



黄芪与其混伪品的 ITS 序列分子鉴定研究

崔占虎^{1,2}, 李越^{1,2}, 袁庆军¹, 周立社^{2*}, 李旻辉^{1,2*}

(1. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700;

2. 内蒙古科技大学 包头医学院, 内蒙古 包头 014060)

【摘要】 目的: 研究黄芪与其混伪品之 DNA 分子鉴别。方法: 采不同产地的黄芪药材 13 份, 替代品红芪 2 份, 混伪品紫花 3 份和蜀葵 1 份, 所有样品进行总 DNA 的提取, PCR 扩增, 扩增产物进行测序得到相应的序列, 同时从 GenBank 下载蓝花棘豆、锦鸡儿 2 种伪品的 ITS 序列。用 MEGA 4 计算其种的 K-2-P 离, 最后利用 ITS 序列构建其系发育树。结果: 测得了 19 份样品的 ITS 序列全长, 分别为蒙 黄芪 646~650 bp, 莱黄芪为 646~650 bp; 红芪为 664 bp; 紫花 为 659 bp; 蜀葵为 728 bp, 在 GenBank 中 得登记号。通过以 ITS 序列重建系 进化树进行的聚类分析可以将黄芪与其混伪品有效的区分开。结论: ITS 序列能 成功鉴定黄芪及其易混伪品, 可以作为黄芪与其混伪品的分子鉴定。

【关键词】 黄芪; ITS 序列; 分子鉴定

黄芪是豆科植物蒙 黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 或 莱黄芪 *A. membranaceus* (Fisch.) Bge 的 根^[1], 为临床 用中药。始载于《神 本草经》, 传 中 药 论认为黄芪, 性味甘、微 , 具有补气固表、利 生津、托毒排脓、生肌等功效^[1]。现代 学研究表明黄芪有强心、利 、降压、抗菌、提高 体 功能和 进 陈代谢等作用^[2]。于近几年黄芪有效成分的 入研究, 作为药 两用的黄芪资源得到了广 的开发和利用, 使得市场 黄芪资源的需 急剧增加。市场上 了正品黄芪外, 有代用品、伪品和混淆品。 的有红芪 *Hedysarum polybotrys* Hand. -Mazz.、紫花 *Medicago sativa* L.、蜀葵 *Althaea rosea* L.、蓝花棘豆 *Oxytropis coerulea* (pall.) DC.、锦鸡儿 *Caragana sinica* (Buóhoz) Rehd. 和圆叶锦葵 *Malva rotundifolia* L. 等, 这些植物的根茎在外形上与黄芪极为相近, 但在药效 面相远, 有些植物 至具有毒性。因此, 准 的鉴别黄芪药材 于保 人们用药安全意义重大。

目前市面上 售的黄芪多为加工过的药材, 黄

芪替代品及其伪品的表面性 、微特 至化学成分与黄芪都极为相 , 在实际 用中要进行准 鉴别存在一定难度。同时应用形态学、组织学和化学成分分析等 来鉴定黄芪存在主观性较大、特异性不强、通用性 、观 者经验要 高等缺陷, 不利于规范化、标准化 的建立及普及。而 DNA 分子遗传标记技术具有快速、微量、特异性强的特点, 近几年分子生物学中该技术的研 为解决药材的鉴别问题提供了客观而有效的手段^[3-5]。本研究通过 rDNA-ITS 序列 异分析, 黄芪及其混伪品红芪、紫花 、蜀葵、蓝花棘豆和锦鸡儿的遗传关系作 入的研究, 为准 进行黄芪与其混伪品的鉴别提供科学的客观依据。

1 材料

1.1 试剂 2 × CTAB 提取 , 1 × TAE 缓冲 , 脂 (Promega 公司), 溴化乙锭 (Fluka 公司), DNA Taq 聚合酶 (Takara 公司), 2 000 bp DNA Markar (Takara 公司), 三氯甲烷、无 乙醇、异丙醇均为国产分析纯。

1.2 仪器 PCR 仪 (德国 Eppendorf, 型号 5332), 电 系 (北京市六一仪器厂, 型号 DYY-12), 低 冷冻离心 (德国 Eppendorf, 型号 5810 R), 紫外凝胶成像分析仪 (英国 Syngene, 型号 GBOXHR), 混合型球磨机 (德国 Retsch, 型号 MM400), 数控超 清洗器 (型号 KQ-500DE), 微量 器 (德国 Eppendorf)。

1.3 供试样品 本实验材料蒙 黄芪、莱黄芪、红芪、蜀葵和紫花 采 山西、甘肃、内蒙 3 个产区, 所有样品均经内蒙 科技大学包头 学

【稿件编号】 20120516007

【基金项目】 中 药行业科研专项 (201107009); 包头科技发展项目 (2011X1002); 科技部基础项目 (SB2007FY110600)

【通信】 * 旻辉, 博士, , 主要从事蒙药分子鉴定与资源保护研究, Tel: (010) 64014411-2956, E-mail: li_minhui@yahoo.cn; * 立 , , 主要从事分子生物学研究, Tel: 13604726512, E-mail: zhoulishi@sohu.com

旻 教授 。名称、采集地 、 列号见 1。
蓝 棘 锦鸡儿 种来自 GenBank,见 2。

1 实验材料采集地 GenBank 录号

Table 1 The sources of Astragali Radix and its adulterants

中文名	拉丁名	No.	采集地	GenBank 录号
蒙古黄芪	<i>Astragalus membranaceus</i> var. <i>mongholicus</i>	BTMG01	内蒙古土	JX017320
		BTMG02	内蒙古土	JX017321
		BGMG03	内蒙古固阳	JX017322
		BGMG04	内蒙古固阳	JX017323
		CFMG05	内蒙古 峰	JX017324
膜荚黄芪 <i>A. membranaceus</i>		SXMJ01	西浑源	JX017325
		SXMJ02	西浑源	JX017326
		SXMJ03	西浑源	JX017327
		GSMJ04	甘肃陇西	JX017328
		GSMJ05	甘肃陇西	JX017329
		GSMJ06	甘肃陇西	JX017330
		CFMJ07	内蒙古 峰	JX017331
		CFMJ08	内蒙古 峰	JX017332
芪	<i>Hedysarum polybotrys</i>	GSHQ01	甘肃武都	JX017333
		GSHQ02	甘肃武都	JX017334
紫	<i>Medicago sativa</i>	Medicago sativa01	内蒙古包头	JX017335
		Medicago sativa02	内蒙古包头	JX017336
		Medicago sativa03	内蒙古包头	JX017337
蜀葵	<i>Althaea rosea</i>	Althaea rosea01	内蒙古包头	JX017319

2 GenBank 下载样本 种信

Table 2 The GenBank number of *Oxytropis coerulea* and *Caragana sinica*

拉丁学名	GenBank 录号
<i>Oxytropis coerulea</i>	GU217599,HQ199316
<i>Caragana sinica</i>	FJ537284,DQ338282,DQ914785

2 总 DNA 提取 取适 样品， 破碎装入离心管中,加入适 预热, 2 × CTAB 提取液, 振 将样品摇 ,加入适 硫 醇,混 ,放 65 ℃ 水 锅中温 1.5 h,取出材料置 温下冷却,加入适 氯仿- 戊醇(24: 1)溶液, 力摇 5 min, 速离心 10 min(12 000 r · min⁻¹),取上清液,加入等体积 氯仿- 戊醇(24: 1)溶液, 力摇 5 min, 速离心 10 min,取上清液,加入适 丙醇,轻轻颠倒 2 ~ 3 次,放 - 20 ℃ 冰箱里静置 30 min, 速离心 10 min,弃上清, 70% 醇 无水

醇 2 次,最后放 - 37 ℃ 箱中 20 ~ 30 min,使 醇挥发彻底,加入适 灭 蒸 水,使之溶解,放 - 20 ℃ 或 4 ℃ 冰箱中保存备 。
2.2 引 设计 \ 择目前国际推荐,通 引 ITS (ITS4/ITS5)。ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATT-GATATGC-3'; ITS5: 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAA-CAAGG-3。
2.3 DNA 扩增 体系总体积为 20 μL,包括 10 × buffer 缓 液 2 μL, dNTP 1.6 μL,引 0.5 μL, ExTaq 0.2 μL, DNA 0.5 μL,灭 蒸 水 14.7 μL。 :解链温度 9- D P 8L 3度% h/C&

软得到2黄芪其混品芪、紫苜蓿、蜀葵间间K-2-P距离,其中遗传距离0.001~0.460(3)。其中膜荚黄芪蒙古黄芪间K-2-P距离小(0.001);蓝棘膜荚黄芪蒙古黄芪间遗传距离相,亦,0.080;芪2黄芪遗传距离稍,到0.153;锦鸡儿2黄芪遗传距离相比锦鸡儿略,到0.158;紫苜蓿2黄芪遗传距离,到0.201;蜀葵2黄芪遗传距离,到0.460。

3 黄芪其混品间遗传距离

Table 3 The genetic distances of Astragali Radix and its adulterants

项	1	2	3	4	5	6	7
1	—						
2	0.001	—					
3	0.158	0.158	—				
4	0.080	0.080	0.148	—			
5	0.153	0.153	0.137	0.146	—		
6	0.201	0.201	0.172	0.199	0.196	—	
7	0.460	0.460	0.448	0.460	0.426	0.449	—

注:1. 蒙古黄芪; 2. 膜荚黄芪; 3. 锦鸡儿; 4. 蓝棘; 5. 芪; 6. 紫苜蓿; 7. 蜀葵。

3.3 黄芪其混品统发构尽
减统误差所构统,本实验
ITS列征采NJUPGMA构
统发(图1)。2采KP080

[]

[1] 中国药典. 一部[S]. 2010; 283.

[2] 唐国 . 黄芪药理作用与临床应用研究进展[J]. 中 药临床杂志,2010(29):844.

[3] 许亮, 窦德强, 王冰, 等. 牛蒡子及其伪品的 ITS 序列分子鉴定研究[J]. 中国中药杂志, 2011, 36 (3):338.

[4] 车建, 唐琳, 彦君. ITS 序列鉴定西红花与其易混中药材 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32 (8):668.

[5] 春生, 白根本, 阎玉凝. 基于核 DNA ITS 序列的细 药材基原及分子鉴定研究[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(5):329.

Molecular identification of Astragali Radix and its adulterants by ITS sequences

CUI Zhan-hu^{1, 2}, LI Yue^{1, 2}, YUAN Qing-jun¹, ZHOU Li-she^{2*}, LI Min-hui^{1, 2*}

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Science, Beijing 100700, China;
2. Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou 014060, China)

[Abstract] **Objective:** To explore a new method for identification Astragali Radix from its adulterants by using ITS sequence. **Method:** Thirteen samples of the different Astragali Radix materials and 6 samples of the adulterants of the roots of *Hedysarum polybotrys*, *Medicago sativa* and *Althaea rosea* were collected. ITS sequence was amplified by PCR and sequenced unidirectionally. The inter-specific K-2-P distances of Astragali Radix and its adulterants were calculated, and NJ tree and UPGMA tree were constructed by MEGA 4. **Result:** ITS sequences were obtained from 19 samples respectively, there were Astragali Radix 646-650 bp, *H. polybotrys* 664 bp, *Medicago sativa* 659 bp, *Althaea rosea* 728 bp, which were registered in the GenBank. Phylogeny trees reconstruction using NJ and UPGMA analysis based on ITS nucleotide sequences can effectively distinguish Astragali Radix from adulterants. **Conclusion:** ITS sequence can be used to identify Astragali Radix from its adulterants successfully and is an efficient molecular marker for authentication of Astragali Radix and its adulterants.

[Key words] Astragali Radix; ITS sequences; molecular identification

doi:10.4268/cjcmm20122419

[编辑]