市售覆盆子药材 DNA 条形码鉴定研究

方洁，吕群丹，陈正道，潘俊杰，程科军*(丽水市农林科学研究院，浙江 丽水 323000)

摘要：目的 基于 ITS2 条形码序列检测市场销售覆盆子药材，为保证覆盆子药材使用的正确性和安全性提供一种新的鉴定手段。**方法** 获取掌叶覆盆子及其 5 种常见同属易混种 ITS2 序列，以及 GenBank 上下载的共计 48 条序列。使用 Gene Tool 软件分析 ITS2 序列长度，GC 含量和变异位点等情况，利用 Clustal X 和 MEGA 7.0 软件计算遗传距离和构建邻接系统发育聚类树。同时随机检测 24 份市售覆盆子药材，利用中药材 DNA 条形码鉴定系统和构建邻接系统发育聚类树确定物种，鉴别真伪。**结果** 掌叶覆盆子基原植物可与其同属易混种进行明显区分；市售药材中正品 22 份，伪品 1 份，混合物 1 份。**结论** 基于 ITS2 序列的 DNA 条形码技术能够成功鉴定市场销售的掌叶覆盆子及其混伪品。

关键词：覆盆子；掌叶覆盆子；ITS2 序列；DNA 条形码；鉴定

中图分类号：R286.0 **文献标志码：**B **文章编号：**1007-7693(2020)04-0437-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.04.010

引用本文：方洁，吕群丹，陈正道，等. 市售覆盆子药材 DNA 条形码鉴定研究[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(4): 437-442.

Identification of Commericially Available Rubi Fructus Based on DNA Barcoding Technology

FANG Jie, LYU Qundan, CHEN Zhengdao, PAN Junjie, CHENG Kejun*(*Lishui Institute of Agricultural and Forestry Sciences, Lishui 323000, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To provide a new method for the identification of Rubi Fructus in medicial market based on ITS2 barcode, and guaranting the accuracy and safety of Rubi Fructus. **METHODS** Combined with the sequences downloaded from GenBank, a total of 48 ITS2 sequences of *Rubus chingii* Hu and its confusable species of genus *Rubus* were obtained. Sequence characteristics such as length, GC contents, and mutation loci were analyzed through Gene Tool software, while genetic distance calculation and build-up of neighbor-joining(NJ) phylogenetic tree were carried out by Clustal X and MEGA 7.0. Simultaneously, 24 samples of Rubi Fructus collected from markets randomly were detected by Chinese herbal medicine DNA barcoding identification system and build-up of NJ phylogenetic tree. **RESULTS** The results revealed that *R. chingii* Hu and its adulterants could be differentiated obviously. The 22 samples of Rubi Fructus collected from markets were genuine, 1 sample was counterfeit and 1 sample was mixture. **CONCLUSION** The DNA barcoding technology based on ITS2 sequences can identify *R. chingii* Hu from its adulterants successfully.

KEYWORDS: Rubi Fructus; *Rubus chingii* Hu; ITS2 sequence; DNA barcoding; identification

常用中药覆盆子为蔷薇科(Rosaceae)悬钩子属(*Rubus*)植物掌叶覆盆子 *Rubus chingii* Hu(又名华东覆盆子)的干燥果实，收录于中国药典 2015 年版。覆盆子具有益肾固精缩尿和养肝明目等功效，主要的化学成分有三萜、黄酮、甾体和生物碱等[1]。掌叶覆盆子的干燥根及残茎以畲族习用药材名义收录于 2015 年版《浙江省中药炮制规范》，畲药名搁公扭根，富含三萜和鞣质类成分[2-4]。由于掌叶覆盆子易种植、投产快，产业发展迅速。浙江是掌叶覆盆子的重要产区，2017 年浙江省种植面积为 0.49×10^7 m^2[5]。2018 年，掌叶覆盆子被确立为浙产特色优势药材新“浙八味”，2018 年和 2019 年种植面积分别增加至 0.81×10^7 m^2 和 8.6×10^7 m^2。我国掌叶覆盆子资源分布广，与其同属多个物种生境相同、形态非常接近，尤其是果实极易混淆。目前对覆盆子物种鉴定方面的研究报道较少，仅见于研究人员十多年前对覆盆子及其市场上常见的混伪品如插田泡、茅莓、山莓等果实外形、组织结构和粉末显微进行的性状特征的传统鉴别[6-8]。仅以传统形态鉴别方法来鉴定掌叶覆盆子正伪品的难度较大，对用药安全造成了极大威胁，因此迫切需要一种先进的技术快速准确鉴别覆盆子。

DNA 条形码(DNA barcoding)技术是利用基因

基金项目：浙江省重大科技专项(2012C12014-1)；丽水市科技项目(LS20160012，2019GYX08)

作者简介：方洁，女，硕士，助理研究员 Tel: (0578)2028393 E-mail: zsdfj01@163.com *__通信作者：__程科军，男，博士，研究员 Tel: (0578)2028385 E-mail: chengkejun2011@126.com

组中一段标准的、有足够变异、易扩增且相对较短的DNA片段自身在物种种内的特异性和种间的多样性而创建的一种新的生物身份识别系统[9]。该技术利用一段较短的DNA片段即可实现物种快速准确的鉴定，具有高效、简便、准确性高等多种优势，类似于超市条形码扫描区分成千上万种不同的商品。该技术最初由 Paul Hebert 提出并应用于生物的鉴定[10]，近年来已广泛应用于多种中药材及其基原植物的鉴定中[11-14]。Lou 等[15]建立了药材 DNA 条形码数据库(Medicinal Materials DNA Barcode Database，MMDBD，http://137.189.42.34/mherbsdb/,updated:2013,10)，该数据库包含中国药典和美国药典中 1 661 个物种共 36 679 条序列(包括 ITS、*trnH-psbA*、*rbcL*、*matK* 等序列)，应用该数据库能够为鉴别药材(植物、动物和真菌)及其代用品和混伪品提供重要参考。中国药典 2015 年版已将“中药材 DNA 条形码分子鉴定指导原则”作为中药材质量控制的补充方法[16]。同时，大量的研究表明，ITS2 是鉴定药用植物及其混伪品的理想条形码[17]。本研究构建了掌叶覆盆子及其常见混伪品的参照 DNA 条形码数据库，并对 2018 年 7 月来源于市场的 24 批标签为覆盆子的药材进行了研究，以期为 DNA 条形码技术在药品检验和市场监管方面的应用提供参考。

1 材料

本研究采集了包括掌叶覆盆子(*R. chingii* Hu)、高粱泡(*R. lambertianus* Ser.)、山莓(*R. corchorifolius* L. f.)、蓬藟(*R. hirsutus* Thunb.)、茅莓(*R. parvifolius* L.)、寒莓(*R. buergeri* Miq.)等 6 个物种 35 个样本，来源信息见表 1。经丽水市食品药品与质量技术检验检测院李水福主任中药师鉴定为相应物种，并从 GenBank 下载覆盆子常见混伪品的 ITS2 序列 13 条，见表 2。含上述 6 个物种共 48 条 ITS2 序列用于构建覆盆子及其混伪品的标准条形码数据库。下载的 GenBank 序列均通过 DNA 条形码鉴定网站(www.tcmbarcode.cn)进行验证[18]，并选用符合相应物种信息的序列备用。24 批标签为覆盆子的药材(编号为 FPZ-01~24)于 2018 年 7 月收集自江西樟树、安徽亳州和浙江磐安药材市场，其基原不详，见表 3。

表 1 掌叶覆盆子及其同属易混种样品信息

Tab. 1 Sample information of original specie of *R. chingii* Hu and its confusable species of genus *Rubus*

植物名称	拉丁名	序列数	样本编号	来源
掌叶覆盆子	*R. chingii* Hu	10	Rch1~Rch10	浙江丽水莲都、青田、松阳，衢州开化
高粱泡	*R. lambertianus* Ser.	5	Rl1~Rl5	浙江丽水青田、云和，衢州开化
山莓	*R. corchorifolius* L. f.	5	Rco1~Rco5	浙江丽水莲都、松阳、景宁
蓬藟	*R. hirsutus* Thunb.	5	Rh1~Rh5	浙江丽水莲都、青田、云和，衢州龙游
茅莓	*R. parvifolius* L.	5	Rp1~Rp5	浙江丽水莲都、松阳、景宁、庆元
寒莓	*R. buergeri* Miq.	5	Rb1~Rb5	浙江丽水青田、庆元，衢州龙游

表 2 GenBank 下载序列

Tab. 2 Sequences downloaded from Genbank

物种	序列条数	GenBank 登录号
掌叶覆盆子	2	GQ434662、MG730922
高粱泡	4	EF034132、FJ472904、KU881112、881113
山莓	1	AY083360
蓬藟	1	KU881092
茅莓	5	FJ472921、KP241742~241745

表 3 市场收集药材样品信息

Tab. 3 Information of samples collected from market

编号	部位	来源	标注生产地	编号	部位	来源	标注生产地
FPZ-1	果实	樟树药材市场	浙江丽水	FPZ-13	果实	磐安药材市场	浙江台州
FPZ-2	果实	樟树药材市场	江西	FPZ-14	果实	磐安药材市场	浙江绍兴
FPZ-3	果实	樟树药材市场	四川	FPZ-15	果实	磐安药材市场	浙江仙居
FPZ-4	果实	樟树药材市场	湖北	FPZ-16	果实	磐安药材市场	浙江宁海
FPZ-5	果实	樟树药材市场	浙江	FPZ-17	果实	磐安药材市场	浙江丽水
FPZ-6	果实	亳州药材市场	浙江丽水	FPZ-18	果实	磐安药材市场	浙江杭州
FPZ-7	果实	亳州药材市场	安徽宣城	FPZ-19	果实	磐安药材市场	浙江野生
FPZ-8	果实	亳州药材市场	安徽宣城	FPZ-20	果实	磐安药材市场	安徽广德
FPZ-9	果实	亳州药材市场	安徽宣城	FPZ-21	果实	磐安药材市场	浙江丽水野生
FPZ-10	果实	亳州药材市场	安徽宣城	FPZ-22	果实	磐安药材市场	四川野生
FPZ-11	果实	亳州药材市场	安徽广德	FPZ-23	果实	磐安药材市场	浙江湖州
FPZ-12	果实	磐安药材市场	浙江野生	FPZ-24	果实	磐安药材市场	浙江金华

2 方法

2.1 DNA 提取、PCR 扩增及测序

随机取药材样本 100 g 进行粉碎，取 30 mg 粉末，用植物组织研磨仪(德国 Retsch MM400)研磨 1.5 min(每秒 30 次)。利用植物组织提取试剂盒(Tiangen Biotech)提取总 DNA，65 ℃水浴 1 h，其他操作均按试剂盒规程进行。ITS2 序列通用引物，正向引物(ITS2F)：5’-ATGCGATACTTGGTGTGAAT-3’，反向引物(ITS2R)：5’-GACGCTTCTCCAGACTACAAT-3’。引物由上海铂尚生物技术有限公司合成。反应体系为 2×PCR Buffer for KOD FX 25 μL、2 mmol·L^{-1} dNTPs 5 μL、正、反向引物(1.5 pmol·L^{-1})各 1.0 μL、总 DNA 1 μL(30 ng)，其余用 ddH_2O 补至 50 μL。扩增程序：94 ℃、2 min，98 ℃、10 s，56 ℃、30 s，68 ℃、45 s，40 个循环；68 ℃、10 min。PCR 产物取 5 μL，使用 1% 琼脂糖进行凝胶电泳，扩增成功的产物送至上海铂尚生物技术有限公司进行双向测序。根据测序峰图判断可能为混合物的样品，采用分子克隆法筛选至少 10 个阳性克隆测序[19]。

2.2 数据处理

利用 CodonCode Aligner V 6.0.2 软件对所得的测序峰图进行校对拼接。基于隐马尔夫模型 HMMer 方法，将得到的序列及 GenBank 序列于 ITS2 数据库网站[20](http://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de/)进行注释，除去 5.8 S 和 28 S 区段，得到 ITS2 序列。采用软件 Molecular Evolutionary Genetics Analysis(MEGA) 7.0[21]对各 ITS2 序列进行分析，并基于 Kimura 2-Parameter (K2P)模型进行遗传距离等分析，构建邻接系统(Neighbor-Joining，NJ)发育聚类树，利用 Bootstrap (1 000 次重复)检验各分支的支持率。

3 结果与分析

3.1 24 批覆盆子样品的形态

市售覆盆子药材大多外观形态相似，见图 1。为多数小果聚合而成，呈圆锥形、扁圆形或球形，表面黄绿色或淡棕色带灰白色毛茸，上部钝圆，底部扁平，果实饱满，粒整结实。其中，FPZ-22 明显小于其他样品，饱满度较低，FPZ-12 和 FPZ-21 次之。

3.2 PCR 扩增效率

PCR 扩增和测序的成功率是评价 DNA 条形码序列的重要指标。本研究中，PCR 扩增效率及测序成功率均为 100%，24 个药材样品也均获得高质量的鉴定序列。

3.3 掌叶覆盆子的种内变异分析

掌叶覆盆子 ITS2 序列比对后长度范围为 211~212 bp，GC 含量为 56.4%~57.1%。种内存在 4 个变异位点，分别位于 18，150，178，206 bp 处，分为 5 种单倍型。A1 单倍型 8 条，A2 单倍型 1 条，A3 单倍型 1 条，A4 单倍型 1 条，A5 单倍型 1 条，见表 4。

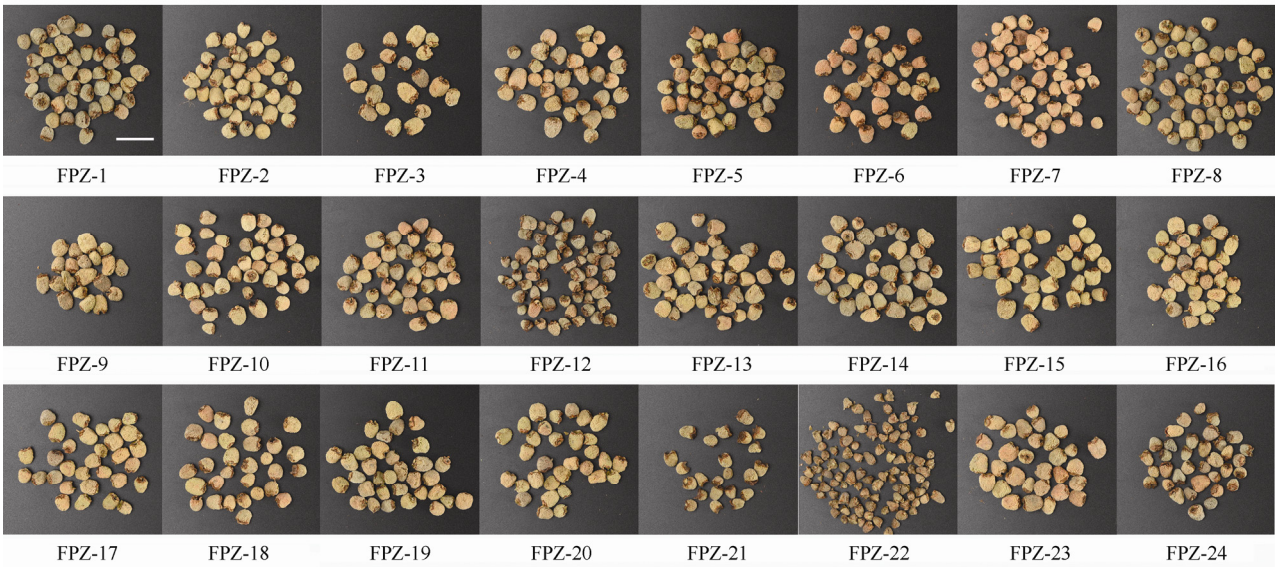

图 1 覆盆子样本的形态(标尺=2 cm)

Fig. 1 Mophology of Rubi Fructus samples(Bar=2 cm)

表 4 掌叶覆盆子种内变异

Tab. 4 Intra-specific variation of *R. chingii* Hu

单倍型	变异位点/bp			
	18	150	178	206
A1(8 条)	C	T	A	T
A2(1 条)	C	T	A	A
A3(1 条)	C	G	A	A
A4(1 条)	缺失	A	A	T
A5(1 条)	C	T	G	T

3.4 掌叶覆盆子及其混伪品的种内种间遗传距离分析

基于 K2P 模型计算掌叶覆盆子与其混伪品 K2P 的距离，掌叶覆盆子的种内 K2P 平均距离为 0.003 8，种内最大 K2P 遗传距离为 0.009 5。掌叶覆盆子与其混伪品高粱泡、山莓、篷藟、茅莓和寒莓的种间最小距离分别为 0.034 2，0.009 5，0.081 5，0.039 2，0.038 9，均大于掌叶覆盆子种内最大遗传距离，表明 ITS2 序列能准确区分掌叶覆盆子及其混伪品，见表 5。

表 5 掌叶覆盆子及其同属易混种种内及种间遗传距离

Tab. 5 Intra- and inter-specific genetic distance of *R. chingii* Hu and its confusable species of genus *Rubus*

样品	K2P 遗传距离(平均值)
掌叶覆盆子种内	0~0.009 5(0.003 8)
掌叶覆盆子与高粱泡种间	0.034 2~0.054 0(0.037 9)
掌叶覆盆子与山莓种间	0.009 5~0.019 1(0.011 6)
掌叶覆盆子与篷藟种间	0.081 5~0.103 2(0.085 5)
掌叶覆盆子与茅莓种间	0.039 2~0.054 8(0.043 5)
掌叶覆盆子与寒莓种间	0.038 9~0.048 9(0.040 3)

3.5 掌叶覆盆子及其混伪品的 NJ 树鉴定

基于得到的 48 条 ITS2 序列，用 NJ 法构建掌叶覆盆子及其混伪品的系统聚类树，见图 2。从所构建的 NJ 树中可以看出，掌叶覆盆子单独聚为一支，呈现出良好的单系性。

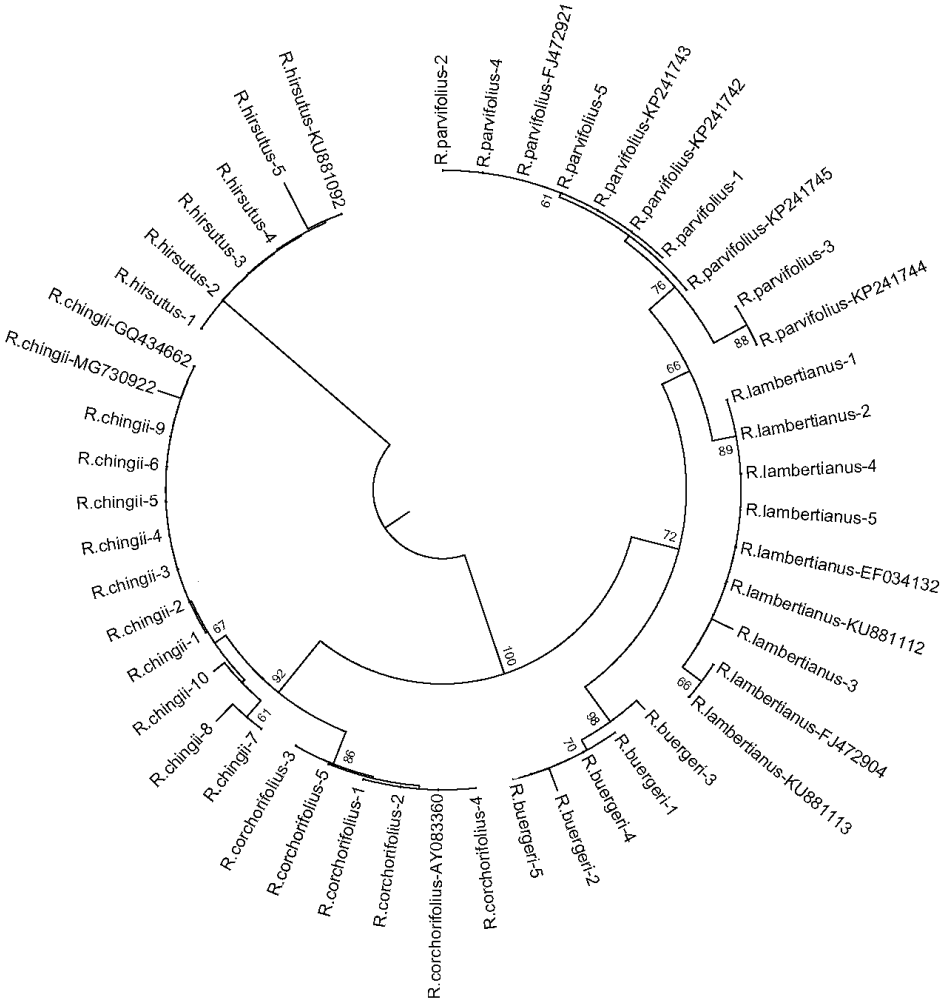

图 2 基于 ITS2 序列构建掌叶覆盆子及其同属易混种的 NJ 进化树

Bootstrap 1000 次重复，枝上数值仅显示自展支持率≥50%。

Fig. 2 NJ phylogenetic tree of original specie of *R. chingii* Hu and its confusable species of genus *Rubus* based on ITS2 sequence

Bootstap scores (1 000 replicates) are shown (≥50%) for each branch.

3.6 对疑似混合物样品的克隆测序与分析

根据测序峰图初步判断，来源于磐安药材市场的浙江野生样品(FPZ-19)有杂峰，极可能为混合物。采用分子克隆方法进行进一步鉴定研究，选取至少 10 个阳性克隆，并测序获得 10 条 ITS2 序列进行分析。在中药材 DNA 条形码鉴定系统中进行鉴定后显示，10 条序列中，9 条为掌叶覆盆子，1 条为山莓，结果证实样品来源为混合物。

3.7 市场药材鉴定结果分析

将收集到的 24 批标签为覆盆子的药材(编号为 FPZ-1~24)，按“2.2”项下方法得到 ITS2 序列，分别在 NCBI 数据库(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/)和中药材 DNA 条形码鉴定系统(TCM-DBS，http://www.tcmbarcode.cn/china/index.php?optionid=174)进行相似性搜索，鉴定结果见表 6。

对 24 份药材序列进行比对后发现共有掌叶覆盆子 22 份，山莓 1 份，混合品 1 份，伪品占抽样调查样本的 8.3%。

根据上述序列的比对结果，将 24 份市场药材和前文掌叶覆盆子及其混伪品基源物种的 ITS2 序列一起构建 NJ 树(其中 19 号混合物选主要序列进行比对)，见图 3。结果可以看出，23 份药材与掌叶覆盆子聚成一支，1 份与山莓聚成一支，表明基于 ITS2 的 DNA 条形码技术能很好地鉴定药材掌叶覆盆子。

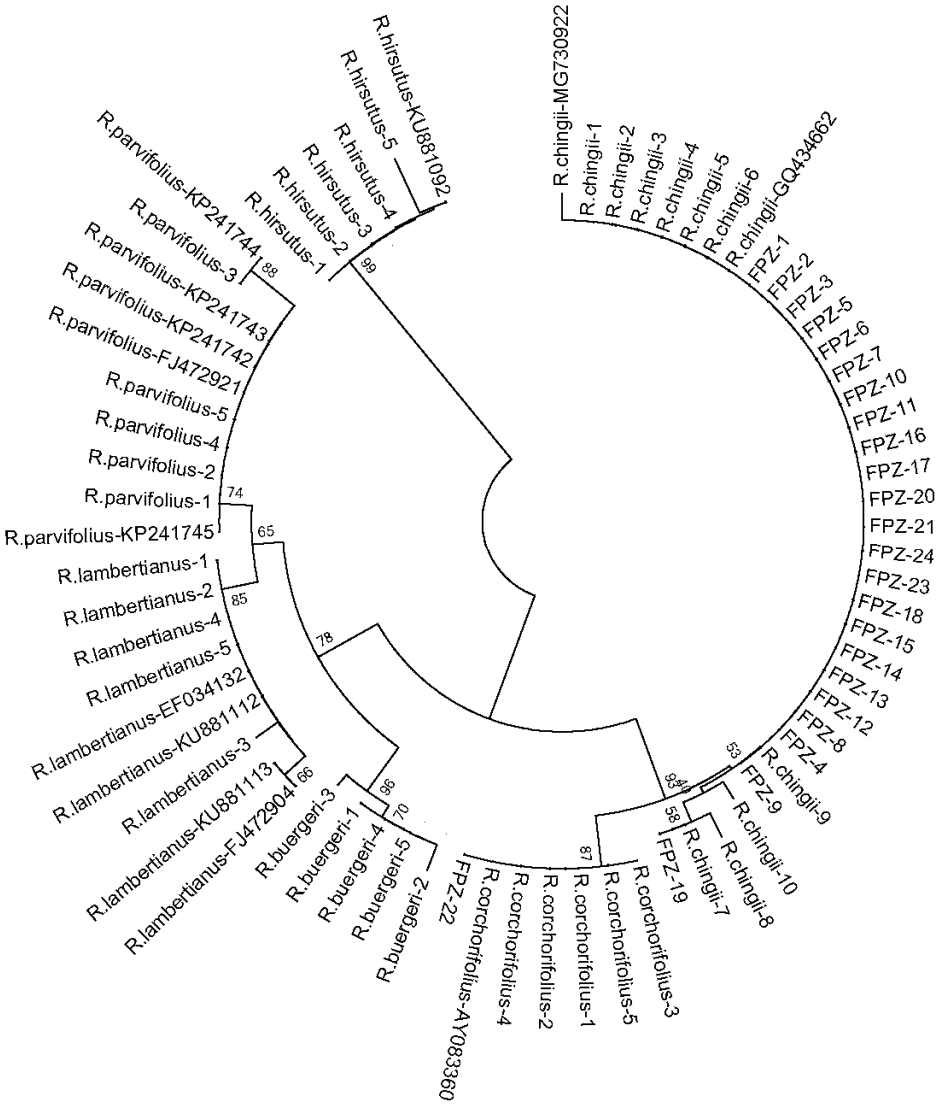

图 3 基于 ITS2 序列构建的市场药材覆盆子和已知基原物种的 NJ 进化树

Bootstrap 1000 次重复，枝上数值仅显示自展支持率≥50%。

Fig. 3 NJ phylogenetic tree of Rubi Fructus samples and original species known based on ITS2 sequence

Bootstap scores (1 000 replicates) are shown (≥50%) for each branch.

表 6 市场销售覆盆子药材鉴定结果

Fig. 6 Identification results of Rubi Fructus samples collected from markets

编号	来源	比对结果
FPZ-1~5	樟树药材市场	*R. chingii* Hu GQ434662 100%
FPZ-6~11	亳州药材市场	*R. chingii* Hu GQ434662 100%
FPZ-12~18，20~21，23~24	磐安药材市场	*R. chingii* Hu GQ434662 100%
FPZ-19	磐安药材市场	混合物，主要 *R. chingii* Hu GQ434662 100% 少量为 *R. chingii* Hu GQ434662 99.5% 少量为 *R. corchorifolius* L. AY083360 100%
FPZ-22	磐安药材市场	*R. corchorifolius* L. AY083360 100%

4 讨论

传统鉴定中药材的方法主要包括基原、显微及性状鉴定等方面的内容，主观性强，同时对专业背景和鉴定经验有较高的要求，特别是一些近缘物种，仅针对其药用部位较难进行准确鉴定。与传统方法相比，DNA 条形码技术直接从基因水平为药材鉴定提供依据，不受大小、形态等特征的影响，具有重复性高、样品用量少、准确性高等优点，已成为中药材鉴定的有效手段。本研究采用 ITS2 条形码鉴定了覆盆子常见混伪品，建立了覆盆子及其混伪品的参考 DNA 标准条形码数据库，并利用该数据库对市场收集的 24 批标签为覆盆子的药材进行了鉴定和验证。结果表明 ITS2 序列可有效鉴别已知混伪品，而且市场上的覆盆子药材大部分为真品，但也存在用混伪品或混合物来冒充真品的现象。

目前，大部分覆盆子药材收购于种植户，经过施肥、除草等日常管理，其果实较大，而野生覆盆子相对较小，产量低，但价格明显高于栽培种，因而市场上常有商贩用果实较小的山莓等来充当野生覆盆子，或者采收野生覆盆子时夹带着一些形态相近的非覆盆子的药材。覆盆子近缘易混淆各药材的药用部位和功效有较大差异，如山莓果实入药，主治醉酒、痛风；寒莓茎叶入药，主治疮疡肿痛、外伤出血；高粱泡以根入药，主治风热感冒、风湿痹痛等，这对覆盆子临床用药的有效性和安全性造成极大威胁。因此利用基于 ITS2 序列的条形码技术，精确鉴别覆盆子及其同属易混种，可以为覆盆子药材的生产、使用和监管提供有益的参考，为解决中药材混用和掺假等行业问题提供了强有力的工具。

REFERENCES

[1] 程丹, 李洁, 周斌, 等. 覆盆子化学成分与药理作用研究进展[J]. 中药材, 2012, 35(11): 1873-1876.

[2] MAO J H, WANG W Y, FAN L. et al. Determination of tannin in traditional SHE medicine Rubi Radix et Rhizoma at different harvest time by HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm (中国现代应用药学), 2017, 34(3): 393-395.

[3] 浙江省食品药品监督管理局. 浙江省中药炮制规范[M]. 中国医药科技出版社, 2015.

[4] JIANG C X, MAO J H, WANG W Y. et al. Chemical constituents of traditional She medicine Rubi Radix et Rhizoma [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2016, 47(19): 3370-3373.

[5] 马蕾, 何伯伟, 徐丹彬. 浙江省中药材 2017 年产销形势及发展对策[J]. 浙江农业科学, 2018, 59(11): 1959-1962.

[6] 李昌吉. 覆盆子与其伪品山莓的鉴别[J]. 中国药学杂志, 1988, 23(1): 18.

[7] 赵建邦, 张洁, 杨静. 覆盆子及其4种混淆品的性状鉴别[J]. 中药材, 1995, 18(5): 508.

[8] 杨静, 赵建邦, 张洁. 覆盆子及 4 种混淆品的显微鉴别[J]. 中药材, 1996, 19(9): 449-450.

[9] SCHINDEL D E, MILLER S E. DNA barcoding a useful tool for taxonomists [J]. Nature, 2005, 435(7038): 17.

[10] HEBERT P D, CYWINSKA A, BALL S L. et al. Biological identifications through DNA barcodes [J]. Pro Biol Sci, 2003, 270(1512): 313-321.

[11] CHEN S L, PANG X H, YAO H. et al. Identification system and perspective for DNA barcoding traditional Chinese materia medica [J]. World Sci Technol Mod Tradit Chin Med Mater Med(世界科学技术—中医药现代化), 2011, 5(13): 747-754.

[12] LV T, TENG R, SHAO Q. et al. DNA barcodes for the identification of *Anoectochilus roxburghii* and its adulterants [J]. Planta, 2015, 242(5): 1167-1174.

[13] ZHU X, ZHANG Y, LIU X. et al. Authentication of commercial processed Glehniae Radix (Beishashen) by DNA barcodes [J]. Chin Med, 2015, 10: 35.

[14] MA S J, LV Q D, HONG Z. et al. Identification of traditional She medicine shi-liang tea species and closely related species using the ITS2 barcode [J]. Appl Sci, 2017, 7(3): 195.

[15] LOU S K, WONG K L, LI M. et al. An integrated web medicinal materials DNA database: MMDBD (Medicinal Materials DNA Barcode Database) [J]. BMC genomics, 2010, 11: 402.

[16] 中国药典. 一部[S]. 2015.

[17] CHEN S L, YAO H, HAN J P. et al. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species [J]. PloS One, 2010, 5(1): e8613.

[18] CHEN S L, YAO H, HAN J P. et al. Principles for molecular identification of traditional Chinese materia medica using DNA barcoding [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2013, 38(2): 54-61.

[19] SAMBROOK J, W. R D. Molecular Cloning: A Laboratory Manual [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

[20] SCHULTZ J, MULLER T, ACHTZIGER M. et al. The internal transcribed spacer 2 database--a web server for (not only) low level phylogenetic analyses [J]. Nucleic Acids Research, 2006, 34(Web Server issue): W704-707.

[21] KUMAR S, STECHER G, TAMURA K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7. 0 for bigger datasets [J]. Mol Biol Evol, 2016, 33(7): 1870-1874.

收稿日期：2019-04-29

(本文责编：曹粤锋)