



牛蒡子及其伪品的 ITS 序列分子鉴定研究

许亮, 窦德强, 王冰, 杨燕云, 康廷国*, 刘阳楠

(辽宁中医药大学 药学院, 辽宁 大连 116600)

[摘要] 目的: 研究牛蒡子与伪品之间的 DNA 分子鉴别方法。方法: 采集全国 26 个不同产地的牛蒡子药材 26 份和 4 种伪品毛头牛蒡、大翅蓟、紫穗槐、水飞蓟 10 份样品进行总 DNA 的提取, PCR 扩增, 对扩增产物克隆并测序, 计算机软件统计分析。结果: 测得了 36 份样品的 ITS 序列全长, 分别为牛蒡子 641 bp, 毛头牛蒡为 641 bp, 大翅蓟为 639 bp, 水飞蓟为 630~631 bp, 紫穗槐为 625~626 bp, 在 GenBank 中注册, 获得登记号。牛蒡子样品间的相似性大于 99%, 牛蒡子与大翅蓟、水飞蓟、紫穗槐间的相似性低于 95%, 毛头牛蒡与牛蒡子的相似性为 98.29%~99.22%。通过以 ITS 序列重建系统树进行的聚类分析可以将牛蒡子与伪品有效的区分开。结论: 根据 ITS 序列, 能够有效的区分牛蒡子与伪品。

[关键词] 牛蒡子; ITS 序列; 分子鉴定

牛蒡子为菊科植物牛蒡 *Arctium lappa* L. 的干燥成熟果实, 是临床常用中药, 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^[1]。其常见的伪品有毛头牛蒡 *A. tomentosum* Mill.、大翅蓟 *Onopordum acautum* L.、水飞蓟 *Silybum marianum* Gaertn.、紫穗槐 *Amorpha fruticosa* L. 等植物的果实^[2]。核糖体内转录间隔区 (ITS, internal transcribed spacer) 位于 18 S 和 26 S rDNA 基因之间, 被 5.8 S 基因分为两段即 ITS₁、ITS₂。由于 ITS 区域具有较多的碱基信息, 在长度上具有较好的保守性, ITS 序列测定被广泛的应用于 DNA 条形码^[3-4]、药用植物种质资源研究^[5-9]、中草药鉴别^[7-8], 如毛善国等通过 ITS 序列进行测定对番红花及其混淆品进行了有效的鉴别研究^[9], 车建等通过对 ITS 序列测定鉴定了西红花及其易混的中药材^[10], 刘春生等通过基于核 DNA ITS 序列对细辛药材的基原及分子鉴定进行了研究^[11]。本实验在课题组对牛蒡子生药学系统研究的基础上^[12-15], 对牛蒡子及伪品进行 ITS 序列分子鉴定, 为牛蒡子药材的真伪鉴定、种质资源评价提供参考。

1 材料与方法

1.1 总 DNA 提取 本实验所用牛蒡子及伪品材料见表 1, 均经辽宁中医药大学康廷国教授鉴定。对不同采集地牛蒡子及伪品的总 DNA 采用 CTAB 法进行提取, 取材料适量, 加液氮研磨破碎, 迅速转移至微量离心管中, 加入提取液 (0.2 mol/L EDTA, 0.1 mol/L Tris-Cl, pH 8.0, 1.4 mol/L 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, 轻轻混匀 10 min 之后离心 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 NaAc, 2 倍体积无水乙醇, 混匀。-20℃ 沉降 20 min 或过夜。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。

1.2 引物的设计 根据文献^[7-8]选择了 2 对引物进行 ITS 序列的扩增, 委托大连宝生物公司进行合成。P₁ 和 P₂ (P₁: 5'-CGTAACAAGGTTTCCTAGGTGAAC-3' 位于 18 S 上; P₂: 5'-TTATTGATATGCTTAACCTCAGCGGG-3' 位于 26 S 上)。ITS₁ 和 ITS₂ (ITS₁: 5'-AGAAGTCGTAACAAGGTTTCCTAGG-3'; ITS₂: 5'-TCCTCCGCTTATIGATATGC-3')。通过 PCR 产物扩增条带的明亮、清晰程度, 最后选择 ITS₁、ITS₂ 作为扩增引物。

1.3 PCR 扩增 PCR 扩增反应体系为 50 μL, 含有 5 μL 10× PCR Buffer (Mg²⁺), 模板 1 μL (10~25 ng), 0.2 μL Taq 酶 (1 U), dNTPs 5 μL, 引物每个

[稿件编号] 20100919004

[基金项目] 国家“十一五”科技支撑计划项目 (2006BAD09B02-6); 科技部基础条件平台项目 (2005DKA21004); 辽宁省教育厅项目 (2009A496); 辽宁中医药大学青年药学人才基金项目 (YXRQ0920)

[通信作者] *康廷国, 教授, 研究方向为中药鉴定与品种评价, Tel: (0411) 87586028

[作者简介] 许亮, 讲师, 博士, 研究方向为中药资源与鉴定的研究及开发, Tel: (0411) 87586004, E-mail: xul@lnu.cn

表 1 牛蒡子与伪品的来源及 ITS序列 GenBank注册号

种名	No	采集地	采集人	GenBank注册号
Arctium lappa	HL1	黑龙江佳木斯	许亮、刘森	F449881
	HL2	黑龙江富锦	许亮、刘森	F449890
	HL3	黑龙江五常	许亮、刘森	F449877
	JL1	吉林抚松	许亮、刘森	F449868
	JL2	吉林桦甸	许亮、吕智	F449879
	JL3	吉林蛟河	许亮、吕智	F449874
	JL4	吉林延吉	许亮、吕智	F449876
	LN1	辽宁本溪	许亮、吕智	F449878
	LN2	辽宁铁岭	许亮、吕智	F449873
	LN3	辽宁清源	许亮、吕智	F449870
	ZJ1	浙江淳安	许亮、吕智	F449871
	ZJ2	浙江建德	许亮、吕智	F449883
	JS	江苏徐州	许亮、吕智	F449889
	SX1	陕西宁陕	许亮、吕智	F449875
	SX2	山西太白	许亮、吕智	F449884
	GS1	甘肃天水	许亮、吕智	F449869
	GS2	甘肃宕昌	许亮、吕智	F449880
	GS3	甘肃岷县	许亮、吕智	F449887
	GS4	甘肃渭源	许亮、吕智	F449865
	SD	山东苍山	王冰	F449886
	SC1	四川松潘	刘森	F449872
	SC2	四川雅安	刘森	F449885
	HB1	湖北恩施	刘森	F449867
	HB2	湖北巴东	刘森	F449888
	HB3	湖北神农架	刘森	F449866
	HN	河南栾川	刘森	F449882
A. tonkinosum	XJ4	新疆乌鲁木齐	窦德强	GQ281034
	XJ5	新疆乌鲁木齐	窦德强	GQ281035
Onopordum acanthium	XJ1	新疆乌鲁木齐	张建逵	GQ281031
	XJ2	新疆乌鲁木齐	张建逵	GQ281032
	XJ3	新疆乌鲁木齐	张建逵	GQ281033
Sibbum marianum	SY1	辽宁沈阳	许亮	GQ281036
	SY2	辽宁沈阳	许亮	GQ281037
	SY3	辽宁沈阳	许亮	GQ281038
Anortha fruticosa	SY	辽宁沈阳	许亮	GQ281029
	DL	辽宁大连	许亮	GQ281030

5 μ L ddH₂O 补齐。反应温度 (PCR仪设置): 预变性 94 $^{\circ}$ C 8 min, 之后进入下列程序: 变性温度 94 $^{\circ}$ C 1 min, 退火温度 57 $^{\circ}$ C 2 min, 延伸温度 72 $^{\circ}$ C 3 min, 35个循环, 之后延伸 72 $^{\circ}$ C 10 min。

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, 按照试剂盒说明书严格操作。取上述连接产物转化新鲜制备的 TOP10 感受态大肠杆菌, 培养过夜后挑取阳性重组克隆的白色菌落培养。

1.5 ITS 测序与序列分析 ITS 序列测定委托宝生物工程 (大连) 有限公司完成。所测得的序列经

BLAST 比对, 用 ClustalX (1.81) 进行同源排序, 用 Mega 4.0 对序列特征进行分析统计。

2 结果与讨论

2.1 不同产地牛蒡子的 ITS 序列 本实验成功扩增并测定了 26 个不同采集地牛蒡子的 ITS 序列, 并在 NCB 的 GenBank 核酸数据库中申请了序列号, 见表 1。在 ITS 序列中, 牛蒡子长度均为 641 bp, G+C 的含量为 59.13% ~ 59.59%, ITS₁ 长为 256 bp, G+C 的含量为 58.59% ~ 59.38%, ITS₂ 长度为 221 bp, G+C 的含量为 63.35% ~ 64.71%。通过计算机软件 Mega 4.0 采用 Nucleotide Maximum Composite

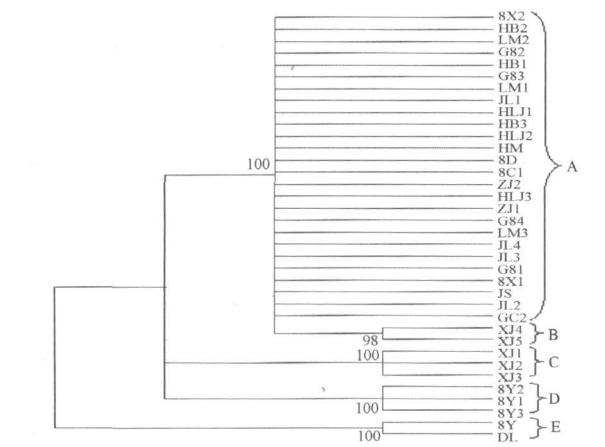
Likelihood Method方法对遗传距离进行分析,结果显示牛蒡子样品的遗传距离为 0.000 0~0.009 5,平均遗传距离为 0.003 2。牛蒡子样品的 ITS序列相似度为 0.990 6~1.000 0,结果表明,不同地区的牛蒡子 ITS序列具有高度的相似性,同时又有一定的变异性,相似度大于 99%。

2.2 牛蒡子与伪品的 ITS序列鉴别 牛蒡子的 4种伪品毛头牛蒡、大翅蓟、紫穗槐、水飞蓟共 10个样品,对其进行 ITS序列分析比较,采用 ITS和 ITS4引物进行 PCR扩增,测序结果登录在 GenBank中,毛头牛蒡为 641 bp,大翅蓟为 639 bp,水飞蓟为 630~631 bp,紫穗槐为 625~626 bp。牛蒡子与其伪品间大翅蓟、水飞蓟、紫穗槐的相似度低于 95%,而牛蒡子样品间的相似度大于 99%。毛头牛蒡与牛蒡的相似度为 98.29%~99.22%,两者为同科属

植物,相似度高,见表 2。以 ITS序列为数据,通过 UPGMA法建立的系统树进行聚类可以分成 4个大组:第 1组包括 SX₂ HB₂ LN₂ GS₂ HB₁ GS₁ LN₁ JL₁ HL₁ HB₃ HL₂ HN₁ SD₁ SC₁ ZL₁ HL₃ ZL₁ GS₄ LN₃ JL₄ JL₃ GS₁ SX₁ JS₁ JL₂ SC₂和 X₁ X₂为不同产地牛蒡和毛头牛蒡;第 2组包括 X₁ X₂ X₃为大翅蓟;第 3组包括 SY₂ SY₁ SY₃为水飞蓟;第 4组包括 SY₁ DL为紫穗槐。每组间区分可信度 100%。在第 1组中又可分为 2个小组,牛蒡子组与毛头牛蒡组,区分可信度为 98%,见图 1。通过系统树聚类分析可以将牛蒡与毛头牛蒡、大翅蓟、水飞蓟、紫穗槐等伪品有效鉴别开。结果表明 ITS序列可以用于鉴别牛蒡子及其伪品,ITS序列分析可以成为牛蒡子及其伪品鉴定分析的有效手段。

表 2 牛蒡及伪品间的 ITS序列相似度

项目	<i>Arctium lappa</i>	<i>A. tomentosum</i>	<i>Onopordum acanthium</i>	<i>Silybum marianum</i>	<i>Anemone fruticosa</i>
<i>Arctium lappa</i>	99.06~100				
<i>A. tomentosum</i>	98.29~99.22	99.53			
<i>Onopordum acanthium</i>	89.64~90.73	89.80~90.42	99.37~99.84		
<i>Silybum marianum</i>	85.96~86.73	85.82~86.11	90.48~90.94	99.52~99.84	
<i>Anemone fruticosa</i>	65.03~66.57	65.53~67.12	64.38~65.72	63.64~64.98	97.60



的中药材鉴定 [J]. 世界科学与技术——中医药现代化, 2007, 3(9): 7.

[4] Shilin Chen, Hui Yao, Jianping Han, et Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species [J]. Plos One, 2010, 15: 8613.

[5] 马小军. 人参种质资源及其 DNA 指纹的研究 [D]. 北京: 中国医学科学院, 北京协和医学院药用植物研究所, 1998.

[6] 徐荣, 陈君. DNA 分子标记在药用植物种质资源研究中的应用 [J]. 世界科学与技术——中医药现代化, 2006, 8(5): 58.

[7] 李文强, 黄士良, 牛玉璐, 等. DNA 分子标记技术在中草药鉴别中的应用 [J]. 河北师范大学学报: 自然科学版, 2005, 29(6): 617.

[8] 许亮, 谷丽艳, 赵丹玉, 等. 基于 ITS 序列的植物类中药材鉴定研究及展望 [J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(4): 737.

[9] 毛善国, 罗玉明, 沈洁, 等. 番红花及其混淆品的 DNA ITS 序列与 AS-PCR 鉴别 [J]. 南京师大学报: 自然科学版, 2007, 30(7): 89.

[10] 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.

[11] 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.

[12] 许亮, 窦德强, 王冰, 等. 中国牛蒡属染色体分析 [J]. 中药

A 牛蒡; B 毛头牛蒡; C 大翅蓟; D 水飞蓟; E 紫穗槐。
图 1 根据 ITS 序列建立的系统树

[参考文献]

[1] 中国药典. 一部. [S]. 2010. 66.

[2] 中国药品生物制品检定所, 广东省药品检验所. 中国中药材真伪鉴别图典. 第 3 册 [M]. 广州: 广东科技出版社, 1997: 46.

[3] 陈士林, 姚辉, 宋经元, 等. 基于 DNA barcoding (条形码) 技术

[13] Dou D Q, Kant T G, Xu L, et Ecological suitability of *Arctium lappa* L. and its suitable cultivation regions in China [J]. Plant Med 2009, 75: 420

[14] 许亮, 王冰, 窦德强, 等. 牛蒡与毛头牛蒡染色体核型比较分析[J]. 中国药理学杂志, 2010, 35(4): 251.

[15] 许亮, 窦德强, 康廷国, 等. 炒牛蒡子质量标准研究[J]. 中成药, 2010, 32(4): 95.

Identification of traditional medicine “ *Fructus Arctii* ”
by nuclear ribosomal DNA ITS sequences

XU Lian[§], DOU Deqiang[§], WANG Bing[§], YANG Yanyun[§], KANG Tingguo^{*}, LIU Yangnan[§]
(Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

[Abstract] Objective: To identify the traditional medicine *Fructus Arctii* from its adulterants by ITS Method. Twenty-six samples of the different *Fructus Arctii* materials and 10 samples of the adulterants of the fruits of *A. lomentosum*, *Onopordum acanthium*, *Silbum marianum*, and *Amorpha fruticosa* were collected. The total DNA of the samples were extracted, amplified, cloned and sequenced. Result: ITS sequences were obtained from 26 samples respectively, there were *Fructus Arctii* 641 bp, *A. lomentosum* 641 bp, *Onopordum acanthium* 639 bp, *Silbum marianum* 630-631 bp, *Amorpha fruticosa* 625-626 bp, which were registered in the GenBank. The similarity in ITS sequences between *Fructus Arctii* and the adulterants was less than 95%. In contrast, the similarity between any pair of *Fructus Arctii* was greater than 99%. The similarity was 98.29%-99.22% between *Fructus Arctii* and *A. lomentosum*. Phylogeny tree reconstruction using UPGMA analysis based on ITS nucleotide sequences can effectively distinguish *Fructus Arctii* from adulterants. Conclusion: ITS sequences can be used as a reliable molecular marker for the identification of *Fructus Arctii*.

[Key words] *Fructus Arctii*; ITS Sequences; molecular identification

doi: 10. 4268/ cjm. 20110324

[责任编辑 吕冬梅]