



黄芪与其混伪品的 ITS 序列分子鉴定研究

崔占虎^{1,2}, 李越^{1,2}, 袁庆军¹, 周立社^{2*}, 李旻辉^{1,2*}

(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:** 研究黄芪与其混伪品之间的 DNA 分子鉴别方法。**方法:** 采集不同产地的黄芪药材 13 份, 替代品红芪 2 份, 混伪品紫花苜蓿 3 份和蜀葵 1 份, 所有样品进行总 DNA 的提取, PCR 扩增, 并对扩增产物进行测序得到相应的序列, 同时从 GenBank 下载蓝花棘豆、锦鸡儿 2 种伪品的 ITS 序列。用 MEGA 4 计算其种间的 K-2-P 距离, 最后利用 ITS 序列构建其系统发育树。**结果:** 测得了 19 份样品的 ITS 序列全长, 分别为蒙古黄芪 646 ~ 650 bp, 膜荚黄芪为 646 ~ 650 bp; 红芪为 664 bp; 紫花苜蓿为 659 bp; 蜀葵为 728 bp, 在 GenBank 中注册, 获得登记号。通过以 ITS 序列重建系统进化树进行的聚类分析可以将黄芪与其混伪品有效的区分开。**结论:** ITS 序列能够成功鉴定黄芪及其易混伪品, 可以作为黄芪与其混伪品的分子鉴定方法。

[关键词] 黄芪; ITS 序列; 分子鉴定

黄芪是豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 或膜荚黄芪 *A. membranaceus* (Fisch.) Bge 的干燥根^[1], 为临床常用中药。始载于《神农本草经》, 传统中医药理论认为黄芪, 性味甘、微温, 具有补气固表、利水生津、托毒排脓、生肌等功效^[1]。现代医学研究表明黄芪有强心、利尿、降压、抗菌、提高机体免疫功能和促进新陈代谢等作用^[2]。由于近几年黄芪有效成分的深入研究, 作为药食两用的黄芪资源得到了广泛的开发和利用, 使得市场对黄芪资源的需求急剧增加。市场上除了正品黄芪外, 尚有代用品、伪品和混淆品。常见的有红芪 *Hedysarum polybotrys* Hand. -Mazz.、紫花苜蓿 *Medicago sativa* L.、蜀葵 *Althaea rosea* L.、蓝花棘豆 *Oxytropis coerulea* (pall.) DC.、锦鸡儿 *Caragana sinica* (Buóhoz) Rehd. 和圆叶锦葵 *Malva rotundifolia* L. 等, 这些植物的根茎在外形上与黄芪极为相近, 但在药效方面相差甚远, 有些植物甚至具有毒性。因此, 准确的鉴别黄芪药材对于保障人们用药安全意义重大。

目前市面上销售的黄芪多为加工过的药材, 黄

芪替代品及其伪品的表面性状、显微特征乃至化学成分与黄芪都极为相似, 在实际运用中要进行准确鉴别存在一定难度。同时应用形态学、组织学和化学成分分析等方法来鉴定黄芪存在主观性较大、特异性不强、通用性差、对观察者经验要求高等缺陷, 不利于规范化、标准化方法的建立及普及。而 DNA 分子遗传标记技术具有快速、微量、特异性强的特点, 近几年分子生物学中该技术的研究则为解决药材的鉴别问题提供了客观而有效的手段^[3-5]。本研究通过对 rDNA-ITS 序列差异分析, 对黄芪及其混伪品红芪、紫花苜蓿、蜀葵、蓝花棘豆和锦鸡儿的遗传关系作深入的研究, 为准确进行黄芪与其混伪品的鉴别提供科学的客观依据。

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 (德国 Eppendorf, 型号 5332), 电泳系统 (北京市六一仪器厂, 型号 DYY-12), 低温冷冻离心机 (德国 Eppendorf, 型号 5810 R), 紫外凝胶成像分析仪 (英国 Syngene, 型号 GBOXHR), 混合型球磨机 (德国 Retsch, 型号 MM400), 数控超声波清洗器 (型号 KQ-500DE), 微量移液器 (德国 Eppendorf)。

1.3 供试样品 本实验材料蒙古黄芪、膜荚黄芪、红芪、蜀葵和紫花苜蓿采自山西、甘肃、内蒙古 3 个产区, 所有样品均经内蒙古科技大学包头医学院李

[稿件编号] 20120516007

[基金项目] 中医药行业科研专项 (201107009); 包头科技发展项目 (2011X1002); 科技部基础项目 (SB2007FY110600)

[通信作者] * 李旻辉, 博士, 教授, 主要从事蒙药分子鉴定与资源保护研究, Tel: (010) 64014411-2956, E-mail: li_minhui@yahoo.cn; * 周立社, 教授, 主要从事分子生物学研究, Tel: 13604726512, E-mail: zhoulishi@sohu.com



旻辉教授鉴定。名称、采集地点、序列号见表 1。
蓝花棘豆和锦鸡儿物种来自 GenBank, 见表 2。

表 1 实验材料采集地及 GenBank 登录号

Table 1 The sources of Astragalus Radix and its adulterants

中文名	拉丁名	No.	采集地	GenBank 登录号
蒙古黄芪	<i>Astragalus membranaceus</i> var. <i>mongholicus</i>	BTMG01	内蒙古土右	JX017320
		BTMG02	内蒙古土右	JX017321
		BGMG03	内蒙古固阳	JX017322
		BGMG04	内蒙古固阳	JX017323
		CFMG05	内蒙古赤峰	JX017324
膜荚黄芪 <i>A. membranaceus</i>	<i>A. membranaceus</i>	SXMJ01	山西浑源	JX017325
		SXMJ02	山西浑源	JX017326
		SXMJ03	山西浑源	JX017327
		GSMJ04	甘肃陇西	JX017328
		GSMJ05	甘肃陇西	JX017329
		GSMJ06	甘肃陇西	JX017330
		CFMJ07	内蒙古赤峰	JX017331
		CFMJ08	内蒙古赤峰	JX017332
红芪	<i>Hedysarum polybotrys</i>	GSHQ01	甘肃武都	JX017333
		GSHQ02	甘肃武都	JX017334
紫花苜蓿	<i>Medicago sativa</i>	Medicago sativa01	内蒙古包头	JX017335
		Medicago sativa02	内蒙古包头	JX017336
		Medicago sativa03	内蒙古包头	JX017337
蜀葵	<i>Althaea rosea</i>	Althaea rosea01	内蒙古包头	JX017319

表 2 GenBank 下载样本物种信息

Table 2 The GenBank number of *Oxytropis coerulea* and *Caragana sinica*

拉丁学名	GenBank 登录号
<i>Oxytropis coerulea</i>	GU217599, HQ199316
<i>Caragana sinica</i>	FJ537284, DQ338282, DQ914785

2 方法

2.1 总 DNA 提取 取适量的样品, 研磨破碎装入微量离心管中, 加入适量预热的 2 × CTAB 提取液, 用振荡器将样品摇匀, 加入适量巯基乙醇, 混匀, 放在 65 °C 水浴锅中温浴 1.5 h, 取出材料置于室温下冷却, 加入适量氯仿-异戊醇 (24:1) 溶液, 用力摇匀 5 min, 高速离心 10 min (12 000 r · min⁻¹), 取上清液, 加入等体积的氯仿-异戊醇 (24:1) 溶液, 用力摇匀 5 min, 高速离心 10 min, 取上清液, 加入适量异丙醇, 轻轻颠倒 2 ~ 3 次, 放在 -20 °C 冰箱里静置 30 min, 高速离心 10 min, 弃上清, 用 70% 乙醇及无水

乙醇分别洗 2 次, 最后放在 37 °C 烘箱中烘 20 ~ 30 min, 使乙醇挥发彻底, 加入适量灭菌蒸馏水, 使之溶解, 放在 -20 °C 或 4 °C 冰箱中保存备用。

2.2 引物设计 选择目前国际推荐的通用引物 ITS (ITS4/ITS5)。ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'; ITS5: 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAA-CAAGG-3。

2.3 DNA 扩增 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, ExTaq 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 1 min, 40 s, 延伸温度 72 °C, 时间 7 min, 循环次数为 35 个, 最后 4 °C 保存。

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, 各样品均采用正向测序。

2.5 序列分析 将 7 种药材的 24 个个体进行序列的比对分析, 所得 DNA 序列用 CONTIG 软件同源对齐, 并辅以人工校对。以尽量减少排列所缺失的数目; 排序后的序列使用 BioEdit 分析软件进行分析处理。用 MEGA 4 分别计算各样品 ITS 序列的差异性 (Kimura 2-parameter), 并采用邻接法 (NJ 法) 和非加权平均法 (UPGMA 法) 分别构建了系统发育树。构建系统发育树, 并以 Bootstrap 作 1 000 次可信度分析。

3 结果与讨论

3.1 黄芪与其混伪品的 ITS 序列特征 本实验测得了黄芪与其混伪品的 19 份样品 ITS 序列, ITS 全序列长度为 646 ~ 728 bp, 分别为蒙古黄芪 646 ~ 650 bp, 其中 (G + C)% 为 53.08% ~ 53.10%; 膜荚黄芪为 646 ~ 650 bp, 其中 (G + C)% 为 53.08% ~ 53.10%; 红芪为 664 bp, 其中 (G + C)% 为 53.77%; 紫花苜蓿为 659 bp, 其中 (G + C)% 为 48.26%; 蜀葵为 728 bp, 其中 (G + C)% 为 51.79%。这些物种 ITS 序列在 GenBank 中注册, 获得登记号。通过将本研究测得的 19 个个体的 ITS 序列与 GenBank 上下载的 5 个 ITS 序列对比后发现, 蒙古黄芪与膜荚黄芪的 ITS 序列基本完全一致, 通过本实验所选的序列未能将其鉴别出来, 而它们与其 5 种混伪品的 ITS 序列差异较显著。黄芪与其替 5 种混伪品的种间序列共有 112 个位点变异, 信息位点有 98 个。

3.2 黄芪与其混伪品间的遗传距离分析 用 MEGA

软件分析得到了 2 种黄芪与其混伪品红芪、紫花苜蓿、蜀葵间的种间 K-2-P 距离,其中遗传距离为 0.001~0.460(表 3)。其中膜荚黄芪与蒙古黄芪的种间 K-2-P 距离最小(0.001);蓝花棘豆与膜荚黄芪和蒙古黄芪之间的遗传距离相等,亦不大,为 0.080;红芪与 2 种黄芪的遗传距离稍大,达到 0.153;锦鸡儿与 2 种黄芪的遗传距离相比锦鸡儿略大,达到 0.158;紫花苜蓿与 2 种黄芪的遗传距离更大一些,达到 0.201;然而蜀葵与 2 种黄芪遗传距离最大,达到了 0.460。

表 3 黄芪与其混伪品间的遗传距离

Table 3 The genetic distances of Astragali Radix and its adulterants

项目	1	2	3	4	5	6	7
1	-						
2	0.001	-					
3	0.158	0.158	-				
4	0.080	0.080	0.148	-			
5	0.153	0.153	0.137	0.146	-		
6	0.201	0.201	0.172	0.199	0.196	-	
7	0.460	0.460	0.448	0.460	0.426	0.449	-

注:1. 蒙古黄芪;2. 膜荚黄芪;3. 锦鸡儿;4. 蓝花棘豆;5. 红芪;6. 紫花苜蓿;7. 蜀葵。

3.3 黄芪与其混伪品系统发育树构建 为了尽可能减少因系统误差对所构建系统树的影响,本实验根据 ITS 序列特征采用 NJ 法和 UPGMA 法分别构建了系统发育树(图 1)。2 种方法均采用 Kimura2-parameter 距离,系统树各分支的置信度用自展法(bootstrap method)检验,共进行 1 000 次循环,以评价分支的统计学意义与可靠性。由图 1 可以看出,通过 NJ 法建立的系统树进行聚类可以分成 4 个大组,第 1 大组为 BGMG04, GSMJ06, BGMG03, CFMG05, GSMG04, GSMG05 等不同产地蒙古黄芪或膜荚黄芪以及蓝花棘豆,第 2 大组为锦鸡儿和红芪,其中 2 个红芪个体聚在了一起,3 个锦鸡儿个体聚在一起,第 3 组为紫花苜蓿,第 4 组为蜀葵,其中在系统树分支上可以看出,蓝花棘豆离黄芪的分支相比红芪、紫花苜蓿、蜀葵和锦鸡儿要近一些,说明它与黄芪遗传关系近些,锦鸡儿和红芪这 2 个物种在分类支上显示遗传关系也比较近些。通过系统树聚类分析可以将黄芪与其混伪品红芪、紫花苜蓿、蜀葵、锦鸡儿、蓝花棘豆有效鉴别开。结果表明 ITS 序列可以用于鉴别黄芪与其混伪品,ITS 序列分析可以成为黄芪与其混伪品鉴定分析的有效手段。

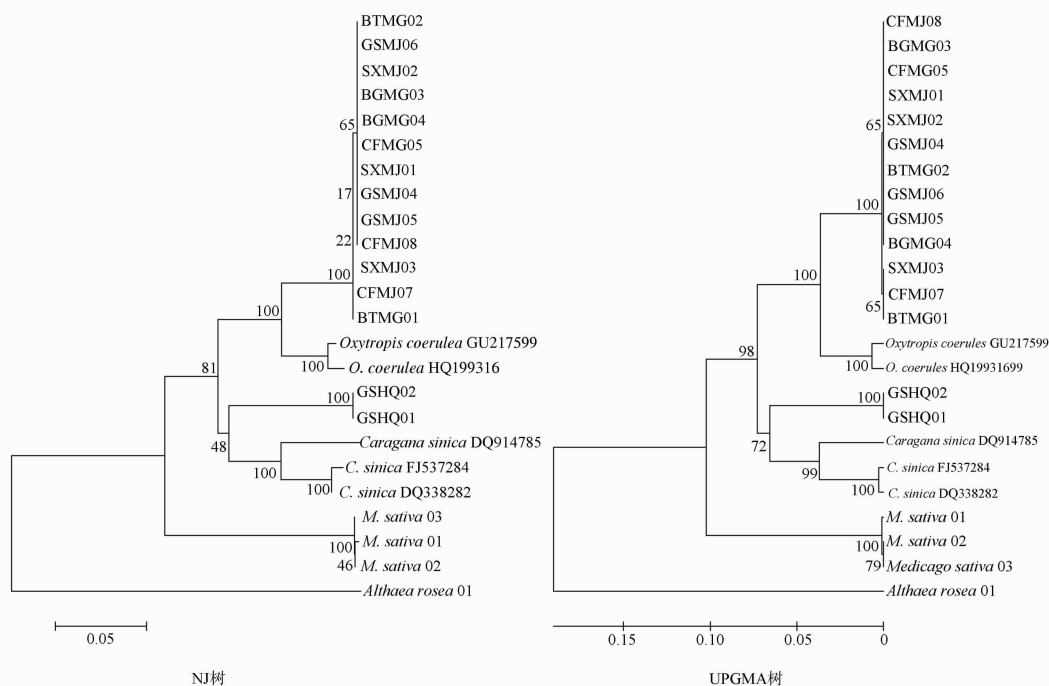


图 1 基于 ITS 序列构建的黄芪与其混伪品的 NJ 树和 UPGMA 树

Fig. 1 NJ Syetematic tree (left) and UPGMA Syetematic tree (right) based on ITS sequences of Astragali Radix and its adulterants

[参考文献]

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2010: 283.
- [2] 唐国延. 黄芪药理作用与临床应用研究进展[J]. 中医药临床杂志, 2010(29):844.
- [3] 许亮, 窦德强, 王冰, 等. 牛蒡子及其伪品的 ITS 序列分子鉴定研究[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(3):338.
- [4] 车建, 唐琳, 刘彦君. ITS 序列鉴定西红花与其易混中药材[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(8):668.
- [5] 刘春生, 白根本, 阎玉凝. 基于核 DNA ITS 序列的细辛药材基原及分子鉴定研究[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(5):329.

Molecular identification of Astragali Radix and its adulterants by ITS sequences

CUI Zhan-hu^{1,2}, LI Yue^{1,2}, YUAN Qing-jun¹, ZHOU Li-she^{2*}, LI Min-hui^{1,2*}

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Science, Beijing 100700, China;

2. Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou 014060, China)

[Abstract] **Objective:** To explore a new method for identification Astragali Radix from its adulterants by using ITS sequence.

Method: Thirteen samples of the different Astragali Radix materials and 6 samples of the adulterants of the roots of *Hedysarum polybotrys*, *Medicago sativa* and *Althaea rosea* were collected. ITS sequence was amplified by PCR and sequenced unidirectionally. The inter-specific K-2-P distances of Astragali Radix and its adulterants were calculated, and NJ tree and UPGMA tree were constructed by MEGA 4. **Result:** ITS sequences were obtained from 19 samples respectively, there were Astragali Radix 646-650 bp, *H. polybotrys* 664 bp, *Medicago sativa* 659 bp, *Althaea rosea* 728 bp, which were registered in the GenBank. Phylogeny trees reconstruction using NJ and UPGMA analysis based on ITS nucleotide sequences can effectively distinguish Astragali Radix from adulterants. **Conclusion:** ITS sequence can be used to identify Astragali Radix from its adulterants successfully and is an efficient molecular marker for authentication of Astragali Radix and its adulterants.

[Key words] Astragali Radix; ITS sequences; molecular identification

doi:10.4268/cjmm20122419

[责任编辑 吕冬梅]