

基于 ITS 和 psbA-trnH 序列的药用甘草种子鉴定研究

徐冬梅¹ 王祥卫² 王霞^{1*}

(1. 吉林农业科技学院 吉林 吉林 132101)
(2. 泰兴市人民医院 泰州 泰兴 225400)

【摘要】药用甘草是我国最常用的大宗药材之一，建立药用甘草种子的 DNA 条形码鉴定体系具有重要意义。论文对 3 种药用甘草及伪品刺果甘草种子的 ITS 和 psbA-trnH 序列进行了扩增、测序，K2p 遗传距离比较及进化树构建。结果表明：药用甘草与刺果甘草的 ITS 和 psbA-trnH 序列的 PCR 扩增效率和测序成功率均为 100%，2 个序列的种内最大遗传距离均小于种间最小遗传距离，独立的 ITS 和 psbA-trnH 序列均不能有效鉴定药用甘草与刺果甘草，但是 ITS+psbA-trnH 复合序列可以有效鉴别药用甘草与刺果甘草。

【关键词】药用甘草种子；ITS；psbA-trnH；鉴定

甘草是我国传统的中药材，素有十方九草之称，药用甘草主要包括乌拉尔甘草 (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.)、胀果甘草 (*Glycyrrhiza inflate* Bat) 和光果甘草 (*Glycyrrhiza glabra* L.) 3 种^[1]，其他种 (如刺果甘草等) 则被认为没有药用价值而被当作伪品。药用甘草具有清热解毒，补脾益血，调和诸药等功效，但是不同品种甘草的活性成分含量却不相同，因此品种不同，药效亦不相同，同时，甘草属种子外形特征极为相似，甚至甘草种皮显微特征亦无明显区别^[2]。为保证药用甘草的质量和品质，我们亟需建立一种能精准有效、简便快速鉴别药用甘草种子的新方法。

DNA 条形码技术直接从基因水平鉴别中药材，鉴别不受破碎程度及环境条件的影响，鉴别结果可靠，该法灵敏度高，成本低，操作流程简单、规范，是中药材分子鉴定的首选技术。论文首次研究基于 ITS 和 psbA-TrnH 序列的药用甘草正伪品种子的 DNA 条形码鉴定新方法，为准确鉴定药用甘草种子真伪提供依据，为市场流通药用甘草种子的规范化管理和甘草临床应用安全奠定基础。

1 材料及方法

1.1 材料

从药用甘草主产区收集了 3 种药用甘草种子，2 种伪品种子，共计 20 份 (表 1)。

1.2 实验方法

1.2.1 甘草种子基因组 DNA 提取

(1) 改良的 SDS 法

参照张改霞等^[3]的操作，提取药用甘草种子正伪品基因组 DNA，所提 DNA 经超微量紫外核酸仪分析和琼脂糖凝胶电泳检测后，-20℃ 贮存备用。

(2) 改良的 CTAB 法

参照张馨元等^[4]的操作，提取药用甘草种子正伪品基因组 DNA，检测方法同 (1)。

1.2.2 ITS、psbA-trnH 序列的扩增、回收与测序

以药用甘草种子正伪品基因组 DNA 为模板，分别扩增 ITS、psbA-trnH 序列，PCR 反应体系 20 μL，包括 DNA 模板 1.6 μL，2.5mmol/L dNTP 1.6 μL，taq DNA 聚合酶 0.5 μL，2.5 μmol/L 引物各 0.8 μL。

PCR 反应程序为：94℃ 5min，反应 30 个循环 (94℃ 30s，50℃ 45s，72℃ 1min)，最后 72℃ 10min。

分别采用 ITS 和 psbA-trnH 序列的通用引物进行 PCR，其中 ITS-F：5'-AGAAGTCGTAACAAGGTTTCCTAGG-3'，ITS-R：5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'；

psbA-trnH-F：5'-GTTATGCATGAACGTAATGCTC-3'；psbA-trnH-R：5'-CGCGCATGGTGGATTACAATCC-3'。

PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶在 110v 条件下电泳检测，切取清晰明亮的扩增条带送至上海生工生物工程有限公司测序，测序峰图用 CodonCode Aligner V5.12 拼接校对^[5]，用 MEGA7.0 进行序列比对、分析种内及种间变异及 K2P 遗传距离分析。采用邻接 (Neighbor Joining, NJ) 法构建系统聚类树，各分支的支持率使用 Bootstrap 重复 1000 次进行检验。

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 的质量与检测

2 种方法提取药用甘草种子与刺果甘草种子基因组 DNA 的检测结果显示，改良的 CTAB 法提取的基因组 DNA 的 A260/280 均值为 1.82，所提 DNA 质量较好，改良的 SDS 法所提基因组 DNA 的 A260/280 均值为 1.73，说明所提基因组 DNA 含有少量酚类、蛋白质或多糖污染，且改良的 CTAB 法提取基因组 DNA 浓度 (871.6 ng/μL) 大于改良的 SDS 法 (854.3 ng/μL)，故改良的 CTAB 法是药用甘草种子基因组 DNA 的较佳方法。

2.2 PCR 扩增率、测序成功率及遗传距离分析

药用甘草种子及刺果甘草种子 ITS 和 psbA-trnH 序列测序结果表明，ITS 和 psbA-trnH 条形码序列的 PCR 扩增效率和测序成功率均为 100%，其中 ITS 序列平均长度为 619bp，psbA-trnH 序列平均长度为 303bp，ITS 和 psbA-trnH 序列平均

表 1 药用甘草及其混伪品样品信息表

药材名称	拉丁名	编号	来源
乌拉尔甘草	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch.	GF1-GF4	新疆石河子
		GF5-GF6	内蒙伊利
		GF7	内蒙古杭锦旗
		GF8	甘肃酒泉
胀果甘草	<i>Glycyrrhiza inflate</i> Bat	GB1-GB3	新疆石河子
		GB4-GB5	内蒙伊利
		GB6	甘肃靖远
光果甘草	<i>Glycyrrhiza glabra</i> L	GG1-GG3	新疆石河子内蒙伊利
		GG4	甘肃酒泉
刺果甘草	<i>Glycyrrhiza pallidiflora</i> Maxim.	GM1	新疆石河子
		GM2	内蒙古杭锦旗

遗传距离分别为 0.0014 和 0.0046, 由表 2 可知, ITS 与 ITS+psbA-trnH 复合序列的种内最大遗传距离均小于种间最小遗传距离, psbA-trnH 序列的种内最大遗传距离与种间最小遗传距离均为 0.003。

2.3 进化树分析

利用软件 MEGA7.0 构建药用甘草种子及刺果甘草种子的进化树, 结果如图 1-3 所示, 可知单独 ITS 与 psbA-trnH 序列均不能有效区分药用甘草与非药用甘草即刺果甘草, 但是 ITS+psbA-trnH 复合序列能够有效鉴别药用甘草种子和刺果甘草种子。

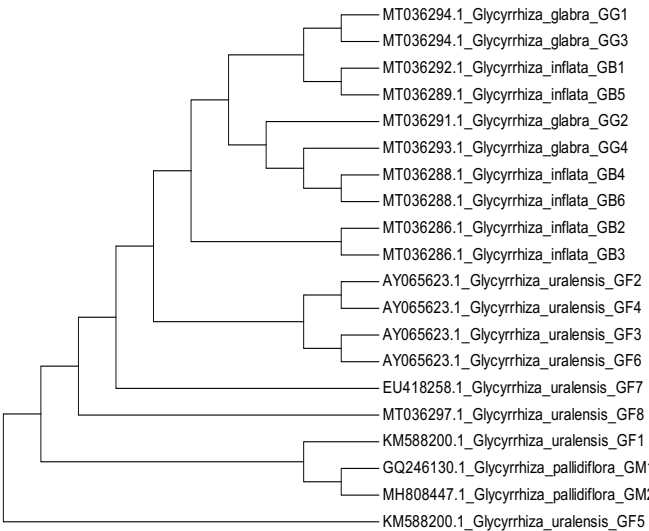


图 1 基于 ITS 序列的聚类进化树

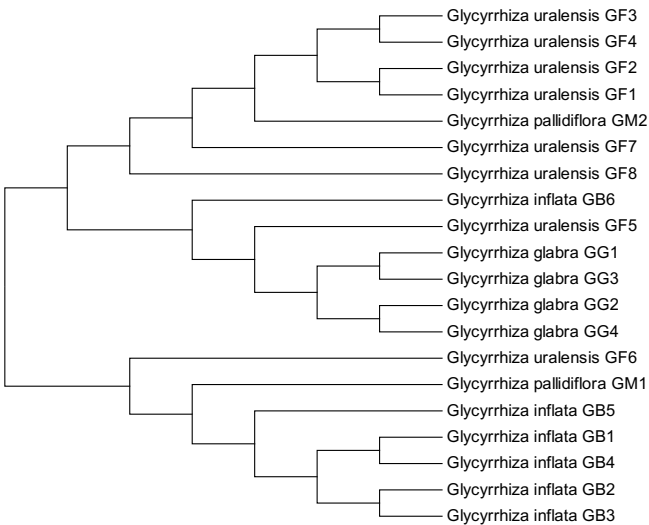


图 2 基于 psbA-trnH 序列的聚类进化树

3 讨论

目前, 针对中药的 DNA 条形码鉴定研究工作尚处于起步阶段。尽管如此, 该技术也已经在中药鉴定领域发挥了巨大作用, 研究者们还运用该技术对桔梗^[6]、黄芩^[7]等多种中药种子进行了鉴别, 均取得了良好效果。近几年, 祁建军^[1]通过克隆测序建立了甘草种子的特异性 SCAR 标记, 为甘草药材生产提供

指导; 郝杰^[8]等自 GenBank 下载甘草属植物序列进行分析, 发现核内部转录间隔区 ITS2 序列对药用甘草具有较好区分作用。本文首次研究基于 ITS 和 psbA-trnH 序列构建药用甘草种子及刺果甘草种子的鉴定体系, 结果表明, ITS 和 psbA-trnH 序列的 PCR 扩增效率及测序成功率均为 100%, 但是单独的 ITS 和 psbA-trnH 序列均不能有效鉴别药用甘草种子及刺果甘草种子, 而 ITS+psbA-trnH 复合序列的种内最大遗传距离小于种间最小遗传距离, 从聚类进化树可以清楚鉴别 4 个品种甘草种子。

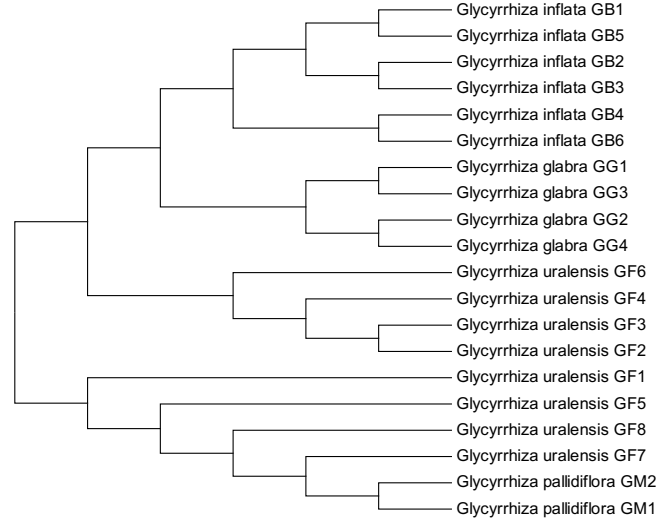


图 3 基于 ITS+psbA-trnH 复合序列的聚类进化树

参考文献:

- [1] 郝建军, 李先恩, 李学禹, 等. 甘草种子 SCAR 标记的建立 [J]. 中国农业科技导报, 2007,9(5):101 ~ 104.
- [2] 苗新生. 甘草及其近缘种种子微形态特征的研究 [J]. 中药材, 2005,28(4):274 ~ 277.
- [3] 张改霞. 几种传统大宗中药材种子 DNA 条形码鉴定 [D]. 山东: 山东中医药大学, 2016.
- [4] 张馨元, 赵超越, 侯和胜, 等. 四种中药材 DNA 提取方法的比较 [J]. 中国药理学杂志, 2015,35(07):17 ~ 21.
- [5] 崔志伟, 王康才, 郑晖, 等. DNA 条形码序列对不同品种金银花的鉴定 [J]. 江苏农业科学 2013,41(8):43 ~ 45.
- [6] 刘金欣, 潘敏, 张改霞, 等. 基于 ITS2 序列的中药材桔梗种子 DNA 条形码鉴定 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2016,18(2):174 ~ 178.
- [7] 刘金欣, 魏妙洁, 李耿, 等. 黄芩 ITS2 条形码数据库构建及其种子的 DNA 条形码鉴定方法建立 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018(9):37 ~ 45.
- [8] 郝杰, 蔡彦朋, 刘刚, 等. 基于 ITS2 序列的药用甘草亲缘关系鉴定研究 [J]. 中国药理学杂志, 2018,53(06):411 ~ 417.

通讯作者: 王霞

基金项目:

吉林省大学生科技创新项目(吉农院合字[2019]第 022 号)。

表 2 药用甘草及伪品种内种间遗传距离

项目	ITS	psbA-trnH	ITS+psbA-trnH
种内遗传距离	0-0.0014	0-0.003	0-0.009
种间遗传距离	0.018-0.039	0.003-0.007	0.010-0.026