



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, 混伪品紫花苜蓿 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 距离, 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, 分别为蒙芪 646~650 bp, 莱黄芪为 646~650 bp; 红芪为 664 bp; 紫花苜蓿为 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《神农本草经》, 传中 药 论认为黄芪, 性甘、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。有的有红芪 *Hedysarum polybotrys* Hand.-Mazz.、紫花苜蓿 *Medicago sativa* L.、蜀葵 *Althaea rosea* L.、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、微特征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究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、紫花苜蓿、蜀葵、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 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 本实验材料蒙芪、莱黄芪、红芪、蜀葵和紫花苜蓿采山西、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; * 立社, 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

2.1 总 DNA 提取 取适 样品， 破碎装入
1 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 95 ℃ 1 min, 退火 55 ℃ 1 min, 延伸 72 ℃ 1 min, 循环 30 次。

软得到12黄芪其混品芪、紫苜蓿、蜀葵间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 黄芪其混品统发构了尽减统误差所构统,本实验ITS列征采NJUPGMA构了统发(图1)。2采Ki800

[1]

[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

[1] 编辑 [1]