

· 基础研究 ·

基于 DNA 条形码的藏药洪连鉴定研究[△]尼玛潘多¹, 李婷², 胡小松², 刘春生^{2*}

1. 西藏自治区食品药品检验研究院

西藏自治区藏药标准化研究重点实验室, 西藏 拉萨 850000;

2. 北京中医药大学 中药学院, 北京 102488

[摘要] **目的:** 对藏区常使用的洪连药材进行 DNA 条形码鉴定, 为准确鉴定藏区洪连药材提供方法。**方法:** 从 5 个藏区收集 12 批洪连药材, 提取其 DNA, 采用 ITS 以及 psbA-trnH 序列进行聚合酶链式反应(PCR)引物扩增并测序, 所得序列从 GenBank 数据库进行相似性同源查询, 采用 DNAMAN、Editseq、Mega 等软件, 寻找其特异位点, 计算样品 Kimura2-parameter(K2-P)遗传距离, 并构建 N-J 系统构建树。**结果:** 12 批样品来源于 3 个种, ITS 序列长度为 552 bp, 变异位点为 34 个, 在 107 bp 处能将 3 种兔耳草区分; psbA-trnH 序列长度约为 250 bp, 存在 12 个变异位点, 在 136 bp 处能将 3 种兔耳草区分。根据遗传距离构建 N-J 树, 3 种兔耳草明显分为 3 支。**结论:** ITS 序列以及 psbA-trnH 序列可以作为兔耳草属鉴别的 1 种方法, 为藏药的准确鉴别提供了方法。

[关键词] 洪连; 兔耳草; DNA 条形码; 鉴定

[中图分类号] R282.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2020)04-0542-04

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20190718003

Identification of Tibetan Medicine Honglian Based on DNA BarcodingNI Ma-pan-duo¹, LI Ting², HU Xiao-song², LIU Chun-sheng^{2*}

1. Tibet Institute for Food and Drug Control Tibet Autonomous Region Key Laboratory

for Standardization of Tibetan Medicines, Lhasa 850000, China;

2. School of Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

[Abstract] **Objective:** To identify the DNA barcodes of Honglian medicinal materials commonly used in Tibetan areas, and to provide a method for accurately identifying Honglian medicinal materials in Tibetan areas. **Methods:** 12 batches of Honglian medicinal materials were collected from 5 Tibetan areas, and the DNA was extracted. PCR primers were amplified and sequenced using ITS and psbA-trnH sequences. The sequence was similarly homologously searched from GenBank database, using DNAMAN, Editseq, Software such as Mega searches for its specific site, calculates the genetic distance of the sample Kimura2-parameter (k2-P), and constructs the NJ system building tree. **Results:** 12 batches of samples were derived from three species. The length of ITS sequence was 552 bp and the number of mutation sites was 34. 3 kinds of rabbit ear grasses could be distinguished at 107 bp. The length of psbA-trnH sequence was about 250 bp, and there were 12 mutation sites, 3 kinds of Lagotis Gaertn can be distinguished at 136 bp. According to the genetic distance, N-J trees were constructed, and 3 kinds of Lagotis Gaertn were clearly divided into three branches. **Conclusion:** ITS sequence and psbA-trnH sequence can be used as a method to identify the ear genus of Aurora, providing a method for accurate identification of Tibetan medicine.

[Keywords] Honglian; *Lagotis Gaertn*; DNA barcoding; identification

洪连为藏族习用药材, 始载于《四部医典》。《鲜明注释》云:“洪连门巴随处皆有”;《度母本草》云:“洪连门巴产自南方者为上品;下品分雌、

雄两类:能开花者为雄,无花者为雌。”《图谱》云:“雌洪连生于草坪和海滨,叶厚而具皱纹,下垂;花白色,状如狼尾巴;根如松鸡粪,枝被长

[△] [基金项目] 国家药典委员会 2009—2010 年度“国家药品标准提高”项目(765)

* [通信作者] 刘春生, 教授, 研究方向: 药用植物和分子生药学研究; Tel: (010)84738624, E-mail: max_liucs@263.net

毛。”《蓝琉璃》云：“随处皆生，分雌雄两种，雄者花蓝色，状如松鸡粪；根状如虫。”《甘露本草明镜》云：“本品根呈灰色，圆锥形，具须根；叶绿色，厚具皱纹，微粗糙，叶背微灰色，卵形或剑形，边缘有锯齿，先端急尖或钝圆；叶柄紫红色，细面长；花紫红色，果实小，黄紫色。”各地藏医多用玄参科的兔耳草、短管兔耳草、全缘兔耳草等植物为洪连门巴，其中，短管兔耳草的形态特征与上述文献记载更相近，故为兔耳草的正品种^[1]。具有清热解毒、行血调经的作用，在传统藏医中用于治疗全身发热、肾炎、肺病、高血压、动脉粥样硬化、月经不调、综合物中毒及“心热”等症^[2]。洪连在临床上的应用较为广泛，是不少藏成药的主要组成，如二十味沉香丸、二十五味大汤丸、二十六味通经丸、八味沉香利尿丸、二十五味獐芽菜丸等。

2015年版《中华人民共和国药典》收载的洪连为玄参科短筒兔耳草 *Lagotis breviflora* Maxim. 的干燥全草，1995年版《中华人民共和国卫生部药品标准》藏药第一册收载玄参科短管兔耳草 *Lagotis breviflora* Maxim 或全缘兔耳草 *Lagotis integra* W. W. Smith 的干燥全草，《云南省中药材标准》1996年版收载革叶兔耳草 *Lagotis alutacea* W. W. Smith. 全缘兔耳草 *Lagotis integra* W. W. Smith 的干燥全草。

但各地藏区(西藏、四川、青海、云南、甘肃)除使用上述标准规定的品种外也有使用其他种的兔耳草。鉴于洪连药材来源复杂，品种繁多，极易造成药材混乱，加之兔耳草属的植物形态相似，不能准确区分。因此，对兔耳草属药材进行准确鉴定有着非常重要的意义。

目前对兔耳草的研究多集中在对短筒兔耳草的研究，且对其化学成分^[3-7]研究较多，未见其有采用DNA条形码对其鉴定的报道。近年来，DNA条形码越来越受到关注。与传统鉴定方法相比，DNA条形码技术以物种的遗传信息为鉴定依据，不受植物生长环境、发育阶段、样品形态和组织部位的限制，具有通用性、客观性、准确性等特点^[8]。因此DNA条形码已经广泛应用于药材鉴定的各个领域，如植物药、动物药等。

本研究收集了12批来源于各藏区的洪连药材，采用ITS及其叶绿体序列对其进行DNA鉴定，旨在对洪连进行准确鉴定，为进一步藏药资源的开发与合理利用提供支持。

1 材料

1.1 仪器

BIO-RAD T100 Thermal Cycler PCR 仪(德国Biometa公司), Bio-Rad 型电泳仪,(北京六一仪器厂), JY-SPDT 型水平电泳槽(北京君意东方电泳设备有限公司), BG-gdsA520 凝胶成像分析系统(南京华奥仪器有限公司), MM400 冷冻混合球磨机(德国RETSCH公司)。

1.2 试剂

广谱植物基因组DNA快速提取试剂盒(TIANGEN), $2 \times Taq$ plus per mastermix(含染料)(北京博迈德发展有限公司); 样品收集于各藏区, 具体样品信息见表1。其中11、12号样品由四川省食品药品检验检测院黎跃成老师提供, 经北京中医药大学刘春生教授鉴定为玄参科兔耳草属植物。

表1 12份洪连样品信息

编号	样品来源	产地
1	青海省藏医院	青海
2	青海省西宁市药材市场	青海
3	成都市荷花池药材市场	西藏
4	青海省西宁市药材市场	青海乐都
5	青海省金河药业	青海
6	四川省甘孜州藏医院	甘孜八美
7	青海帝玛尔药业	印度
8	西藏自治区那曲地区藏医院	西藏
9	甘肃省甘南州藏医院	甘肃甘南
10	甘肃省甘南州夏河县藏医院	甘肃甘南
11	四川省食品药品检验检测院	四川石渠
12	四川省食品药品检验检测院	四川石渠

2 方法

2.1 DNA提取

取适量药材用75%乙醇进行表面擦拭, 加入液氮, 用球磨机迅速将其研成粉末, 采用光谱植物基因组DNA快速提取试剂盒提取DNA, 具体操作见说明书。提取的样品DNA于-20℃保存备用。

2.2 PCR扩增

采用30 μL反应体系, 样品总DNA 2 μL, 正反引物(ITIS引物: F-5'-TCCGTAGGTGAACCTGCCG-3', R-5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'; psbA-trnH引物:

F-5'-GTTATGCATGAACGTAATGCTC-3' R-5'-CGCGCA-TGGTGGATTCACAATCC-3'; 引物各 1 μL, 2 × Mix 聚合酶 15 μL, ddH₂O 补足。

PCR 反应程序: ITS 序列: 94 °C 3 min, 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min, 共 30 个循环, 至 72 °C 5 min; psbA 序列: 94 °C 5 min, 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1.5 min, 共 30 个循环, 至 72 °C 7 min。

2.3 测序分析

将所得 PCR 产物经 1.0% ~ 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下检测于 500 ~ 750 bp 可见单一明亮的条带。剩余 PCR 产物经北京小师弟商贸有限公司进行一代测序分析。

2.4 数据处理

测序结果进行 ContigExpress 进行正反拼接, DNAMAN 拼接及序列比对, 采用 BLAST 方法对获得的 DNA 序列在 GenBank-NCBI 中进行相似性同源查询, 采用 MEGA5.0 对得到的序列进行比对, 分析种内、种间的遗传变异, 计算 Kimura2-parameter (K2-P) 遗传距离, 构建 NJ 进化树。

3 结果

3.1 ITS 序列数据分析结果

经 DNAMAN 多序列比对, 序列总长 552 bp, 各序列相似度达到 97.43%, 存在 34 个变异位点, 见

表 2。从表中可得出在 107 bp 时短筒兔耳草无碱基, 全缘兔耳草为碱基 T, 紫叶兔耳草为碱基 A, 故能将三者进行区分。

根据其遗传距离构建 N-J 树, 由图 1 可知, 1、2、5、9、10 共 5 个样品与下载序列短筒兔耳草聚为 1 支, 3、4、7、8、11、12 共 6 个样与全缘兔耳草聚为 1 支, 6 号样与紫叶兔耳草聚为 1 支。

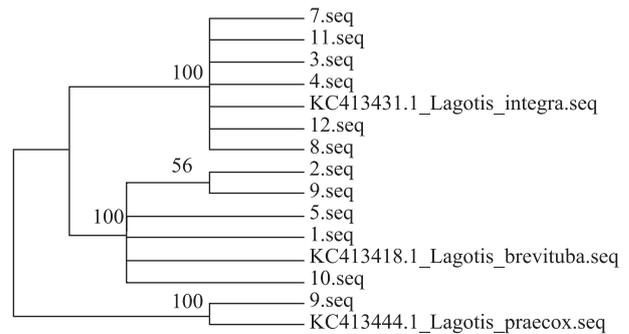


图 1 洪连样品 ITS N-J 树

3.2 psbA-trnH 序列数据分析结果

序列长度约为 250 bp, 存在 12 个变异位点, 见表 3。在 136 bp 处, 全缘兔耳草为碱基 T, 紫叶兔耳草为碱基 A, 短筒兔耳草无碱基, 因此能将 3 个种很好地区分。根据遗传距离构建 N-J 树。由图 3 可知, 与 ITS 结果鉴定结果相同, 1、2、5、9、10 共 5 个样品与下载序列短筒兔耳草聚为 1 支, 3、4、7、8、11、12 共 6 个样与全缘兔耳草聚为 1 支, 6 号样与紫叶兔耳草聚为 1 支。

表 2 ITS 序列变异位点

样品编号	变异位点								
	8	23	25	30	34	46	80	82	86
1、2、5、9、10	*	*	*	*	*	*	*	*	*
3、4、7、8、11、12	*	T	A	T	A	*	T	T	*
6	C	T	A	T	*	C	T	*	A
	107	145	146	153	320	370	373	374	379
1、2、5、9、10	*	*	*	*	*	*	*	*	*
3、4、7、8、11、12	T	A	G	T	A	A	*	G	C
6	A	A	G	A	A	A	T	*	C
	380	382	383	388	391	392	394	422	458
1、2、5、9、10	*	*	*	*	*	*	*	*	*
3、4、7、8、11、12	*	G	C	G	T	*	T	T	*
6	G	G	*	*	*	C	*	T	A
	487	502	509	515	533	544	548		
1、2、5、9、10	*	*	*	*	*	*	*	*	*
3、4、7、8、11、12	*	T	*	*	G	C	G		
6	T	T	A	T	*	*	*		

注: A. 腺嘌呤; T. 胸腺嘧啶; C. 胞嘧啶; * 表示在此处未有碱基。

表3 psbA-trnH 序列变异位点

样品编号	变异位点								
	35	59	87	110	136	172	193	200	211
1、2、5、9、10	*	*	*	*	*	*	*	*	*
3、4、7、8、11、12	G	*	*	*	T	T	G	*	C
6	*	A	A	A	A	T	*	C	C
	212	237	243						
1、2、5、9、10	*	*	*						
3、4、7、8、11、12	T	C	C						
6	T	C	C						

注：A. 腺嘌呤；T. 胸腺嘧啶；C. 胞嘧啶；G. 鸟嘌呤。

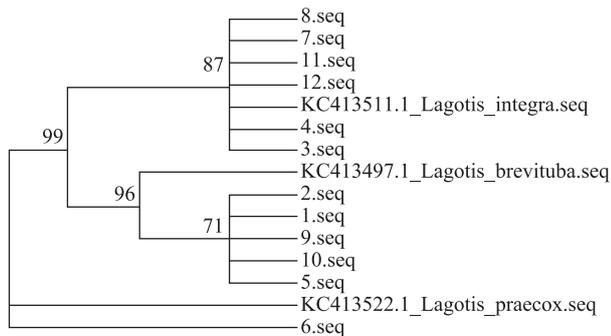


图2 洪连样品 psbA-trnH-N-J 树

4 讨论

准确的基原鉴定是保障药材质量的根本，因各种原因，民族药材基础研究薄弱，基础工作不足，质量控制及监管整体水平较低，存在的主要问题是实际使用的药材与标准不相符，标准执行上存在一定问题^[9-10]，目前洪连药材的临床用药与现有标准存在很大差距，市售药材的来源较多，药材在流通中以同属多种植物作为替代品的现象很常见^[11]。因此对洪连药材进行准确鉴别具有非常重要的意义。

本研究采用 ITS 及 psbA-trnH 序列对 12 批兔耳草属的药材进行鉴别，结果显示，12 批的兔耳草来源于 3 个种，分别是短管兔耳草、全缘兔耳草与紫叶兔耳草。根据遗传距离构建 N-J 树 3 种兔耳草明显聚为 3 支，表明 DNA 条形码能准确区分兔耳草属的各个种，并且鉴定结果与形态鉴别结果相吻合。但鉴于本研究所选取样本有限，想要实现快速精准鉴别，还需要对更多样本的 DNA 进行扩增，以便积累更多的数据。

本研究以藏药洪连的精准鉴别为切入点，解决了洪连药材受样品形态、植物生长期、有花无花以及人为主观因素等限制的问题^[12]，为藏药的准确鉴

别提供了可靠的方法，为藏药资源进一步的开发与利用奠定基础，同时为藏药的质量与临床安全用药提供了参考。

参考文献

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草: 藏药卷[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 218-219.
- [2] 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 藏药: 第一册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1995: 63.
- [3] 朱继孝, 史亚夫, 程虹毓, 等. 短穗兔耳草化学成分研究[J]. 中药材, 2019, 42(3): 552-555.
- [4] 张晨辉, 李敏, 曾金祥, 等. 短管兔耳草化学成分的研究[J]. 中成药, 2019, 41(2): 333-337.
- [5] 何树梅, 门连超, 袁东亚, 等. 藏药短管兔耳草醇提物对免疫抑制小鼠免疫功能的影响[J]. 现代免疫学, 2018, 38(1): 59-65.
- [6] 刘雪松, 安方玉, 颜春鲁, 等. 短管兔耳草乙醇提取物对 H₂(22) 荷瘤小鼠的抑瘤作用[J]. 中成药, 2017, 39(8): 1694-1698.
- [7] 史亚夫, 李雪激, 文乐, 等. 短穗兔耳草和短管兔耳草急性酒精肝损伤小鼠作用机制的研究[J]. 中药新药与临床药理, 2017, 28(5): 600-605.
- [8] 赵晴, 谢红波, 赵红玲, 等. 中药材种子 DNA 条形码鉴定研究进展[J]. 中草药, 2019, 50(14): 3471-3476.
- [9] 郑健, 过立农, 咎珂, 等. 九省区民族药质量标准现状调研综合报告[J]. 中国药事, 2015, 29(12): 1223-1235.
- [10] 阿萍, 尼玛潘多, 次旦多吉. 西藏自治区藏药质量标准调研报告[J]. 中国药事, 2015, 29(12): 1267-1271.
- [11] 樊丛照, 朱军, 赵亚琴, 等. 基于 DNA 条形码技术的新疆民族药材天山董菜基原研究[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2019, 21(3): 553-558.
- [12] 林凤越, 曹辉, 任欢欢, 等. 基于 ITS2 序列的人参及同属易混品西洋参种子的分子鉴定[J]. 中草药, 2019, 50(9): 2188-2193.

(收稿日期: 2019-07-18 编辑: 谢睿)