

· 基础研究 ·

基于ITS2序列的翻白草与委陵菜分子鉴定[△]申应德^{1*}, 巩长芹¹, 王家芳¹, 丁勃², 张新¹, 李学红¹

1. 临沂市检验检测中心, 山东 临沂 276000;

2. 山东省食品药品检验研究院, 山东 济南 250101

[摘要] 目的: 应用DNA条形码技术对翻白草及易混品委陵菜进行分子鉴定, 保障药材质量和临床用药安全。方法: 提取翻白草及委陵菜的基因组DNA, 扩增内转录间隔区2 (ITS2) 序列并双向测序, 所得序列用SeqMan软件校对、拼接; 在线双序列比对翻白草对照药材(F_R)及委陵菜对照药材(W_R)的ITS2序列, 并预测其二级结构; 从GenBank下载部分相关序列, 运用MEGA X软件进行多序列比对, 分析序列变异位点, 计算种内、种间遗传距离, 采用邻接法(NJ)构建系统进化树。结果: 所有样品均成功扩增出ITS2序列, 翻白草和委陵菜的ITS2序列长度均为210 bp。双序列比对结果表明, F_R 与 W_R 的ITS2序列相似性为92.9%, 二级结构存在明显差异。多序列分析结果表明, 翻白草ITS2序列平均鸟嘌呤(G)+胞嘧啶(C)占比为63.0%, 存在2个变异位点, 种内遗传距离为0~0.009 6; 委陵菜ITS2序列平均G+C占比为64.4%, 存在5个变异位点, 种内遗传距离为0~0.019 3; 种间遗传距离为0.054 8~0.075 8。NJ树结果显示, 翻白草、委陵菜聚为不同分支, 可明显区分。结论: 利用ITS2序列可以准确鉴别翻白草与委陵菜, 为保障其安全用药提供了新的技术手段。

[关键词] 翻白草; 委陵菜; DNA条形码; 内转录间隔区2; 分子鉴定

[中图分类号] R282.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2023)06-1194-05

doi: 10.13313/j.issn.1673-4890.20220830001

Molecular Identification of *Potentilla discolor* Bge. and *P. chinensis* Ser. Based on ITS2 SequencesSHEN Ying-de^{1*}, GONG Chang-qin¹, WANG Jia-fang¹, DING Bo², ZHANG Xin¹, LI Xue-hong¹

1. Linyi Inspection and Detection Center, Linyi 276000, China;

2. Shandong Institute for Food and Drug Control, Jinan 250101, China

[Abstract] **Objective:** To carry out molecular identification for *Potentilla discolor* Bge. and its adulterants *P. chinensis* Ser. by DNA barcoding technology, further ensure the quality and medication safety in clinic. **Methods:** The total genomic DNAs were extracted from all samples. The internal transcribed spacers 2 (ITS2) sequence was amplified by PCR and sequenced bi-directionally, and the obtained sequences were validated and assembled by SeqMan software. The pairwise sequence alignment and the prediction of ITS2 secondary structure were performed on-line control drugs of *P. discolor* Bge (F_R) and *P. chinensis* Ser. (W_R). Moreover, some related sequences were downloaded from GenBank. MEGA X software was used for multiple sequence alignment and variation site analysis. The genetic distance within and between species were calculated. Additionally, the phylogenetic tree was constructed by neighbor-joining (NJ) method. **Results:** The ITS2 sequences were successfully amplified from all samples, while the ITS2 sequences of *P. discolor* Bge and *P. chinensis* Ser. were both 210 bp. The pairwise sequence alignment showed that the sequence similarity of ITS2 between F_R and T_R was 92.9%, and obvious differences were detected in the secondary structures. The multiple sequence analysis showed that the average guanine and cytosine (G+C) content of the ITS2 in *P. discolor* Bge. was 63.0%, and two variation sites were found, while the intraspecific genetic distance was 0-0.009 6. However, the average GC content of the ITS2 in *P. chinensis* Ser. was 64.4%, and five variation sites were found, while the intraspecific genetic distance was 0-0.019 3. The interspecific genetic distance was 0.054 8-0.075 8. The NJ tree showed that *P. discolor* Bge. and *P. chinensis* Ser. could be distinguished obviously

[△] [基金项目] 山东省药品质量风险监测项目(鲁食药检业〔2021〕45号)

* [通信作者] 申应德, 主管药师, 研究方向: 药品质量控制; E-mail: shenzhen516@163.com

as they were clustered in different clades. **Conclusion:** ITS2 sequence could be used to identify *P. discolor* Bge. and *P. chinensis* Ser. effectively, which may provide a new technical method for ensuring medication safety in clinic.

[Keywords] *Potentilla discolor* Bge.; *P. chinensis* Ser.; DNA barcoding; ITS2; molecular identification

翻白草是我国的传统药材,始载于《救荒本草》,为蔷薇科委陵菜属植物翻白草 *Potentilla discolor* Bge. 的干燥全草。其味甘、微苦,性平,具有清热解毒、止痢、止血等功效,常用于湿热泻痢、痈肿疮毒等证^[1-2]。现代研究表明,翻白草含有黄酮、萜、甾体、鞣质及有机酸等多类化学成分,具有抗菌、止泻、抗肿瘤、免疫抑制等药理作用,且能有效治疗2型糖尿病^[3-5]。近年来,随着翻白草治疗糖尿病研究的不断深入,临床对其需求不断增加。但市场上翻白草饮片质量参差不齐,甚至存在将委陵菜充当翻白草使用的情况,疗效难以得到保障^[6]。委陵菜为蔷薇科委陵菜属植物委陵菜 *P. chinensis* Ser. 的干燥全草,与翻白草同科同属,属于近缘物种,因其产地、外观性状等相似,所以在许多地区都存在混用现象,存在较大用药安全隐患。

传统的中药材鉴定方法主要是基于性状、显微结构及理化特征。分子生物学技术的不断发展为中药材鉴定提供了新的思路。目前,比较适用的中药DNA分子鉴定方法,如位点特异性聚合酶链式反应(PCR)法、限制性片段长度多态性PCR(PCR-RFLP)法及DNA条形码分子鉴定法均已收录于《中华人民共和国药典》2020年版^{[7]153-155}。DNA条形码的概念由Hebert等^[8]首次提出,是指利用基因组中一段公认的、相对较短的DNA序列进行物种鉴定的一种分子生物学技术,是传统形态鉴别方法的有效补充,具有操作简单、重复性高等特点,尤其适合药用植物鉴定^{[7]490-492}。2010年,Chen等^[9]对6000余份药用植物样本进行DNA条形码序列筛选,首次提出以内转录间隔区2(ITS2)为核心、*psbA-trnH*为补充序列的药用植物条形码鉴定体系。近年来,已有多篇文献报道可以利用ITS2对中药材基原进行准确鉴别^[10-13],表现出独特的鉴定能力优势,得到了很好的验证。

迄今,已有多位学者从植物性状、理化成分对翻白草和委陵菜作了详细鉴别,但未见有关翻白草、委陵菜分子鉴定的报道^[6,14-15]。本研究以翻白草及其常见易混品委陵菜为研究对象,收集翻白草及委陵菜样品共30批,基于ITS2序列的DNA条形码技术构建两者的分子生物学鉴定方法,为准确鉴别翻白

草及委陵菜、保障临床安全用药提供有效手段。

1 材料

1.1 仪器与试剂

Mikro 200R型高速冷冻离心机(Hettich公司);C1000型PCR扩增仪、Mini-Sub cell GT型水平电泳仪、Gel DocXR⁺型凝胶成像系统(Bio-Rad公司);NanoDrop 2000型超微量紫外分光光度计(Thermo公司)。

DNeasy Plant Mini Kit植物基因组DNA提取试剂盒(Qiagen公司);2×Taq PCR预混试剂Ⅱ[天根生化科技(北京)有限公司];DL1000 DNA Marker(TaKaRa公司);ITS2引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2 样品

翻白草对照药材(F_R ,批号:121162-201704)、委陵菜对照药材(W_R ,批号:121021-201803)均购自中国食品药品检定研究院;翻白草(编号1~11)为2021年山东省药品质量风险监测抽检样品;翻白草(编号 F_1 ~ F_3)、委陵菜(W_1 ~ W_{14})均为日常收集样品。样品经临沂市检验检测中心中药检验室副主任药师巩长芹鉴定,分别为蔷薇科委陵菜属植物翻白草 *Potentilla discolor* Bge. 的干燥全草、蔷薇科委陵菜属植物委陵菜 *P. chinensis* Ser. 的干燥全草。

从GenBank数据库下载翻白草ITS2序列(登录号分别为MH349344.1、KR611768.1、MG730293.1、GQ434650.1、FJ980389.1)、委陵菜ITS2序列(登录号分别为MH349339.1、MG730958.1、MH349334.1、KR611747.1、OM180098.1)各5条,用于序列分析及构建分子进化树。

2 方法

2.1 样品DNA提取、ITS2基因PCR扩增及测序

取样品约2 g,充分研磨至细粉。取细粉约30 mg,按照植物基因组DNA提取试剂盒操作步骤提取DNA。用NanoDrop 2000型超微量紫外分光光度计测定DNA浓度,并用灭菌水将其稀释至10~20 ng·μL⁻¹,作为PCR反应模板。

PCR反应体系为25 μL ，包括2 $\times$ Premix Taq 12.5 μL 、上下游引物(10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)各0.5 μL 、模板2 μL ，补加灭菌水至25 μL 。PCR扩增用引物序列为ITS2F(5'-ATGCGATACTTGGTGTGAAT-3')、ITS3R(5'-GACGCTTCTCCAGACTACAAT-3')。PCR扩增程序为94 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 、45 s, 40个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 、10 min。

PCR产物用1.5%琼脂糖凝胶电泳检测后，进行双向测序。测序委托生工生物工程(上海)股份有限公司。

2.2 序列分析

应用SeqMan软件去除测序峰图两端的低质量区及引物序列，并完成校对和拼接。基于隐马尔科夫模型的HMMer注释方法^[16]去除两端5.8S和28S区段，获得ITS2序列。

利用EMBOSS Needle在线双序列比对 F_R 、 W_R 的ITS2序列，比较两者序列差异。根据Koetschan等^[17]建立的ITS2数据库及网站预测ITS2二级结构。利用MEGA X进行多序列比对，计算翻白草及委陵菜平均鸟嘌呤(G)+胞嘧啶(C)占比，分析种内序列变异位点，确定不同的单倍型。相同序列即为同一个序列类型，任意碱基位点有变异者均分别列为不同的序列类型^[18]。选择K2P(Kimura 2-parameter)模型，计算种内和种间距离，采用邻接法(NJ)构建系统进化树。

3 结果与分析

3.1 DNA提取与PCR扩增

结果表明，所有样品均成功提取到基因组。测定各样品在260、280 nm处的吸光度(A)，发现大多数样品 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}} < 1.6$ ，提示DNA提取过程中存在蛋白质污染。

将PCR产物进行凝胶电泳，结果显示所有实验样本PCR产物均有大小约500 bp的单一一条带，且条带较亮，没有拖尾现象。说明模板中存在的少量蛋

白质污染并没有对PCR实验产生明显干扰。PCR反应产物分次凝胶电泳图见图1。

3.2 F_R 与 W_R 的ITS2双序列比对

将 F_R 与 W_R 的ITS2进行双序列比对，结果显示两者序列长度均为210 bp，但相似性仅为92.9%，有15个碱基位点存在不同，差异明显(图2)。

3.3 ITS2序列二级结构预测

采用ITS2序列在线数据库(<http://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de/>)对 F_R 与 W_R 的ITS2序列进行二级结构预测，结果见图3。翻白草的ITS2序列二级结构由1个规整的中心环(loop)和4个螺旋区(helix)组成，每个螺旋区上又有大小不等、数目各异的茎环结构。而委陵菜ITS2序列二级结构的中心环并不规整，存在明显的3个凸起部分，且IV螺旋区的茎环数目与翻白草差异明显。因此，可以通过ITS2序列的二级结构直观区分两者。

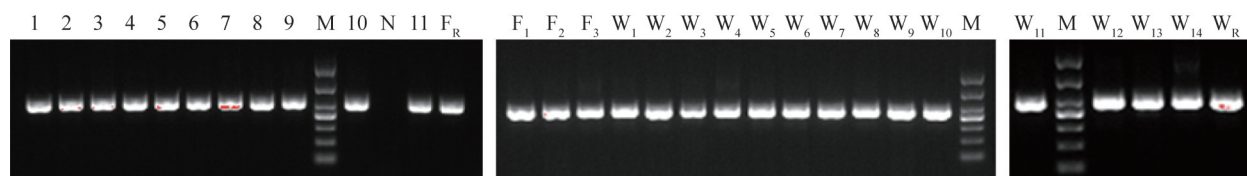
3.4 ITS2序列变异位点及遗传距离分析

翻白草ITS2序列共20条，平均G+C占比为63.0%，种内K2P遗传距离为0~0.009 6，有3个单倍型，存在2个变异位点，分别为第37位的C/G和第163位的C/T(表1)。委陵菜ITS2序列共20条，平均G+C占比为64.4%，种内K2P遗传距离为0~0.019 3，有7个单倍型，存在5个变异位点，分别在第96位A/C、第156位C/A、第165位C/G、第170位C/T及第191位G/A。这说明，翻白草种内具有更为保守的ITS2序列，种内变异更小。

翻白草与委陵菜种间K2P遗传距离为0.054 8~0.075 8，远大于种内最大遗传距离，具有明显的条形码间距，说明K2P距离可很好地区分两者。

3.5 NJ进化树构建

作为DNA条形码鉴别序列，既要有足够的种间变异，可将不同物种区分开来，同时又有较小的种内变异，可将同一物种聚为一类^[19]。从图4上看出，翻白草和委陵菜明显地聚为不同的一支，且各支的



注：N. 空白对照；M. DL1000 DNA marker。

图1 翻白草与委陵菜样品PCR产物琼脂糖凝胶电泳图

F _R	1	CACGTCGTCGCTCCCAACCCCTTCGGGAGTIGGCTGGGACGGATGAT	50
W _R	1	CACGTCGTCGCTCCCAACCCCTTCGGGAGTIGGCTGGGACGGATGAT	50
F _R	51	GGCCTCCCGTCGCTCCGTCGCGCGGTGGGATTAATAACAGTCTCTCGG	100
W _R	51	GGCCTCCCGTCGCTCCGTCGCGCGGTGGGATTAATAACAGTCTCTCGG	100
F _R	101	CGGCCAACGCGCGCAATCGGTGGTGTGCAACCTCGGTGCTCTCGC	150
W _R	101	CGGCCAACGCGCGCAATCGGTGGTGTGCAACCTCGGTGCTCTCGC	150
F _R	151	GTGCGAGTCGTCGCGGCTTTTCCAACTGATGCGCGTCGATTCGTCGC	200
W _R	151	GTGCGAGTCGTCGCGGCTTTTCCAACTGATGCGCGTCGATTCGTCGC	200
F _R	201	GCTTTCACG	210
W _R	201	GCTTTCACG	210

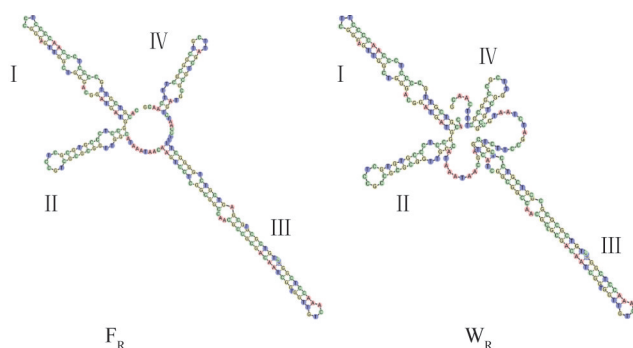
图2 F_R与W_R的ITS2序列双序列比对图3 F_R与W_R的ITS2二级结构

表1 翻白草及委陵菜种内ITS2序列变异分析

名称	单倍型	变异位点						
		37	96	156	163	165	170	191
翻白草	A1	C	/	/	C	/	/	/
	A2	G	/	/	*	/	/	/
	A3	*	/	/	T	/	/	/
委陵菜	B1	/	A	C	/	C	C	G
	B2	/	C	A	/	*	*	A
	B3	/	*	A	/	*	*	A
	B4	/	*	*	/	G	*	*
	B5	/	*	*	/	*	T	A
	B6	/	*	*	/	*	T	*
	B7	/	*	*	/	*	*	A

注: *表示与单倍型A1或B1碱基相同; /表示该碱基位点不存在变异。

支持率 bootstrap 值较高, 可明显区别。

4 讨论

植物细胞内存在大量的多糖、酚、蛋白质等次生代谢产物, 这些物质与DNA共沉淀易形成黏稠的胶状物, 影响了DNA的提取质量^[20]。本研究采用试剂盒法提取30份样品的DNA, 结果显示大多数样品DNA的 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}} < 1.6$ 。原则上, 用于PCR的DNA模板 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 在1.8~2.0为宜。为了提高模板的质量, 对DNA提取过程进行了改进探索, 如增加三氯

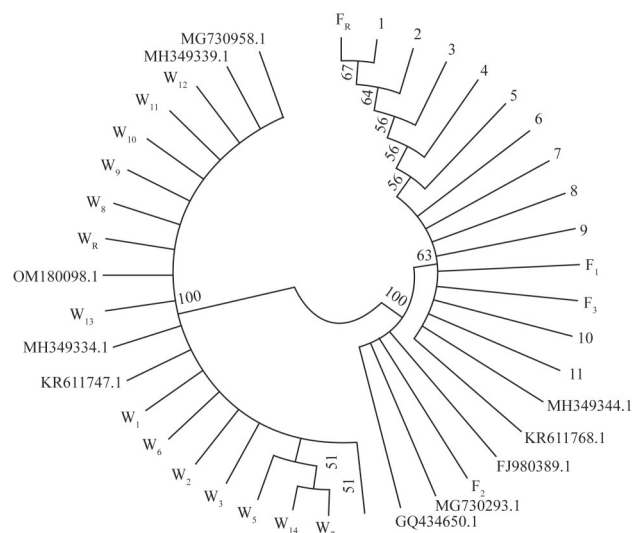


图4 基于ITS2序列构建的翻白草及委陵菜NJ树

甲烷去蛋白质步骤、延长离心沉淀时间、改变裂解条件为56℃过夜^[21]等。这些条件的改变, 部分提高了样品DNA的浓度, 但对纯度没有明显改善。琼脂糖凝胶电泳及测序表明, 所有样品均扩增出ITS2序列, 低 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 值未对ITS2序列的PCR扩增产生影响, 显示出该方法具有较好的耐用性。

基于基因序列差异的比较为中药材鉴定提供了最本质的依据。作为当前生物分类学鉴定研究中的热门方向, DNA条形码技术在基因水平上对物种标记进行鉴定, 不受植物生长发育阶段、取样部位及环境因素的影响, 避免了主观人为的判断和客观条件的影响, 是对传统中药鉴定方法的有效补充^[22-24]。植物DNA条形码研究经历了大量叶绿体片段(如 $rbcL$ 、 $matK$ 、 $trnH-psbA$ 等)、核糖体基因ITS/ITS2及多种片段组合的筛选验证阶段^[25]。近年来, Chen等^[9]通过对大量药用植物样本进行深入分析和研究, 最终确定将ITS2作为鉴别药用植物及其近缘种的标准DNA条形码, 同时也推荐叶绿体基因间隔区片段 $psbA-trnH$ 作为补充条形码, 这为中药快速、准确的鉴定打下了基础。

本研究以翻白草及其常见易混品委陵菜为研究对象, 收集翻白草及委陵菜样品共30批, 提取样品的DNA, 进行ITS2序列扩增、测序、拼接, 对序列的长度、二级结构、G+C占比、序列变异、遗传距离及分子进化树等进行分析, 表明基于ITS2序列的DNA条形码技术可以准确鉴别翻白草及委陵菜, 为保障临床安全用药提供参考。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:400-401.
- [2] 陆钰婷,高常柏,付滨. 翻白草的本草考证[J]. 湖南中医杂志,2019,35(3):126-128.
- [3] 孙奕,邓雁如,王颖,等. 翻白草的化学成分及药理活性研究进展[J]. 中成药,2016,38(3):639-645.
- [4] 孔晓妮,崔海燕,周洪雷. 翻白草总黄酮对2型糖尿病db/db小鼠降血糖的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2021,27(3):78-84.
- [5] 孙琛,张健,王征,等. 翻白草总黄酮及翻白草复方的降血糖作用研究[J]. 中国现代中药,2015,17(9):917-921.
- [6] 孔晓妮,吕华瑛,周洪雷. 翻白草中黄酮类成分含量测定及其质量评价研究[J]. 山东中医药大学学报,2022,46(1):108-114.
- [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:四部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020.
- [8] HEBERT P D N, CYWINSKA A, BALL S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes[J]. Proc Biol Sci,2003,270(1512):313-321.
- [9] CHEN S L, YAO H, HAN J P, et al. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species[J]. PLoS ONE, 2010, 5(1): e8613.
- [10] 张平,黄聪琳,王晓琳,等. 苦水玫瑰ITS及ITS2序列分析与鉴别[J]. 中国现代中药,2021,23(7):1190-1194.
- [11] 夏召弟,刘霞,冯玛莉,等. 基于ITS2条形码鉴定藏柴胡及其易混品[J]. 中草药,2020,51(23):6062-6069.
- [12] 穆威杉,谢红波,赵晴,等. 基于ITS2序列的市售木通药材及其混伪品的分子鉴定[J]. 中草药,2022,53(7):2108-2114.
- [13] 陈芙蓉,汪涛,郭巧生,等. 基于DNA条形码ITS2序列的野菊及其易混品鉴定研究[J]. 中国中药杂志,2019,44(4):654-659.
- [14] 张立明,殷杰. 翻白草与委陵菜生药学鉴别[J]. 湖北中医杂志,2009,31(11):75-76.
- [15] 孙奕,王颖,谭碧林,等. 近缘植物仙鹤草、委陵菜和翻白草中6种黄酮类化合物含量的比较[J]. 中药材,2016,39(5):991-995.
- [16] KELLER A, SCHLEICHER T, SCHULTZ J, et al. 5.8S-28S rRNA interaction and HMM-based ITS2 annotation[J]. Gene,2009,430(1/2):50-57.
- [17] KOETSCHAN C, HACKL T, MÜLLER T, et al. ITS2 database IV: Interactive taxon sampling for internal transcribed spacer 2 based phylogenies[J]. Mol Phylogenet Evol,2012,63(3):585-588.
- [18] 刘琪,谷巍,杨兵,等. 基于ITS2序列的滨海白首乌及其近缘种DNA分子鉴定[J]. 中草药,2018,49(24):5901-5909.
- [19] 刘新星,欧巧明,石有太,等. 基于ITS2序列鉴别道地药材岷县当归及其混伪品[J]. 中草药,2018,49(20):4877-4883.
- [20] 陈士林,姚辉,韩建萍,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.
- [21] 罗焜,马培,姚辉,等. 多基原药材秦艽ITS2条形码鉴定研究[J]. 药学学报,2012,47(12):1710-1717.
- [22] HAN J P, LIU C, LI M H, et al. Relationship between DNA barcoding and chemical classification of *Salvia* medicinal herbs[J]. Chin Herb Med,2010,2(1):16-29.
- [23] 陈士林. 中药DNA条形码分子鉴定[M]. 北京:人民卫生出版社,2012:6-7.
- [24] 方强强,王燕,彭春,等. 中药DNA条形码分子鉴定技术的应用与展望[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(22):197-205.
- [25] 张彩云,黄珊珊,颜海飞. DNA条形码技术在中药鉴定中的应用进展[J]. 中草药,2017,48(11):2306-2312.

(收稿日期:2022-08-30 编辑:田苗)