

藏药小檗皮的 DNA 条形码鉴定研究

李艳¹, 李海娇², 何洋³, 吕秀梅², 赖先荣¹, 张艺¹, 范刚¹

(1. 成都中医药大学民族医药学院, 成都 611137;

2. 成都中医药大学药学院, 成都 611137;

3. 成都中医药大学医学技术学院, 成都 611137)

摘要: 目的: 应用 ITS、ITS2 和 rbcL 序列对藏药小檗皮进行 DNA 条形码鉴定。方法: 以小檗皮药材的 4 种主流品种(刺红珠 *Berberis dictyophylla* Franch.、甘肃小檗 *Berberis kansuensis* Schneid.、鲜黄小檗 *Berberis diaphana* Maxim.、匙叶小檗 *Berberis vernae* Schneid.) 为研究对象, 提取药材的基因组 DNA、扩增 PCR 和双向测序, 获得 ITS、ITS2 和 rbcL 序列, 通过对序列特征、变异位点、遗传距离、barcoding gap 以及系统进化树的分析, 筛选出鉴定小檗皮的最佳条形码序列。结果: 所有样本均能提取到 DNA, DNA 片段多在 200~750 bp 之间, 三种序列的 PCR 扩增和测序效率均为 100%。根据 rbcL 序列, 四个品种能得到明显的区分。结论: 基于 rbcL 序列的 DNA 条形码技术可较好的区别小檗皮药材的 4 种主流品种, 研究结果为小檗皮药材的品种鉴定提供了参考和依据。

关键词: 藏药; 小檗皮; DNA 条形码; 品种鉴定

中图分类号: R282

Identification of Berberidis Cortex Using DNA barcoding

LI Yan¹, LI Haijiao², HE Yang³, LV Xiumei², LAI Xianrong¹, ZHANG Yi¹, FAN Gang¹

(1. College of Ethnic Medicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137;

2. Pharmacy college, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137;

3. College of Medicine and Technology, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137)

Abstract: Objective: To study the DNA barcode identification of Berberidis Cortex in ITS, ITS2 and rbcL sequences. Methods: Four main species of Berberis (*Berberis dictyophylla* Franch., *Berberis kansuensis* Schneid., *Berberis diaphana* Maxim., *Berberis vernae* Schneid.) were selected as the research objects. The genomic DNAs were extracted from herbs, and the PCR sequences were amplified and bidirectionally sequenced. By analyzing the sequence characteristics, mutation sites, genetic distance, barcoding gap and phylogenetic tree, the best barcode sequence was identified. Results: All the samples could be extracted into DNA, the DNA fragments were mostly between 200-750 bp. The sequencing success rate of all three sequences was 100%. According to rbcL sequence, four varieties can be clearly distinguished. Conclusion: DNA barcoding based on rbcL sequence can distinguish four main varieties of Berberis, and the results provide reference and evidence for the identification of Berberidis Cortex.

Key words: Tibetan medicine; Berberidis Cortex; DNA barcoding; Species identification

藏药小檗皮为典型的多基原药材, 来源于小檗科小檗属多种植物, 在现行标准体系中, 小檗皮基原记载描述多为“同属多种植物”等。小檗皮为常用的皮类药材, 外观颜色多成鲜黄色或黄色, 其基原品种无法运用传统直观的鉴别方法准确鉴别, 而药材来源的准确性是保障其质量稳定可控、临床安全有效的关键。因此, 亟待开展小檗皮药材的品种鉴定研究。DNA 条形码技术是通过比较基因组中一段公认的、相对较短的 DNA 片段, 对物种进行快速识别

基金项目: 高等学校博士点专项科研基金(新教师类)联合资助项目(20135132120012)

作者简介: 李艳(1989-), 女, 硕士研究生, 主要研究方向: 民族药质量研究

通信联系人: 范刚(1983-)男, 副研究员, 主要研究方向: 民族药品质量评价. E-mail: fangang1111@163.com

和鉴定的分子生物学技术^[1],具有较强的通用性,是近年来生物鉴定研究的热点^[2,3],具有准确、稳定、操作简单、重复性好等特点^[4]。为客观、准确鉴定小檗皮药材的基原品种,本研究选取目前被广泛认可的 DNA 条形码候选序列核 ITS、ITS2 片段和叶绿体 *rbcL* 基因,对小檗皮 4 种主流基原品种进行品种鉴定研究。通过种内种间变异和系统发育树比对,筛选出鉴定小檗皮药材基原的最佳 DNA 条形码序列,为其品种鉴定提供分子依据。

1. 仪器与材料

高速冷冻离心机 (CF-RX II/CF-RX 系列, 日立高新技术上海国际贸易有限公司); 超纯水仪系统 (ELGA PURELAB Ultra, 上海普松国际贸易有限公司); 组织研磨仪 (SCIENTZ-48, 宁波新芝生物科技股份有限公司); WD-9413A 凝胶成像分析仪; DYY-8C 型电泳仪; 底温保存箱 (DW-25L262, Haier)。

引物、Tris、EDTA (上海生工生物工程公司); 天根植物基因组 DNA 提取盒 (天根生化科技北京有限公司); PCRmix、Taq 酶 (天根生化科技北京有限公司); 西班牙琼脂糖 (北京恒奥生物科技有限公司); GoodViewTM (北京赛百盛基因技术有限公司)。

本文共收集 19 批小檗皮样品, 主要来自于云南、青海、甘肃等藏区, 经课题组鉴定为刺红珠 *Berberis dictyophylla*、甘肃小檗 *Berberis kansuensis*、鲜黄小檗 *Berberis diaphana* 和匙叶小檗 *Berberis verna*, 凭证标本保存于成都中医药大学民族医药学院, 样品信息见表 1。

表 1 小檗皮样品来源

Tab. 1 Plant information of *Berberidis Cortex*

序号	编号	基原植物	拉丁名	采集地
1	B. dictyophylla-1	刺红珠	<i>B. dictyophylla</i>	云南省香格里拉县神鹰路
2	B. dictyophylla-2	刺红珠	<i>B. dictyophylla</i>	云南省香格里拉县小中甸镇
3	B. dictyophylla-3	刺红珠	<i>B. dictyophylla</i>	云南香格里拉县机场路边
4	B. dictyophylla-4	刺红珠	<i>B. dictyophylla</i>	西藏墨竹工卡县扎西岗乡
5	B. dictyophylla-5	刺红珠	<i>B. dictyophylla</i>	云南省香格里拉县四村乡
6	B. kansuensis-1	甘肃小檗	<i>B. kansuensis</i>	甘肃省临潭县城关镇
7	B. kansuensis-2	甘肃小檗	<i>B. kansuensis</i>	甘肃省临潭县术布乡
8	B. kansuensis-3	甘肃小檗	<i>B. kansuensis</i>	青海省大通县
9	B. kansuensis-4	甘肃小檗	<i>B. kansuensis</i>	青海省大通县老爷山
10	B. kansuensis-5	甘肃小檗	<i>B. kansuensis</i>	青海省同仁县曲库乎乡
11	B. kansuensis-6	甘肃小檗	<i>B. kansuensis</i>	青海省泽库县麦秀乡
12	B. kansuensis-7	甘肃小檗	<i>B. kansuensis</i>	四川甘孜州道孚县
13	B. diaphana-1	鲜黄小檗	<i>B. diaphana</i>	甘肃省合作市
14	B. diaphana-2	鲜黄小檗	<i>B. diaphana</i>	甘肃省卓尼县七车村
15	B. diaphana-3	鲜黄小檗	<i>B. diaphana</i>	青海省泽库县麦秀乡
16	B. diaphana-4	鲜黄小檗	<i>B. diaphana</i>	青海省门源县花儿沟
17	B. verna-1	匙叶小檗	<i>B. verna</i>	青海省大通县宝库乡
18	B. verna-2	匙叶小檗	<i>B. verna</i>	甘肃省夏河县王格尔塘镇
19	B. verna-3	匙叶小檗	<i>B. verna</i>	甘肃省卓尼县刀告乡

65

2. 方法与结果

2.1 DNA 提取、PCR 扩增和测序

取燥小檗皮植物样品约 50 mg, 用高通量组织球磨机以 50Hz 频率研磨 120 s, 使用核分离液洗涤 3 次, 每次 800 μ L, 去上清, 留沉淀。再采用植物组织 DNA 提取试剂盒提取药材总 DNA, 操作步骤参考文献^[5]。PCR 反应体系为 25 μ L, 包括 2 \times Tag PCR Mix 12.5 μ L, 正反向引物各 1 μ L, DNA 模板 2-3 μ L, 其余体积以 dd H₂O 补充。扩增结束量取 PCR 产物取 4 μ L, 以 0.5 \times TBE 为电泳缓冲液进行凝胶电泳 (120 V, 20 min), 扩增成功的产物用 ABI 3730XL 测序仪进行双向测序。

70

2.2 数据处理

使用 CodonCode Aligner v 3.7.1 对测序峰图进行质量校对与拼接, 并去除低质量序列及引物区, 同时比对并人工校验序列。对于 ITS2 序列, 拼接得到一致序列后使用基于隐马尔可夫模型的 HMMer 注释方法去除两端 5.8S 和 28S 区段获得 ITS2 间隔区序列^[6-8]。*rbcL* 序列根据 GenBank 上的注释处理。将所有获得的 ITS、ITS2、*rbcL* 序列用 MEGA v 6.0 进行序列分析比对, 再基于 Kimura 2 parameter (K2P) 模型对种内及种间遗传距离进行分析 (Align by Muslce), 采用种内遗传距离的分布频度评价 Barcoding Gap, 用邻接 neighbor-joining (NJ) 法和非加权分组平均 unweighted pair-group method with arithmetic (UPGMA) 法构建系统聚类树, 各个分支的支持率使用 Bootstrap 重复 1000 次进行检验。

75

80

2.3 DNA 提取效率及测序成功率

从小檗皮样品中提取得到的 DNA 经 PCR 扩增后进行琼脂糖凝胶电泳检测, 条带清晰, DNA 片段多在 200~750 bp 之间, 三种序列的测序成功率均为 100%, 见表 2。

85

表 2 小檗皮序列特征及种内种间遗传距离
Tab. 2 Characteristics of the DNA barcodes of Berberidis Cortex

	ITS	ITS2	<i>rbcL</i>
序列数	19	19	19
PCR/测序成功率 (%)	100/100	100/100	100/100
比对后序列长度 (bp)	610	253	651
平均 GC 含量 (%)	52.15	55.90	44.07
变异位点	9	7	4
单倍型	7	7	4
种内 K2P 距离 (平均值)	0-0.0131 (0.0063)	0-0.0241 (0.0122)	0
种间 K2P 距离 (平均值)	0-0.0148 (0.0222)	0-0.0282 (0.0078)	0-0.0062 (0.0030)

2.4 序列特征和种内种间距分析

各序列的长度在 200-750 bp 范围内, 其中 ITS2 最短, 为 253 bp, 比对后发现共有 7

90

个变异位点、7种单倍型；ITS和*rbcL*相对较长，分别为616 bp和651 bp，ITS比对后发现共有9个变异位点、7种单倍型，*rbcL*共有4个变异位点、4种单倍型。从序列数量上来看，三种序列数一致，ITS和ITS2的平均GC含量均比*rbcL*高。ITS、ITS2和*rbcL*序列的平均种内种间K2P距离分别为0.0063(0-0.0131)/0.0222(0-0.0148)，

95 0.0122(0-0.0241)/0.0078(0-0.0282)，0(0)/0.0030(0-0.0062)。

结果表明，基于ITS序列的甘肃小檗平均GC含量相对鲜黄小檗、刺红珠和匙叶小檗的含量较低，为51.95%，4种物种的种内最大距离均大于或等于最小种间距离。基于ITS2序列的鲜黄小檗平均GC含量最高，为56.13%，甘肃小檗平均GC含量相对较低，为55.73%；刺红珠和匙叶小檗的最大种内距离大于最小种间距离，其余两物种的最大种内距离均等于最小种间距离。基于*rbcL*序列的刺红珠平均GC含量最高，为44.33%，甘肃小檗与匙叶小檗的平均GC含量相同，为43.93%，4种物种的最大种内距离均小于最小种间距离。

100

2.5 变异位点分析

比较ITS序列单倍型可以得出，以甘肃小檗作为参考序列，刺红珠在6、206、506、515、541、542、590、605 bp处分别有T→C、T→C、G→T、G→A、A→C、T→C、C→G、C→G的变异，鲜黄小檗在6、206、506、541和542 bp处分别与刺红珠有相同的变异，匙叶小檗在523 bp处有T→C的变异。虽然鲜黄小檗和甘肃小檗的单倍型仅一种，但另外两物种均有与其一样的单倍型。由此可见，ITS序列不能实现4种小檗皮品种的鉴别。

105

以甘肃小檗作为参考序列比较ITS2序列的单倍型，发现刺红珠在143、152、178、179、227、242 bp处分别有G→T、G→A、A→C、A→C、C→G、C→G的变异，鲜黄小檗在143、178和179 bp处分别有G→T、A→C、A→C的变异，匙叶小檗在159 bp处有T→C的变异。结果表明，基于ITS2序列的4种小檗皮没有稳定的变异位点，各物种不能得到很好的区分。

110

比较*rbcL*序列单倍型可以得出，不同物种序列中均有稳定或多变的变异位点，可以为物种的鉴定提供参考信息：以鲜黄小檗作为参考序列，比较*rbcL*序列所有单倍型，发现刺红珠在393 bp处有T→C的变异，为刺红珠的稳定变异位点；甘肃小檗在253、398、609 bp处分别有G→T、T→G、G→T的变异，其中，398、609 bp处为甘肃小檗稳定的变异位点；匙叶小檗仅在253 bp处有G→T的变异。由此可见，*rbcL*序列能实现4种小檗皮主流品种的鉴别，以上序列中存在的碱基差异以及稳定的变异位点均为其品种鉴定提供了参考数据。

115

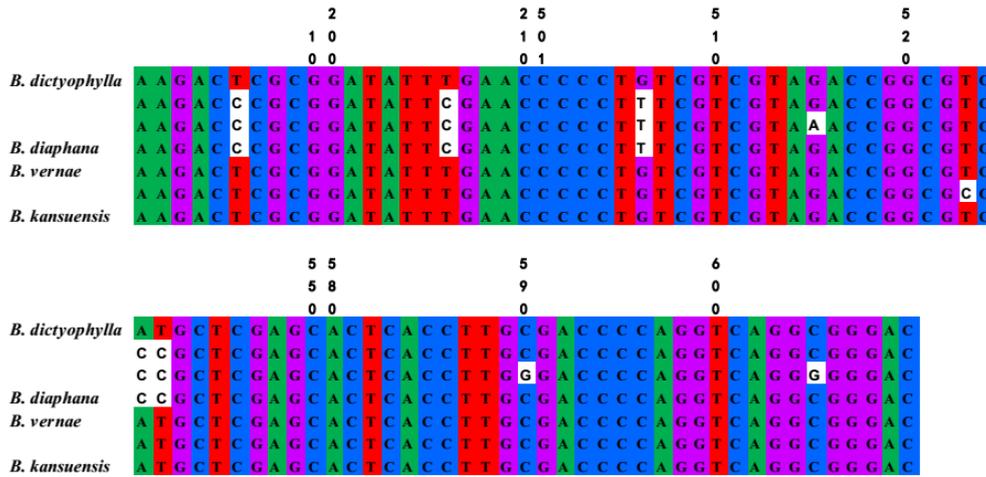


图 1 基于 ITS 序列的小檗皮 4 种基原的变异位点

Figure.1 Variable sites and deletions for different species of Berberidis Cortex based on ITS sequences, the specific variable sites and deletions are highlighted.

120

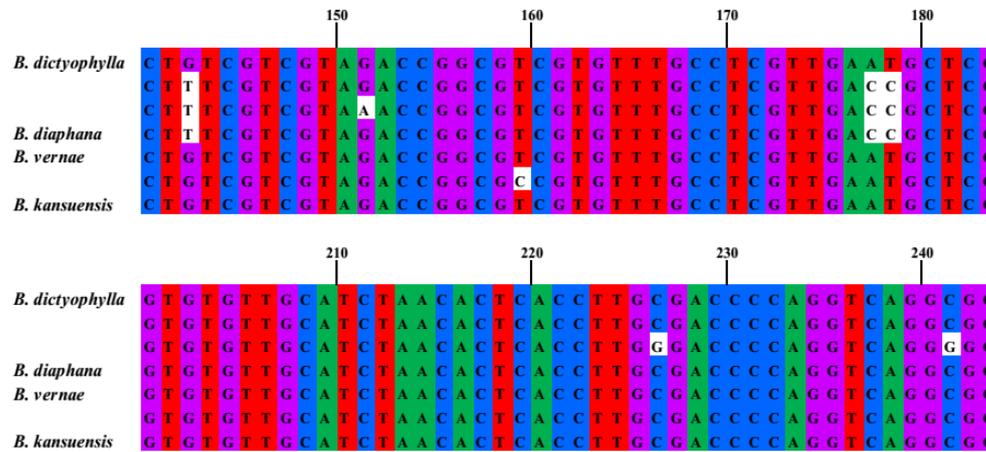


图 2 基于 ITS2 序列的小檗皮 4 种基原的变异位点

Figure.2 Variable sites and deletions for different species of Berberidis Cortex based on ITS2 sequences, the specific variable sites and deletions are highlighted.

125

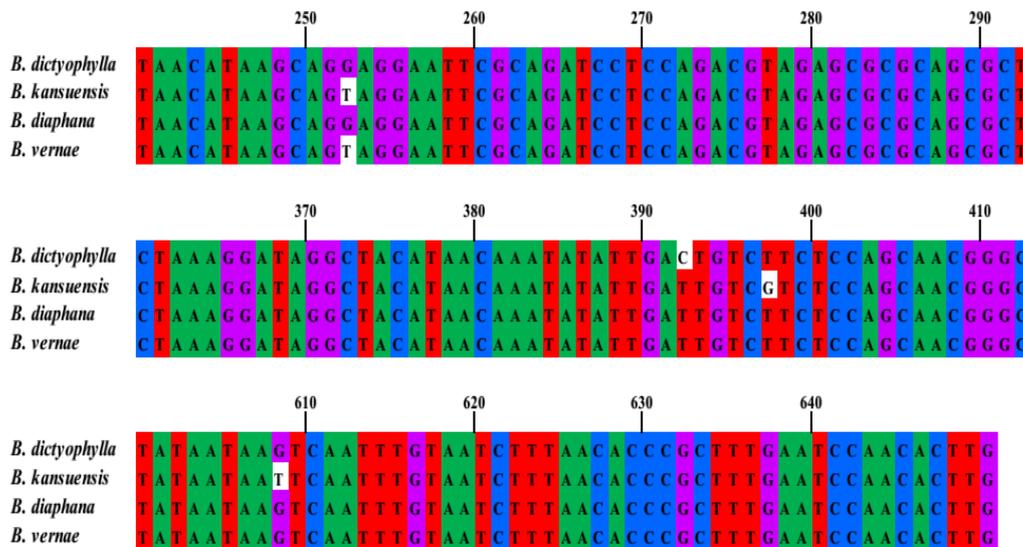


图 3 基于 rbcL 序列的小檗皮 4 种基原的变异位点

Figure.3 Variable sites and deletions for different species of Berberidis Cortex based on rbcL

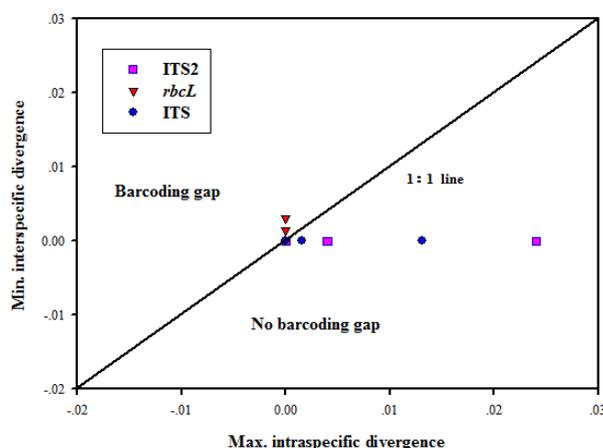
130

sequences, the specific variable sites and deletions are highlighted.

2.6 Barcoding Gap 检验

135

理想的 DNA 条形码种间遗传变异应明显大于种内遗传变异,并且在两者之间存在差异,形成一个明显的间隔区,即 *barcoding gap*。以最大种内距离为横坐标,最小种间距离为纵坐标做图,各个点代表不同基原物种,分布在 1:1 线以上的区域里说明存在 *barcoding gap*,分布在 1:1 线上以及以下的区域里说明没有 *barcoding gap*。从图 4 可以看出,基于 ITS 和 ITS2 序列的刺红珠和匙叶小檗分别在 no *barcoding gap* 的区域,甘肃小檗和鲜黄小檗均在 1:1 线上。结果表明,基于 ITS 和 ITS2 序列的种间遗传变异与种内遗传变异没有明显的差异;而基于 *rbcL* 序列的 4 种小檗皮主流品种均在 1:1 线上。因此,与 ITS、ITS2 序列相比,*rbcL* 序列具有相对较高的鉴定率。



140

图 4 基于 ITS、ITS2 和 *rbcL* 序列的 *barcoding gap* 图

Figure.4 Barcoding gap between different species of *Berberidis Cortex* based on intra- and interspecific distances.

2.7 系统发育树分析

145

本文采用近邻结合法(NJ)和非加权分组平均法(UPGMA)构建系统发育树,发现不同序列基于 K2P 距离构建的系统进化树(UPGMA 方法),可以更直观的展现不同序列的物种的鉴别情况。通过对比 3 种序列发现 *rbcL* 序列表现出最高的鉴定效率:4 种小檗皮主流品种(刺红珠、甘肃小檗、匙叶小檗和鲜黄小檗)均能各自聚为一支,可以对其进行完全鉴定。而 ITS、ITS2 序列的鉴定效率相对较低,不能实现对 4 种小檗皮的物种鉴定。由此可见,序列 *rbcL* 可用于上述 4 种小檗皮主流品种的基原鉴别。

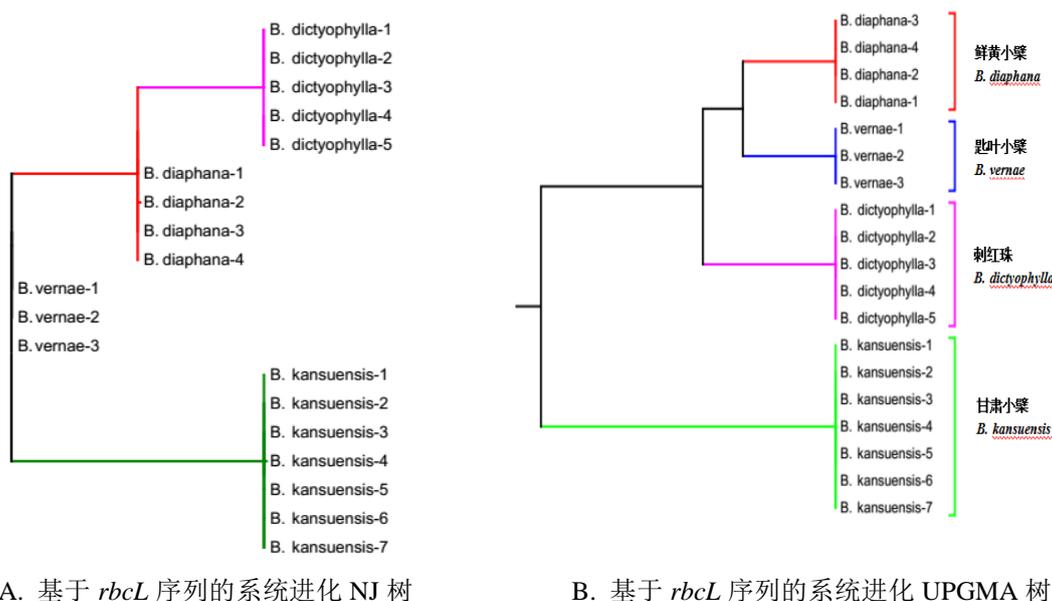


图 5 基于 *rbcL* 序列的不同系统发育树

Figure.5 Different phylogenetic trees of Berberidis Cortex constructed using the *rbcL* region. The bootstrap scores (1000 replicates) are shown ($\geq 50\%$) for each branch

150 **3 讨论**

藏药小檗皮在青海、西藏、甘肃等地方标准中均有记载，而在现行法定标准体系中，仅在西藏、青海等六省区卫生局制订的《藏药标准》中有性状鉴别、理化鉴别等内容^[9]，加上小檗皮药材来源多为小檗属同属植物，化学成分种类基本相似，采用传统理化鉴定方法专属性较差。此外，小檗皮为皮内药材，外观颜色多成鲜黄色或黄色，其基原品种无法运用传统直观的鉴别方法进行准确鉴别。

155

本研究采用不同的 DNA 条形码候选序列 (ITS、ITS2 和 *rbcL*) 对小檗皮 4 种主流品种进行品种鉴定，通过对序列特征、变异位点、遗传距离、barcoding gap 以及系统进化树的分析，发现 *rbcL* 序列表现出较为理想的鉴定效率，4 种主流品种的种内最大 K2P 距离均小于种间最小 K2P 距离且均能各自聚为一支，较好的实现了小檗皮常用品种的鉴别。因此，基于 *rbcL* 序列的 DNA 条形码技术可较好的实现小檗皮药材的基原鉴别。

160

[参考文献] (References)

[1] 陈士林, 姚辉, 韩建萍. 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.

[2] Gregory T Ryan. DNA barcoding does not compete with taxonomy[J]. Nature, 2005, 434(7037): 1067-1067.

[3] Schindel David E, Miller Scott E. DNA barcoding a useful tool for taxonomists[J]. Nature, 2005, 435(7038): 17-17.

[4] 陈士林. 中药 DNA 条形码分子鉴定[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012

[5] 刘圆, 孟庆艳, 彭镰心, 等. RP-HPLC 法测定藏药龙胆花的两种原植物白花龙胆和蓝玉簪龙胆中龙胆苦苷[J]. 中草药, 2006, 37(11): 1738-1739.

[6] Wolf M Achtig M, Schultz J, Dandekar T, et al. Homology modeling revealed more than 20,000 rRNA internal transcribed spacer 2 (ITS2) secondary structures[J]. RNA, 2005, 11(11): 1616-1623.

[7] Keller A Schleicher T, Schultz J, Müller T, et al. 5.8S-28S rRNA interaction and HMM-based ITS2 annotation[J]. Gene, 2009, 430(1): 50-57.

[8] Koetschan C Hackl T, Müller T, Wolf M, et al. ITS2 database IV: interactive taxon sampling for internal transcribed spacer 2 based phylogenies[J]. Molecular phylogenetics and evolution, 2012, 63(3): 585-588.

[9] 西藏、青海、四川、甘肃、云南、新疆卫生局.藏药标准[M].西宁:青海人民出版社,1979:11.

170

175