclear Ribosomal DNA[J]. PLoS ONE,2012,7(8):e43971.
- [20] 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.

(收稿日期 2017-12-08)