

· 实验研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2018.11.001

基于 ITS2 条形码的贯叶金丝桃及其混伪品鉴别研究*

杨宋琪,唐小龙,陈海燕,柯 潇[△]

(四川济生堂药业有限公司,四川 成都 610041)

摘要:目的 应用 ITS2 条形码序列鉴别贯叶金丝桃及其混伪品。方法 提取贯叶金丝桃及其混伪品 DNA,使用 ITS2 通用引物进行 PCR 扩增测序,去除低质量碱基和拼接获得 ITS2 条形码目的序列。基于 MEGA 6.0 中的 K2P 模型,计算贯叶金丝桃及其混伪品的种内和种间遗传距离并构建系统发育树(NJ 树),同时预测 ITS2 二级结构。结果 贯叶金丝桃 ITS2 序列长度为 236 bp,种内最大 K2P 遗传距离为 0.004,与混伪品的种间 K2P 遗传距离分布为 0.107~0.490;由 NJ 树可知,所有贯叶金丝桃均聚为一大支,呈现出明显的单系性,能很好地区分其混伪品,同时贯叶金丝桃与其混伪品在 ITS2 的二级结构上差异明显。结论 应用 ITS2 条形码序列可准确鉴别贯叶金丝桃及其混伪品,可用于贯叶金丝桃鉴别。

关键词:贯叶金丝桃;ITS2;鉴别;混伪品

中图分类号:R282.71;R284.1

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2018)11-0001-04

Study on Identification of *Hypericum perforatum* and Its Adulterants Based on ITS2 Bar Code

Yang Songqi, Tang Xiaolong, Chen Haiyan, Ke Xiao

(Sichuan Jishengtang Pharmaceutical Co., Ltd., Chengdu, Sichuan, China 610041)

Abstract: Objective To identify *Hypericum perforatum* and its adulterants by ITS2 bar code sequence. **Methods** The DNA of *Hypericum perforatum* and its adulterants were extracted and sequenced after ITS2 universal primers were amplified by PCR. Low-quality bases were removed and spliced to obtain ITS2 bar code sequence. Based on the K2P model in MEGA 6.0, intraspecific and interspecific genetic distances were calculated and the phylogenetic tree(NJ tree) was constructed, and the secondary structure of ITS2 was predicted. **Results** ITS2 sequence length of *Hypericum perforatum* was 236 bp, the maximum K2P genetic distance within the species was 0.004, and the interspecific K2P genetic distance between *Hypericum perforatum* and its adulterants was 0.107-0.490. From the NJ tree, all the *Hypericum perforatum* clustered into a large branch, showing a clear monophyletic, which could be well separated from its adulterants. Meanwhile, there were significant differences in ITS2 secondary structure between *Hypericum perforatum* and its adulterants. **Conclusion** The ITS2 bar code sequence can accurately identify *Hypericum perforatum* and its adulterants, which can be used for identification of *Hypericum perforatum*.

Key words: *Hypericum perforatum*; ITS2; identification; adulterants

贯叶金丝桃 *Hypericum perforatum* L., 别名贯叶连翘、千层楼、圣约翰草等,为藤黄科金丝桃属多年生草本植物,原产于欧洲和亚洲,在我国陕西、甘肃、山东、新疆、四川、贵州等地均有分布^[1-3]。现代研究表明,其成分金丝桃素、伪金丝桃素在抗抑郁、抗逆转录病毒等方面具有较高的开发价值,是镇定剂、抗炎药、抗抑郁药、抗肿瘤及艾滋病等病毒疾病治疗药物,特别是抗抑郁制剂的重要原料^[4-6]。贯叶金丝桃的广泛应用,导致其资源供不应求,民间常用其他类似品种代替,使其药材品种质量混乱加剧。传统的性状鉴定、显微鉴定和理化鉴定在中药材的物种鉴定上有一定局限性^[7],为了保证中药材临床应用准确、安全、有效,对其准确鉴定很有必要。DNA 条形码技术最先由加拿大动物学家 Paul Hebert 提出,通过测定植物 DNA 序列进行比较,反映其

遗传差异,以进行物种分类和鉴定^[8-10]。ITS2 序列是目前首推的作为植物鉴别的 DNA 条形码之一,包含丰富的变异位点和信息位点,对植物有较高的鉴别能力^[11-12]。有研究表明,核 ITS2 序列的鉴定能力优于国际条形码协会植物工作组提出的 matK 和 rbcL 组合,首次提出将 ITS2 作为药用植物鉴定的通用条形码序列^[13]。本研究中应用 ITS2 条形码序列鉴别贯叶金丝桃及其混伪品,以期对贯叶金丝桃中药材准确鉴定提供新方法。

1 材料与方法

1.1 材料

收集来自于甘肃地区的贯叶金丝桃及其混伪品 90 份,另从 GenBank 中下载 3 条贯叶金丝桃 ITS2 条形码序列,基因登录号为 GQ434761, GU596502 和 EU796888。样本信息见表 1。

*基金项目:四川省重大产业技术创新专项[2012CD00082]。

第一作者:杨宋琪(1981-),女,大学本科,工程师,研究方向为中药质量标准,(电话)028-64287669。

[△]通信作者:柯潇(1983-),男,硕士研究生,高级工程师,研究方向为中药新药,(电话)028-64287521。

表1 贯叶金丝桃及其混伪品的样本信息

序号	名称	产地	序号	名称	产地
1	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃康县	46	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃礼县
2	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃礼县	47	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃礼县
3	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃礼县	48	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃礼县
4	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃武都	49	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃礼县
5	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃武都	50	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃礼县
6	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃武都	51	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃礼县
7	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃武都	52	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃礼县
8	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃武都	53	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃礼县
9	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃武都	54	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃礼县
10	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃武都	55	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃礼县
11	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃武都	56	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃礼县
12	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃康县	57	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃礼县
13	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃康县	58	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃礼县
14	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃康县	59	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃礼县
15	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃康县	60	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃礼县
16	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃康县	61	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃礼县
17	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃康县	62	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃礼县
18	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃康县	63	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃礼县
19	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃康县	64	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃礼县
20	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃康县	65	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃礼县
21	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃康县	66	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃康县
22	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃康县	67	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃康县
23	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃康县	68	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃康县
24	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃康县	69	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃康县
25	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃礼县	70	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃康县
26	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃礼县	71	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃康县
27	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃礼县	72	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃康县
28	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃礼县	73	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃康县
29	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃礼县	74	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃康县
30	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃礼县	75	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃康县
31	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃礼县	76	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃康县
32	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃礼县	77	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃康县
33	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃礼县	78	<i>Achillea millefolium</i>	甘肃康县
34	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃礼县	79	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃康县
35	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃康县	80	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃康县
36	<i>Erigeron annuus</i>	甘肃康县	81	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃礼县
37	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃康县	82	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃礼县
38	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃康县	83	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃礼县
39	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃康县	84	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃礼县
40	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃康县	85	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃礼县
41	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃武都	86	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃礼县
42	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃武都	87	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃礼县
43	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃武都	88	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃礼县
44	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃武都	89	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃礼县
45	<i>Hypericum perforatum</i> L.	甘肃礼县	90	<i>Hypericum ascyron</i>	甘肃礼县

1.2 方法

1.2.1 DNA提取和PCR扩增

采用北京擎科新业生物技术有限公司植物基因组DNA提取试剂盒(货号TSP101)提取贯叶金丝桃及其混伪品的总DNA。使用植物ITS2区通用引物(ITS2F: 5'-ATGCGATACTTGGTGTGAAT-3'; ITS2R: 5'-GACGCTTCTCCAGACTACAAT-3')进行PCR扩增。

PCR反应体系在200 μ L离心管中进行,反应总体积为25 μ L,反应体系包括:购自北京擎科新业生物技术有限公司的高保真PCR反应预混液I-5™ 2 $\times$ High-Fidelity Master Mix 12.5 μ L, ITS2F 1 μ L, ITS2R 1 μ L, DNA 0.5 μ L, ddH₂O 10 μ L。PCR反应程序为98℃预变性2 min,循环反应35次(98℃ 10 s, 56℃ 10 s, 72℃ 30 s),72℃延伸3 min,8℃保存。PCR产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳检测后送北京擎科新业生物技术有限公司进行双向测序。

1.2.2 数据处理

采用CodonCode Aligner对所得序列峰图进行校对拼接,去除引物区和低质量的序列,由基于隐马尔可夫模型(Hmmer)的注释方法切除ITS2两端的5.8S和28S区域,获得标准的ITS2间隔区序列^[14],将获得的ITS2序列提交到中药材DNA条形码鉴定系统(<http://www.tcmbarcode.cn>)或GenBank数据库中应用BLAST(Basic Local Alignment Search Tool)进行序列比对。同时将所得ITS2序列利用MEGA 6.0进行多重比对,基于Kimura-2-parameter(K2P)模型计算遗传距离,并采用邻接(NJ)法构建系统发育树(NJ树),并进一步预测ITS2二级结构,获得二级结构预测图。

2 结果与分析

2.1 DNA提取及PCR扩增结果

本研究中提取样本的基因组DNA,条带清晰,无明显降解,无蛋白和多酚多糖污染,满足后续扩增试验要求。贯叶金丝桃及混伪品经PCR扩增后电泳检测均得到约为700 bp大小的片段。PCR产物双向测序均获得成功,经拼接后获得高质量的序列。

2.3 种内种间变异

贯叶金丝桃种内序列共87条,ITS2序列长度为236 bp,变异位点为3个。种内最大K2P距离为0.004。贯叶金丝桃混伪品共3条序列,分别为36号样本一年蓬 *Erigeron annuus*, 78号样本蓍 *Achillea* 和90号样本长柱金丝桃 *Hypericum ascyron*, ITS2序列长度分别为212, 206, 230 bp。36号样本一年蓬 *Erigeron annuus* 与贯叶金丝桃种间最小K2P遗传距离分布为0.490;78号样本蓍 *Achillea* 与贯叶金丝桃种间最小K2P遗传距离分布

为0.320;90号样本长柱金丝桃 *Hypericum ascyron* 与贯叶金丝桃种间最小K2P遗传距离分布为0.107。

2.4 NJ树分析

利用MEGA6.0,采用邻接法,基于本研究中获得的所有ITS2单倍型序列和GenBank中下载的3条贯叶金丝桃ITS2条形码序列,基因登录号GQ434761, GU596502和EU796888构建聚类NJ树(图1)。由构建的NJ树可见,与和GenBank中下载的3条贯叶金丝桃ITS2条形码序列聚在一大支上的均为真的贯叶金丝桃,而36,78,90这3个样本的ITS2条形码序列单独聚为一支,为贯叶金丝桃伪混品。

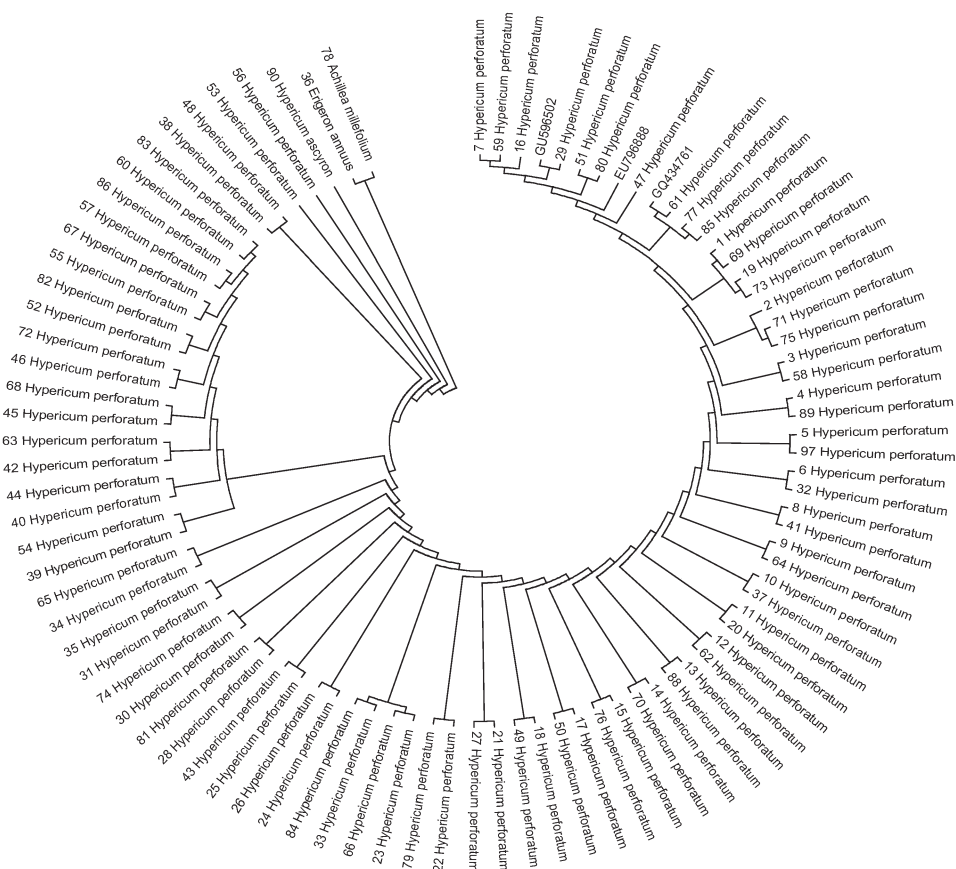
2.5 贯叶金丝桃及其混伪品ITS2二级结构预测

根据<http://its2.bioapps.biozentrum.uniwuerzburg.de/>所预测的供试样本的ITS2二级结构结果可见,所有物种的二级结构均为一个中心环及4个螺旋区构成,每个螺旋上又有或多或少的大小不一的茎、环结构。预测GenBank中下载的3条贯叶金丝桃ITS2条形码序列,以及和这3条序列聚类最近的16,29,81样本,还有36,78,90这3个混伪品的ITS2二级结构。贯叶金丝桃的ITS2序列二级结构为一个中心环(主环),在螺旋I区上有4个茎环,在螺旋II区有3个茎环,在螺旋III区有6个茎环,在螺旋IV区有2个茎环。而36号样本一年蓬 *Erigeron annuus* 和78号样本蓍 *Achillea millefolium* 与贯叶金丝桃ITS2条形码序列二级结构均有差异。90号样本长柱金丝桃 *Hypericum ascyron* 与贯叶金丝桃ITS2条形码序列二级结构的中心主环和I, III, IV个螺旋区有差异。

3 讨论

贯叶金丝桃应用广泛,市场上充斥着各种混伪品,传统的鉴定方法有其局限性。利用DNA条形码技术,从分子水平上对其进行准确鉴定很有必要。

理想的DNA条形码通常需要满足以下3个标准:物种水平具有显著的遗传变异和分化,能鉴别不同物种;合适的长度,便于DNA扩增、测序、拼接及排序时不需要手动调整;目的片段两端具有保守位点,可用于通用引物设计。ITS2正是具有以上优点被提出作为药用植物鉴定的标准条形码序列。同时,作为分子系统进化研究中最重要标记之一,ITS2序列在物种水平或种下水平具有明显的序列变异性,其二级结构可提高系统发育树重建的准确性^[13-14]。本研究针对贯叶金丝桃及混伪品运用ITS2扩增测序均能很好地完成;同时,贯叶金丝桃种内最大K2P遗传距离为0.004,与其混伪品种间K2P遗传距离分布为0.107~0.490,可见ITS2条形码序列在贯叶金丝桃种间变异和分化显著,能将



(收稿日期:2018-01-05)