

牛蒡 ITS 序列与药材质量的相关性研究

许亮, 窦德强, 王冰, 杨燕云, 康廷国*

(辽宁中医药大学药学院, 辽宁大连 116600)

[摘要] 目的:研究牛蒡 ITS 序列与牛蒡子药材质量相关性。方法:采集全国 26 个不同产地的牛蒡子药材,采用 PCR 扩增后测定 ITS 序列, HPLC 法对牛蒡子药材中牛蒡苷含量进行测定,应用 ClustalX(1.81), Mage 4.0, SPSS 13.0 等统计软件进行遗传多样性、基因分型、相关性等分析。结果:测得了 26 份牛蒡的 ITS 序列全长,在 GenBank 中注册,获得登记号,测定牛蒡子药材中牛蒡苷含量、千粒重,统计分析牛蒡的基因分型与药材质量具有相关性。结论:为揭示牛蒡子道地药材的分子形成机制奠定了基础。

[关键词] 牛蒡; ITS 序列; 药材质量

牛蒡 *Arctium lappa* L. 为菊科药用植物,其干燥成熟果实为牛蒡子,具有疏散风热、宣肺透疹、解毒利咽的功效,用于治疗风热感冒、咳嗽痰多、麻疹、风疹、咽喉肿痛等。核糖体内转录间隔区(ITS, internal transcribed spacer) 具有较多的碱基信息,在长度上具有较好的保守性,在中药资源与鉴定领域应用广泛,可以作为中药 DNA 条形码鉴定的候选序列。张英等利用 ITS 序列,对广藿香 ITS 基因型与地理分布的相关性进行了分析^[1],刘春生对甘草的 ITS 序列和 5.8S 基因进行基因分型,研究甘草酸形成的机制,根据序列差异将甘草属植物划分成 2 个基因型^[2]。ITS 序列在中药资源与鉴定领域,对于中药材道地性的分子机制、中药真伪优劣质量的评价、中药有效成分的代谢等都具有重要的研究意义。本课题组在对牛蒡子进行系统的生药学研究基础上,包括牛蒡子的基原鉴定、性状鉴定、显微鉴定、商品药材的收集与品种整理、牛蒡子药材与饮片的质量标准、牛蒡子炮制工艺、生态适宜性及生产产区区划等的基础上,应用 ITS 序列测定技术进行了牛蒡子真伪品的鉴定^[3]。本实验对牛蒡的遗传多样性进行

研究,对 ITS 区域进行测序,并进行相似度、遗传距离等分析,应用统计软件进行基因分型,同时测定牛蒡子药材中牛蒡苷的含量,牛蒡子千粒重,并进行相关性统计分析。

1 材料和方法

本实验所用牛蒡材料均经辽宁中医药大学王冰教授鉴定,见表 1。

1.1 ITS 序列测定

1.1.1 总 DNA 提取 对不同来源牛蒡总 DNA 采用 CTAB 法进行提取,取材料适量,加液氮研磨,迅速转移到微量离心管中,加入提取液(0.2 mol·L⁻¹ EDTA, 0.1 mol·L⁻¹ Tris-HCl, pH 8.0, 1.4 mol·L⁻¹ NaCl, 2% CTAB) 在 65℃ 下水浴消化 40 min,使用前加入 1.5% β-巯基乙醇。高速离心 10 min,取上清液,加入等体积的饱和酚溶液与氯仿-异戊醇(24:1)溶液,混匀 10 min,离心 10 min,取上清。加入等体积的氯仿-异戊醇(24:1)溶液混匀 10 min,高速离心 10 min,取上清。加入 1/10 体积的 3 mol·L⁻¹ NaAc 2 倍体积无水乙醇,混匀。-20℃ 沉降 20 min。高速离心 10 min,取沉淀加入 75% 乙醇,洗涤 2 次,自然干燥。加入适量超纯水,溶解待用。

1.1.2 引物的设计 根据文献[4]选择通用引物进行 ITS 序列扩增,ITS1: 5'-AGAAGTCGT AACAAAG-GTTTCCGTAGG-3'; ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATT-GATATGC-3'。委托大连宝生物公司进行合成,PCR 产物扩增条带明亮、清晰。

1.1.3 PCR 扩增 PCR 反应体系为 50 mL,含有 5 mL 10 × PCR buffer (Mg²⁺)、模板 1 mL

[稿件编号] 20110305001

[基金项目] 国家“十一五”科技支撑计划项目(2006BAI009B02-6); 辽宁省教育厅课题(2009A496); 辽宁中医药大学青年药学人才基金项目(YXRC0920)

[通信作者] * 康廷国,教授,博士研究生导师,主要从事中药鉴定与品种评价研究, Tel: (0411) 87586028

[作者简介] 许亮,副教授,博士,主要从事中药生药的教学与科研, Tel: (0411) 87586004, E-mail: xul@lnutcm.edu.cn

表1 牛蒡子采集分布

No.	采集地	纬度 (N)	经度 (E)	海拔 /m	生境
HLJ1	黑龙江佳木斯	46°44'17.7"	130°20'33.1"	202	野生
HLJ2	黑龙江富锦	47°12'01.2"	132°14'35.6"	148	野生
HLJ3	黑龙江五常	45°03'29.8"	127°04'27.9"	200	野生
JL1	吉林抚松	42°18'20.9"	127°17'01.7"	503	野生
JL2	吉林桦甸	42°58'18.6"	126°42'55.1"	500	野生
JL3	吉林蛟河	43°35'51.2"	127°37'33.1"	500	野生
JL4	吉林延吉	42°50'47.4"	129°26'38.7"	267	野生
LN1	辽宁本溪	41°15'28.2"	124°05'00.7"	500	野生
LN2	辽宁铁岭	42°13'49.1"	123°59'16.2"	96	野生
LN3	辽宁清源	42°06'19.2"	125°06'06.9"	500	野生
ZJ1	浙江淳安	29°50'58.2"	119°06'47.6"	187	栽培
ZJ2	浙江建德	29°25'40.3"	119°17'35.8"	177	野生
JS	江苏徐州	34°32'36.0"	116°45'28.4"	37	栽培
SX1	陕西宁陕	33°18'00.3"	108°21'40.2"	1 012	野生
SX2	陕西太白	34°02'18.8"	107°20'52.9"	1 966	野生
GS1	甘肃天水	34°24'00.9"	106°00'48.7"	1 500	野生
GS2	甘肃宕昌	34°01'48.2"	104°24'07.5"	2 001	野生
GS3	甘肃岷县	34°25'23.5"	104°02'33.2"	2 500	野生
GS4	甘肃渭源	35°03'10.4"	103°58'39.7"	2 500	栽培
SD	山东苍山	34°45'46.1"	118°15'25.5"	50	栽培
SC1	四川松潘	32°37'51"	103°35'16"	3 994	野生
SC2	四川雅安	30°01'42.3"	103°00'50.5"	974	栽培
HB1	湖北恩施	30°24'67.5"	109°26'56.3"	1 017	野生
HB2	湖北巴东	31°08'41.9"	110°28'29.3"	1 000	野生
HB3	湖北神农架	31°23'42.3"	110°11'44.9"	1 257	野生
HN	河南滦川	33°43'41.9"	111°44'20.0"	976	野生

(10~25 ng) 0.2 mL *Taq* 酶(1 U), dNTP 5 mL, 引物每个 5 mL, ddH₂O 补齐。反应温度: 预变性 94 °C 8 min, 之后进入下列程序: 变性温度 94 °C 1 min, 退火温度 57 °C 2 min, 延伸温度 72 °C 3 min, 35 个循环, 之后延伸 72 °C 10 min。

1.1.4 扩增片段重组、转化及阳性克隆鉴定 取适量纯化回收的 DNA 加入 PGM-T 质粒载体, 按照试剂盒说明书操作。取连接产物转入新鲜制备的 Top10 感受态大肠杆菌, 培养过夜后挑取阳性克隆的白色菌落培养。

1.1.5 ITS 测序与序列分析 ITS 序列委托宝生物工程(大连)有限公司测定完成。所测得序列经 BLAST 比对, 用 ClustalX(1.81) 进行同源排序, 用 Mage4.0 对序列特征进行分析, 通过 Neighbor-joining 法建立系统树。

1.2 牛蒡子药材质量评价

1.2.1 仪器与试剂 Agilent 1100 高效液相色谱

仪; 四元泵; 在线脱气机; 牛蒡苷对照品(批号 110819-200505) 购于中国药品生物制品检定所。

1.2.2 色谱条件 Agilent TC-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm 5 μm); 流动相甲醇-水(线性梯度洗脱: 0 min, 水 55%; 10 min, 水 46%; 20 min, 水 30%); 流速 1.0 mL · min⁻¹; 检测波长 280 nm; 柱温 25 °C。理论塔板数不低于 3 000。

1.2.3 对照品溶液的制备与纯度检查 精密称定干燥至恒重牛蒡苷对照品, 加甲醇溶解并定容至刻度, 配成 1.149 g · L⁻¹ 的牛蒡苷对照品溶液。经峰面积归一化法测定牛蒡苷纯度为 99.68%。

1.2.4 供试品溶液的制备 将供试品干燥并粉碎, 过 60 目筛, 取粉末 0.5 g, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇 45 mL, 在超声波发生器内提取 20 min (150 W 20 kHz), 取出放冷, 加甲醇至刻度定容, 摇匀。经微孔滤膜(0.45 μm) 过滤, 即得。

1.2.5 线性关系、精密性、稳定性、重复性、加样回

收率的考察 精密吸取对照品溶液 4, 6, 8, 10, 12, 14 mL 注入液相色谱仪 测定牛蒡苷的色谱峰面积, 以进样量为横坐标, 以峰面积为纵坐标, 得牛蒡苷回归方程为 $Y = 540.83X - 937.02$ $r = 0.9999$, 表明牛蒡苷在 4.596 ~ 16.086 μg 线性关系良好。

精密度、稳定性、重复性、加样回收率按要求进行 精密度 RSD 2.2%, 稳定性 RSD 1.7%, 重复性 RSD 1.4%, 加样回收率平均值 97.86%, RSD 1.6%, 均符合相关要求。

1.2.6 样品的测定 按照供试品溶液的制备方法分别对不同来源牛蒡子进行制备, 分别取 10 mL 进样。测定牛蒡苷的色谱峰面积, 计算牛蒡子药材中牛蒡苷的含量, 取 2 次的平均值。

2 结果与讨论

2.1 不同来源牛蒡 ITS 序列特点

本实验成功扩增并测定了 26 个不同来源的牛蒡 ITS 序列, 并在 NCBI 的 GenBank 核酸数据库中申请了序列号, 见表 2。在 ITS 序列中, 牛蒡长度均为 641 bp, G + C 为 59.13% ~ 59.59%, ITS1 长 256 bp, G + C 为 58.59% ~ 59.38%, ITS2 长度 221 bp, G + C 为 63.35% ~ 64.71%。牛蒡 ITS 序列的核酸有 14 个位点存在多样性, 分别为 14, 51, 91, 110, 210, 229, 298, 304, 416, 479, 572, 580, 615, 635 等位点, 其中 14, 51, 91, 110, 210, 229 等位点处于 ITS1 区, 298, 304, 416 等位点处于 5.8S 基因区, 479, 572, 580, 615, 635 等位点处于 ITS2 区, 见表 3。通过计算机软件 MEGA 4.0, 采用 Nucleotide Maximum Composite Likelihood Model 方法对遗传距离进行分析, 结果显示牛蒡样品的遗传距离为 0.0000 ~ 0.0095, 平均遗传距离为 0.0032, 牛蒡样品的 ITS 序列相似度为 0.9906 ~ 1.0000。结果表明, 不同地区的牛蒡子 ITS 序列具有高度的相似性, 同时又有一定的变异性, 相似度大于 99%。

2.2 ITS 基因型与牛蒡子药材质量的相关性

牛蒡属于广布种, 在我国广泛分布, 除了野生外, 也有大量的人工栽培, 主要获取其根作为保健蔬菜。对野生道地药材而言, 当一个种具有较广泛的分布区时, 它的各个不同地区居群往往具有不同的基因型或称地方性特化基因型, 而这些基因型是由于不同的生态或地理条件长期选择作用塑造而成, 是产生道地药材的本质。因此, 越是广布种, 由于生态环境变异大, 在长期适应环境的过程中形成的遗

表 2 牛蒡 ITS 序列 GenBank 注册号及 G + C 含量

No.	ITS	ITS1	ITS2	GenBank 注册号
	G + C / %	G + C / %	G + C / %	
HLJ1	59.13	58.59	63.80	FJ449881
HLJ2	59.13	58.59	63.80	FJ449890
HLJ3	59.28	58.98	63.80	FJ449877
JL1	59.13	58.59	63.80	FJ449868
JL2	59.44	58.59	64.71	FJ449879
JL3	59.28	58.98	63.51	FJ449874
JL4	59.44	58.98	63.80	FJ449876
LN1	59.13	58.59	63.80	FJ449878
LN2	59.13	58.59	63.80	FJ449873
LN3	59.44	59.77	63.35	FJ449870
ZJ1	59.28	58.98	63.80	FJ449871
ZJ2	59.44	58.98	64.25	FJ449883
JS	59.13	58.59	63.80	FJ449889
SX1	59.28	58.98	63.80	FJ449875
SX2	59.13	58.59	63.80	FJ449884
GS1	59.28	58.98	63.80	FJ449869
GS2	59.13	58.59	63.80	FJ449880
GS3	59.13	58.59	63.80	FJ449887
GS4	59.28	58.98	63.80	FJ449865
SD	59.28	58.59	63.80	FJ449886
SC1	59.44	58.98	64.25	FJ449872
SC2	59.59	59.38	63.80	FJ449885
HB1	59.13	58.59	63.80	FJ449867
HB2	59.13	58.59	63.80	FJ449888
HB3	59.13	58.59	63.80	FJ449866
HN	59.13	58.59	63.80	FJ449882

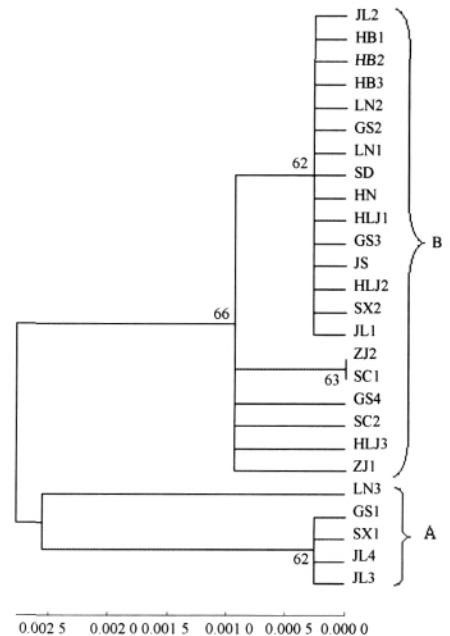
传变异越丰富, 越需要择地而生, 其道地性越明显, 其基因特化越明显。对种内遗传结构和遗传分化的研究, 可以为道地药材的基因特化找到依据^[5]。本实验研究中样品 SD 在 304 bp 有 G, 而其他的样品为 A, 该样品来自山东省苍山地区为引自日本的栽培品种“柳川理想牛蒡子”, 对该样品进行了 HPLC 的牛蒡苷含量测定, 质量分数为 9.472%, 千粒重为 15.220 g, 是所有样品中 2 个指标最高的。样品 HLJ3, JL3, JL4, LN3, ZJ1, ZJ2, SX1, GS1, GS4, SC1, SC2 在 229 bp 具有 C 而其他样品具有 T。在 580 bp 位点样品 JL3, JL4, LN3, SX1, GS1 具有 A, 而其他样品具有 G。通过 Neighbor-joining 法建立系统树 26 个样品被分成 2 组, LN3, GS1, SX1, JL4, JL3 为基因 I 型, 其他的为基因 II 型, 见表 4, 图 1。基因 I 型在 ITS2 上的 580 bp 位点有 A, 而基因 II 型有 G。2 种基因型与地理分布的关系, 在样品中 I 型分布在辽宁清原、甘肃天水、陕西北宁、吉林延吉、吉林蛟河, 均为野生样品。黑龙江、浙江、江苏、山东、四川、

表3 牛蒡 ITS 序列位点差异

No.	ITS 序列位点差异 /bp													
	14	51	91	110	210	229	298	304	416	479	572	580	615	635
HLJ1	A	A	C	T	T	T	A	A	T	A	A	G	T	T
HLJ2	A	A	C	T	T	T	A	A	T	A	A	G	T	T
HLJ3	A	A	C	T	T	C	A	A	T	A	A	G	T	T
JL1	A	A	C	T	T	T	A	A	T	A	A	G	T	T
JL2	A	A	C	T	T	T	A	A	T	G	G	G	T	T
JL3	A	A	C	T	T	C	A	A	T	A	A	A	T	C
JL4	A	A	C	T	T	C	A	A	C	A	A	A	T	C
LN1	A	A	C	T	T	T	A	A	T	A	A	G	T	T
LN2	A	A	C	T	T	T	A	A	T	A	A	G	T	T
LN3	G	G	C	T	T	C	A	A	T	A	A	A	T	T
ZJ1	A	A	C	T	T	C	A	A	T	A	A	G	T	T
ZJ2	A	A	C	T	T	C	A	A	T	A	A	G	C	T
JS	A	A	T	T	C	T	A	A	T	A	A	G	T	T
SX1	A	A	C	T	T	C	A	A	T	A	A	A	T	C
SX2	A	A	C	T	T	T	A	A	T	A	A	G	T	T
GS1	A	A	C	T	T	C	A	A	T	A	A	A	T	C
GS2	A	A	C	T	T	T	A	A	T	A	A	G	T	T
GS3	A	A	C	T	T	T	A	A	T	A	A	G	T	T
GS4	A	A	C	T	T	C	A	A	T	A	A	G	T	T
SD	A	A	C	T	T	T	A	G	T	A	A	G	T	T
SC1	A	A	C	T	T	C	A	A	T	A	A	G	C	T
SC2	A	A	C	C	T	C	C	A	T	A	A	G	T	T
HB1	A	A	C	T	T	T	A	A	T	A	A	G	T	T
HB2	A	A	C	T	T	T	A	A	T	A	A	G	T	T
HB3	A	A	C	T	T	T	A	A	T	A	A	G	T	T
HN	A	A	C	T	T	T	A	A	T	A	A	G	T	T

表4 不同来源牛蒡子药材质量与基因分型 (n=2)

No.	牛蒡苷/%	千粒重/g	基因型	580 bp(ITS2)
HLJ1	6.985	9.587	II型	G
HLJ2	5.752	8.529	II型	G
HLJ3	6.816	10.186	II型	G
JL1	6.298	8.470	II型	G
JL2	7.599	10.035	II型	G
JL3	5.620	9.922	I型	A
JL4	5.225	6.973	I型	A
LN1	7.634	9.873	II型	G
LN2	6.561	8.453	II型	G
LN3	3.611	5.586	I型	A
ZJ1	6.323	7.765	II型	G
ZJ2	7.258	9.829	II型	G
JS	6.164	10.982	II型	G
SX1	6.212	7.975	I型	A
SX2	6.895	9.345	II型	G
GS1	2.538	5.803	I型	A
GS2	5.008	8.230	II型	G
GS3	6.734	10.619	II型	G
GS4	7.593	9.743	II型	G
SD	9.472	15.220	II型	G
SC1	6.854	12.803	II型	G
SC2	4.710	6.402	II型	G
HB1	7.702	7.629	II型	G
HB2	6.910	7.079	II型	G
HB3	6.505	8.269	II型	G
HN	6.022	7.304	II型	G



A. 基因 I 型; B. 基因 II 型。

图1 根据 ITS 序列建立的牛蒡系统树

湖北、湖南的样品均为 II 型, 吉林抚松、吉林桦甸、辽宁本溪、辽宁铁岭、甘肃宕昌、甘肃岷县、甘肃渭源、

陕西太白等样品也为Ⅱ型在所有26份样品中,Ⅰ型有5个产地,Ⅱ型有21个产地。栽培的牛蒡均为Ⅱ型,其来源具有一定的相似性。

对26个不同来源的牛蒡子进行质量评价分析,传统认为牛蒡子粒大成熟饱满着质佳,本实验选择牛蒡子药材中牛蒡苷含量和千粒重2个指标进行测定。Ⅰ型基因牛蒡子药材中牛蒡苷为(4.641 ± 1.521)% ,而Ⅱ型基因牛蒡子药材中牛蒡苷为(6.752 ± 1.011)% ,药典中规定牛蒡苷不低于5.0%。经过SPSS 13.0统计分析,在0.05显著水平下,2种基因型的牛蒡子药材中牛蒡苷含量有显著性差别($r=0.001 < 0.05$),千粒重有显著性差别($r=0.043 < 0.05$),在0.01水平,牛蒡子药材中牛蒡苷含量与千粒重极显著性相关($r=0.730^{**}$)。牛蒡子药材质量受到内因和外因2个因素的影响,外因是生态环境包括阳光、水分、土壤等多种条件,

内因是遗传因素,研究了不同来源的牛蒡其染色体均为2倍体 $2n=36$ ^[6],本研究表明根据ITS序列的差异进行的基因分型与牛蒡子药材的质量具有一定的相关性,有必要进一步深入研究牛蒡中牛蒡苷的生物合成机制与牛蒡子药材道地性的形成原理。

[参考文献]

- [1] 张英,陈瑶,张金超,等. 广藿香ITS基因型与地理分布的相关性分析[J]. 药学学报, 2007, 42(1): 93.
- [2] 刘春生. ITS序列和 β -香树酯醇合成酶基因与甘草酸形成和积累的相关性研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2006: 6.
- [3] 许亮, 龚德强, 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): 45.
- [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] 黄璐琦, 肖培根. 分子药理学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2008: 158.
- [6] 许亮, 龚德强, 王冰, 等. 中国牛蒡属染色体分析[J]. 中药材, 2009, 32(3): 337.

Study on correlation between ITS sequence of *Arctium lappa* and quality of *Fructus Arctii*

XU Liang, DOU Deqiang, WANG Bing, YANG Yanyun, KANG Tingguo*
(Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

[Abstract] **Objective:** To study the correlation between ITS sequence of *Arctium lappa* and *Fructus Arctii* quality of different origin. **Method:** The samples of *Fructus arctii* materials were collected from 26 different producing areas. Their ITS sequence were determined after polymerase chain reaction (PCR) and quality were evaluated through the determination of arctiin content by HPLC. Genetic diversity, genotype and correlation were analyzed by ClustalX(1.81), Mage 4.0, SPSS 13.0 statistical software. **Result:** ITS sequence of *A. lappa* was obtained from 26 samples, and was registered in the GenBank. Corresponding arctiin content of *Fructus arctii* and 1 000-grain weight were determined. *A. lappa* genotype correlated with *Fructus arctii* quality by statistical analysis. **Conclusion:** The research provided a foundation for revealing the molecular mechanism of *Fructus arctii* geoherb.

[Key words] *Arctium lappa*; ITS sequence; *Fructus Arctii* quality

doi: 10.4268/cjcm20111419

[责任编辑 吕冬梅]