

# 基于DNA条形码技术鉴定蒙药材刺柏叶及其混淆品

娜仁图雅<sup>1#</sup>, 刘杰<sup>2#</sup>, 籍学伟<sup>1</sup>, 徐继民<sup>2</sup>, 郑健<sup>2\*</sup>, 韩塔娜<sup>1\*</sup> (1. 内蒙古药品检验研究院 内蒙古自治区中蒙药标准研究重点实验室, 呼和浩特 010000; 2. 中国食品药品检定研究院, 北京 102629)

**摘要** 目的: 基于DNA条形码技术鉴别蒙药材刺柏叶及其混淆品。方法: 采用国际通用的条形码序列ITS2、*psbA-trnH*、*matK*和*rbcL*, 对刺柏叶及其混淆品圆柏叶共计11份样品进行DNA提取、扩增, 采用CodonCode Aligner进行序列拼接, 并用MEGA软件对拼接序列进行变异位点分析、邻接(NJ)聚类分析, 并计算其平均种内、种间遗传距离。结果: 4对引物的PCR扩增产物测序成功率分别为ITS2 100%、*psbA-trnH* 100%、*rbcL* 100%、*matK* 0%; ITS2序列和*psbA-trnH*序列均可通过变异位点比较区分刺柏叶及其混淆品; NJ聚类分析的结果显示, *psbA-trnH*序列的NJ聚类树中刺柏叶与圆柏叶均能分别聚为一支, 且*psbA-trnH*序列的平均种间遗传距离明显大于平均种内遗传距离。结论: *psbA-trnH*序列能有效区分圆柏叶与刺柏叶, 可作为鉴别刺柏叶及其混淆品圆柏叶的条形码序列, 为蒙药材刺柏叶及其混淆品的鉴别提供支持。

**关键词:** 蒙药材; 刺柏叶; 圆柏叶; 混淆品; DNA条形码; 鉴别

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2024)04-0416-007

doi:10.16153/j.1002-7777.2024.04.007

## Identification of Juniperus Folium the Mongolian Medicine and Its Adulterants Based on DNA Barcoding Technique

Naren Tuya<sup>1#</sup>, Liu Jie<sup>2#</sup>, Ji Xuewei<sup>1</sup>, Xu Jimin<sup>2</sup>, Zheng Jian<sup>2\*</sup>, Han Tana<sup>1\*</sup> (1. Inner Mongolian Institute for Drug Control, Huhehaote 010000, China; 2. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China)

**Abstract Objective:** To identify the Juniperus Folium of Mongolian medicine and its adulterants by DNA barcode technology. **Method:** The DNA extraction and amplification of 11 samples of Juniperus Folium and the adulterants Sabina Folium were carried out by using the internationally recognized barcode sequences ITS2, *psbA-trnH*, *matK* and *rbcL*. Codon Code Aligner was adopted to align the sequence, and MEGA software was used to analyze the mutation sites and Neighbor-Joining (NJ) cluster of the splice sequence, and its average intra-specific and inter-specific genetic distance were calculated. **Results:** The success rates of PCR amplification products of the four primers were ITS2 100%, *psbA-trnH* 100%, *rbcL* 100% and *matK* 0%, respectively. The ITS2 sequences and *psbA-trnH* sequences could distinguish the Juniperus Folium and its adulterants by comparison of variation sites. The results of NJ cluster analysis showed that the *psbA-trnH* sequences of Juniperus Folium and its adulterants could be clustered into one branch respectively, and the average interspecific genetic distance of *psbA-*

作者简介: 娜仁图雅 Tel: (0471) 4505150; E-mail: nrty2012@126.com

共同第一作者: 刘杰 Tel: (010) 53851401; E-mail: liujie19890215@163.com

通信作者: 郑健 Tel: (010) 53852080; E-mail: zhengjian@nifdc.org.cn

韩塔娜 Tel: 15034920693; E-mail: hantana2010@163.com

*trnH* sequences was significantly greater than the average intraspecific genetic distance. **Conclusion:** The *psbA-trnH* sequences can effectively distinguish *Juniperus Folium* from *Sabina Folium*, and can be used as barcode sequence to identify *Juniperus Folium* and the adulterants *Sabina Folium*, which will provide support for the identification of Mongolian medicinal materials *Juniperus Folium* and the adulterants *Sabina Folium*.

**Keywords:** Mongolian medicine; *Juniperus Folium*; *Sabina Folium*; adulterants; DNA barcoding; identification

刺柏叶为柏科植物杜松 *Juniperus rigida* Sieb. et Zucc. 的干燥嫩枝叶<sup>[1]</sup>，为蒙医常用品种，具有清肾热、利尿、愈伤、止血的功效，用于尿血、尿道疼痛、游痛症等，其质量标准收载于《卫生部药品标准》蒙药分册。刺柏叶形态特征与圆柏 (*Juniperus chinensis* L.) 叶相似，且两者均产于内蒙古、河北、山西、陕西及甘肃等地<sup>[2]</sup>，目前市场上有混淆现象，影响了刺柏叶用药的准确性。由于性状、显微鉴别具有一定的局限性，因此建立准确、快速的DNA条形码鉴别方法，对刺柏叶及其混淆品的鉴别具有重要意义。本研究选用 *matK*、*rbcL*、*ITS2*、*psbA-trnH* 这4对植物通用引物对刺柏叶及其混淆品圆柏叶进行鉴定<sup>[3-6]</sup>，筛选出更适合于鉴别刺柏叶及其混淆品的DNA条形码序列，为该药材的质量控制及临床安全用药提供依据。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

MM400球磨机 (Retsch公司)，ABI Veriti PCR

仪 (Thermo Fisher公司)，Mupid-one水平电泳仪 (Takara公司)，GelDoc XR+全自动凝胶成像系统 (BIORAD公司)。

### 1.2 试剂

植物基因组DNA提取试剂盒 (货号DP305，天根生化科技有限公司)；dNTP (货号4030)、PCR buffer (10×) (货号9151A)、Taq PCR酶 (货号R001A)、Agarose Regular (货号5260)、DL2000 DNA Marker (货号3427Q)，均购自宝日医生物技术 (北京) 有限公司；GelRed (货号41003，Biotium公司)；50×TAE Buffer (货号RT204，天根生化科技有限公司)；引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

### 1.3 样品来源

本研究共收集7批刺柏叶及4批圆柏叶样品，经内蒙古食品药品检验所林燕老师及中国食品药品检定研究院徐继民老师鉴定，具体信息见表1。

表1 样品信息

物种	编号	来源
<i>Juniperus rigida</i>	CBY-1	内蒙古通辽市罕山自然保护区
<i>J. rigida</i>	CBY-2	内蒙古阿拉善盟药检所提供
<i>J. rigida</i>	CBY-3	内蒙古通辽市罕山自然保护区
<i>J. rigida</i>	CBY-4	内蒙古阿拉善蒙医院提供
<i>J. rigida</i>	CBY-5	内蒙古锡林郭勒盟正蓝旗
<i>J. rigida</i>	CBY-6	内蒙古集宁市百泉山生态大道
<i>J. rigida</i>	CBY-7	内蒙古自治区赤峰市巴林右旗大板镇
<i>Juniperus chinensis</i>	YBY-8	内蒙古蒙药股份有限公司提供
<i>J. chinensis</i>	YBY-9	呼和浩特市植物园
<i>J. chinensis</i>	YBY-10	青海省西宁市
<i>J. chinensis</i>	YBY-11	北京天坛公园

## 2 方法

### 2.1 提取

刺柏叶及圆柏叶样品经硅胶干燥后, 取样约20 mg, 用DNA提取研磨仪研磨1 min (30次·s<sup>-1</sup>)后, 利用植物基因组DNA提取试剂盒进行DNA提取。

### 2.2 扩增

PCR反应体积为25 μL, 反应体系含10×buffer 2.5 μL、dNTP 2 μL、引物各1 μL (2.5 mmol·L<sup>-1</sup>)、Taq PCR酶0.2 μL、模板DNA 0.5~1 μL (100~300 ng)。扩增引物分别为ITS2 (ITS2F: 5'-ATGCCGATACTTGGTGTGA AT-3'; ITS3R: 5'-GACGCTTCTCCAGACTACAAT-3')、*psbA-trnH* (PA: 5'-GTTATGCATGAACGTAATGCTC-3'; TH: 5'-CGCGCATGGTGGATTCACAATCC-3')、*matK* (3F-KIM: 5'-CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG-3'; IR-KIM: 5'-ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGTTTC-3')、*rbcL* (RL1: 5'-ATGT CACCACAAACAGAAAC-3'; RL2: 5'-TCGCATGTACCTGCAGTAGC-3')。扩增程序为94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 45 s, 35~40个循环; 72℃ 10 min。

### 2.3 测序与分析

PCR扩增产物送测序(北京诺赛基因组研究中心)。测序峰图利用Codon Code Aligner V 3.7.1校对拼接, 去除引物区段, ITS2序列去除5.8S、28S区段, 对所有序列用软件MEGA 5.1进行变异位点比较, 基于K2P模型进行遗传距离分析, 构建系统邻接(Neighbor-Joining, NJ)聚类树, 利用Bootstrap (1000次重复)检验各分支的支持率<sup>[7]</sup>。

## 3 结果分析

### 3.1 测序成功率

引物ITS2、*psbA-trnH*、*rbcL*的扩增产物测序成功率均为100%, 引物*matK*的扩增产物测序质量差, 无法进行有效拼接, 因此, 后续仅对ITS2、

*psbA-trnH*、*rbcL* 3对引物的扩增产物测序结果进行比对分析。

### 3.2 变异位点比较结果

将引物ITS2、*psbA-trnH*、*rbcL*扩增产物的测序结果经Codon Code Aligner V 3.7.1校对拼接, 去除引物区段, ITS2序列去除5.8S、28S区段后, 利用MEGA 5.1软件进行变异位点比较, 结果如表2~4所示。

7批刺柏叶的ITS2序列去除5.8S、28S区段后, 碱基完全一致, 不存在变异位点, 而4批圆柏叶的ITS2序列与刺柏叶相比存在2~4个变异位点, 通过变异位点比较可以区分刺柏叶与圆柏叶。

将7批刺柏叶和4批圆柏叶的*psbA-trnH*序列在MEGA 5.1软件中对齐并去除引物区段后, 刺柏叶样品CBY-1和圆柏叶样品YBY-8的序列信息如图1、图2所示, 其中刺柏叶样品CBY-1的序列长度为471 bp, 圆柏叶样品YBY-8的序列长度为557 bp。将7批刺柏叶样品和4批圆柏叶样品在MEGA 5.1软件中对齐后的序列长度为569 bp。与圆柏叶相比, 刺柏叶在111 bp的位置有6个碱基的插入, 在204 bp的位置有90个碱基的缺失, 在295 bp的位置有7个碱基的缺失, 在466 bp的位置有3个碱基的插入。7批刺柏叶的*psbA-trnH*序列中共存在1个碱基变异(表3), 4批圆柏叶中存在2~8个碱基变异(表4), 刺柏叶样品CBY-1和圆柏叶YBY-8的*psbA-trnH*序列存在24个变异位点(图3)。

7批刺柏叶样品和4批圆柏叶样品的*rbcL*序列中, 与刺柏叶样品CBY-1相比, 圆柏叶样品YBY-10存在1个碱基变异, 刺柏叶样品CBY-4存在82个碱基变异, 其他样品均与刺柏叶样品CBY-1的*rbcL*序列一致。将刺柏叶样品CBY-4的*rbcL*序列在GenBank中进行比对, 与序列MN027267.1的一致性为96%, 为三枝九叶草*Epimedium sagittatum*, 判断刺柏叶样品CBY-4的*rbcL*序列可能在PCR扩增或测序过程中存在污染, 因此后续不对刺柏叶样品CBY-4的*rbcL*序列进行分析。

表 2 刺柏叶与圆柏叶 ITS2 序列的变异位点信息

样品编号	碱基位点						
	11	12	60	98	170	196	219
CBY-1	C	T	G	T	A	T	C
CBY-2 ~ CBY-7	•	•	•	•	•	•	•
YBY-8	T	•	T	•	G	•	A
YBY-9	T	•	•	•	G	•	A
YBY-10	T	•	•	•	•	C	•
YBY-11	T	C	•	A	G	•	•

注：表中“•”代表与同列第一排的碱基相同。

表 3 刺柏叶 *psbA-trnH* 序列的变异位点信息

样品编号	碱基位点
	548
CBY-1	A
CBY-2、CBY-6、CBY-7	G
CBY-3 ~ CBY-5	•

注：表中“•”代表与同列第一排的碱基相同。

表 4 圆柏叶 *psbA-trnH* 序列的变异位点信息

样品编号	碱基位点							
	10	102	163	200	413	437	542	552
YBY-8	C	C	A	C	T	G	A	G
YBY-9	A	•	•	•	•	•	G	
YBY-10	A	T	G	T	G	A	G	A
YBY-11	A	•	•	•	•	•	G	

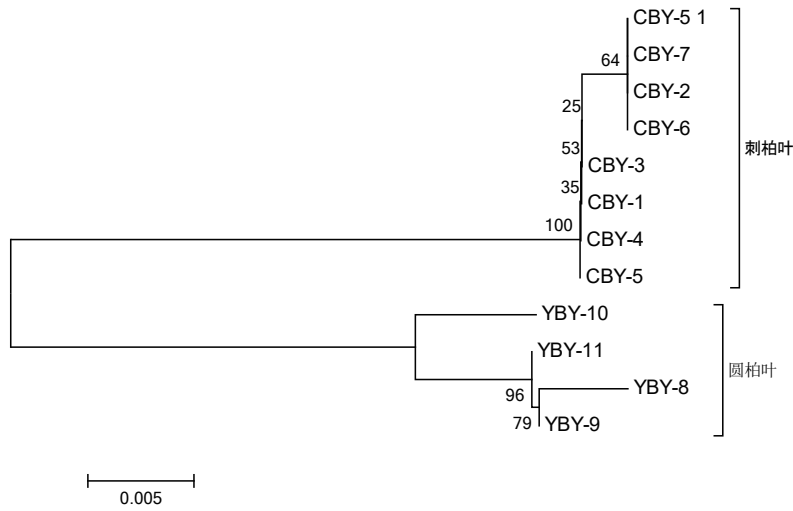
注：表中“•”代表与同列第一排的碱基相同。

#CBY-1

TCACAAATCCACTGCCTTGGAACTTGGCTACGTCGCCCCAACTAATTAGCAGTCTCTGTCTACGG  
 TCATTCCATTTCCAGAATGAATGGTTCTAAGCCCCGAAAAACCAACCACTAATAATGAAACGATTCT  
 ATTATTTAGTTTAGTTATTAATTTGTTGCACTTGCATGCAACTCTCACACAAGTTAGTGATATTTACATT  
 TTTTTTTTTATAAAATAGTTGCACCCAATCATAATTGGGAAGTCGCGGGTTCAATTCCTGCTGGATGCA  
 TAATAAACAGTTATTGTCTCTGTTTCGCAATAACTATCACTTTTAAGAAAAATTAGACGGAAAAAGCAG  
 TACCAAATTGGTACTGCTTTCTTTTAGGATTGAAATACACTAACAAATCCATCTTGAATAATTAGCCGTTT  
 ATAGAATTAGCTCAACAGCAGCTAGATCCAAAGGGAAGTTGTGAGCATTACG

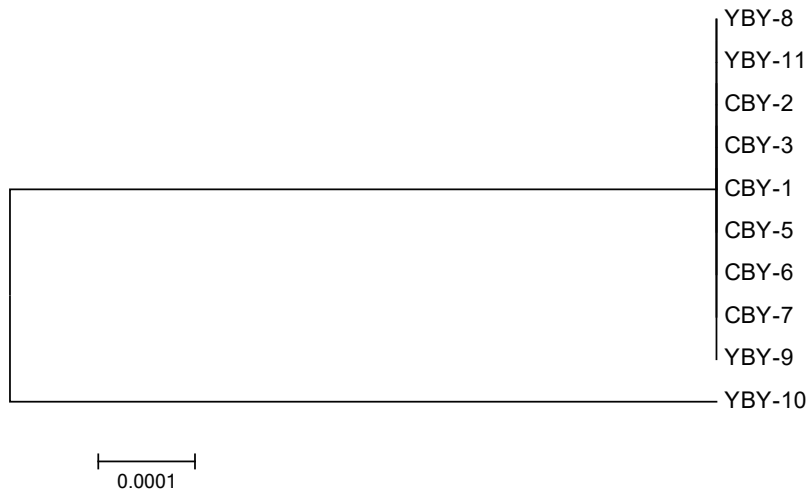
图 1 刺柏叶 CBY-1 样品的 *psbA-trnH* 序列信息





注：bootstrap 1000 次重复

图 5 基于 *psbA-trnH* 序列建立的刺柏叶和圆柏叶的 NJ 聚类树



注：bootstrap 1000 次重复

图 6 基于 *rbcL* 序列建立的刺柏叶和圆柏叶的 NJ 聚类树

### 3.4 种内及种间遗传距离分析

利用MEGA 5.1 软件计算刺柏叶及圆柏叶 ITS2、*psbA-trnH*、*rbcL*序列的平均种内、种间的遗传距离，结果如表5、表6所示，*psbA-trnH*序列

的平均种间遗传距离（0.054）明显大于平均种内遗传距离（0.007），而ITS2序列和*rbcL*序列的种内、种间遗传距离无明显区分，因此，*psbA-trnH*序列更适宜应用于鉴别刺柏叶与圆柏叶。

表 5 刺柏叶与圆柏叶 ITS2、*psbA-trnH*、*rbcL* 序列的平均种内遗传距离信息

样品名称	ITS2 序列	<i>psbA-trnH</i> 序列	<i>rbcL</i> 序列
刺柏叶	0.000	0.001	0.000
圆柏叶	0.015	0.007	0.001

表6 刺柏叶与圆柏叶 ITS2、*psbA-trnH*、*rbcL* 序列的平均种间遗传距离信息

	ITS2 序列	<i>psbA-trnH</i> 序列	<i>rbcL</i> 序列
种间遗传距离	0.015	0.054	0.000

#### 4 讨论

ITS2、*psbA-trnH*、*matK*和*rbcL*为4对通用引物，在植物分类和植物类药DNA条形码鉴别中使用频率比较高<sup>[8-12]</sup>，通过查阅文献及前期研究，确定4对通用引物适用的PCR反应体系及扩增程序。本研究选用以上4对引物对刺柏叶及其混淆品圆柏叶进行鉴定，根据变异位点比较、NJ聚类分析和种内、种间遗传距离比较分析的结果，确定*psbA-trnH*序列更适宜应用于刺柏叶及其混淆品圆柏叶的鉴别，而*matK*、*rbcL*序列不能应用于刺柏叶与圆柏叶的鉴别，ITS2序列通过变异位点比较可有效区分刺柏叶与圆柏叶。

4对引物中，ITS2、*psbA-trnH*、*rbcL*的扩增产物测序成功率均为100%，而引物*matK*的扩增产物的测序质量却很差，无法进行有效拼接，测序成功率为0。分析其原因，可能是由于引物*matK*在刺柏叶及其混淆品圆柏叶中存在非特异性扩增，扩增产物中包含多条片段，导致其测序结果质量较差。

ITS2序列位于核基因组，是一段种内相对比较保守、种间存在差异的序列，通过该段序列可以区分刺柏叶与圆柏叶，种间遗传距离为0.015。7批刺柏叶样品的ITS2序列一致，圆柏叶的ITS2序列虽然与刺柏叶存在碱基差异，但其种内遗传距离也达到0.015。

*rbcL*序列与*psbA-trnH*序列位于叶绿体基因组，刺柏叶与圆柏叶的*rbcL*序列的种间遗传距离为0，不能用于2个种的区分，而刺柏叶与圆柏叶的*psbA-trnH*序列种间遗传距离为0.054，大于刺柏叶的种内遗传距离（0.001）和圆柏叶的种内遗传距离（0.007），可有效区分刺柏叶与圆柏叶，因此，4对引物中确定*psbA-trnH*序列为刺柏叶及其混淆品圆柏叶的最佳鉴别引物。

刺柏叶为蒙医常用品种，目前未见有关刺柏叶与圆柏叶DNA条形码鉴别的有关报道，本研究通过考察ITS2、*psbA-trnH*、*matK*和*rbcL*4对通用引物对刺柏叶与圆柏叶的鉴别情况，确定了最佳鉴别引

物，为刺柏叶的DNA条形码鉴定及其质量控制提供了理论依据。

#### 参考文献：

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会.《中华人民共和国卫生部药品标准》蒙药（分册）[S]. 1998.
- [2] 《内蒙古植物志》编辑委员会. 内蒙古植物志[M]. 第二版. 呼和浩特：内蒙古人民出版社，1998，1：264-274.
- [3] 韩建萍，李美妮，石林春，等. 砂仁及其混淆品的ITS2序列鉴定[J]. 环球中医药，2011，4（2）：99-102.
- [4] 韩建萍，石林春，陈士林，等. ITS2序列鉴定筋骨草及其近缘种[J]. 世界科学技术-中医药现代化，2008，10（6）：86-89，81.
- [5] 朱英杰，陈士林，姚辉，等. 重楼属药用植物DNA条形码鉴定研究[J]. 药学学报，2010，45（3）：376-382.
- [6] Han JP, Song JY, Liu C, et al. Identification of *Cistanchespecies* (Orobanchaceae) based on Sequences of the Plastid *psbA-trnH* Intergenic Region[J]. Acta Pharm Sin, 2010, 45（1）：126-130.
- [7] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: Molecular evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0[J]. Mol Biol Evol, 2007, 24: 1596-1599.
- [8] 韩建萍，李美妮，罗焜，等. DNA条形码鉴定洋金花及其伪品[J]. 药学学报，2011，46（11）：1408-1412.
- [9] 慕泽泾，张永平，杜小浪，等. 基于ITS2序列鉴别豆科民族药材及其混伪品[J]. 中药材，2022，45（5）：1081-1086.
- [10] 李谦，王维宁，过立农，等. 蒙药材草乌叶DNA条形码研究[J]. 药物分析杂志，2016，36（6）：1044-1052.
- [11] 宁淑萍，颜海飞，郝刚，等. 植物DNA条形码研究进展[J]. 生物多样性，2008，16（5）：417-425.
- [12] 刘杰，房文亮，唐哲，等. 基于DNA条形码和HRM技术建立紫草药材的RFLP-HRM鉴别方法[J]. 药物分析杂志，2022，42（8）：1354-1362.

（收稿日期 2023年10月23日 编辑 郑丽娥）