

## 基于 DNA 条形码和 PCR - RFLP 技术的进口紫草 ITS2 序列特征研究\*

刘杰<sup>1</sup>, 戴胜云<sup>1</sup>, 谷海媛<sup>1,2</sup>, 乔菲<sup>1</sup>, 连超杰<sup>1</sup>, 过立农<sup>1</sup>, 郑健<sup>1\*\*</sup>, 马双成<sup>1\*\*</sup>, 米加<sup>3</sup>

(1. 中国食品药品检定研究院, 北京 102629; 2. 沈阳药科大学, 沈阳 110016; 3. 伊犁哈萨克自治州检验检测认证研究院, 伊犁 835000)

**摘要** 目的: 基于 DNA 条形码和 PCR - RFLP 技术研究进口紫草 ITS2 序列的特征, 为市场紫草药材和饮片的质量控制与真伪鉴别提供参考依据。方法: 选用 ITS2 区域作为对进口紫草和紫草对照药材进行比较、鉴定的 DNA 条形码序列, 并基于 DNA 条形码和 PCR - RFLP 技术比较不同来源进口紫草的 ITS2 序列与紫草对照药材的异同。结果: 39 份进口紫草样品经限制性内切酶 AluI 酶切后, 其产物的琼脂糖凝胶电泳检测结果显示, 仅 DH3 在 500 bp 左右有条带, 而在 100 ~ 300 bp 无条带, 其余样品均在 100 ~ 300 bp 有 2 条或 3 条明显条带; 进口紫草样品与紫草对照药材的 ITS2 序列进行比对, 其中样品 DH3 与紫草对照药材的碱基差异最多, 有 15 个碱基差异, 样品 F2 与紫草对照药材的 ITS2 序列一致, 其他进口紫草样品与紫草对照药材的碱基差异为 1 ~ 9 个碱基; 从聚类结果中可以看出进口紫草样品 DH3 与其他进口紫草样品和紫草对照药材均明显区分, 独自为一枝, 而与紫草对照药材共同聚为一枝且支持率  $\geq 50\%$  的样品共有 14 个。结论: 选用 ITS2 区域, 基于 DNA 条形码和 PCR - RFLP 技术, 比较了进口紫草与紫草对照药材 ITS2 序列的异同, 为紫草药材及饮片的有效鉴定提供参考依据, 为紫草药材的市场监管提供有力保障。

**关键词:** 进口紫草; 内部转录间隔区 2 (ITS2); DNA 条形码; 限制性内切酶; 限制性片段长度多态性聚合酶链反应

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254 - 1793 (2024) 05 - 0750 - 06

doi: 10. 16155/j. 0254 - 1793. 2024. 05. 02

## The ITS2 sequences' characters study of imported *Arnebiae Radix* based on DNA barcoding and PCR - RFLP technologies\*

LIU Jie<sup>1</sup>, DAI Sheng - yun<sup>1</sup>, GU Hai - yuan<sup>1,2</sup>, QIAO Fei<sup>1</sup>, LIAN Chao - jie<sup>1</sup>, GUO Li - nong<sup>1</sup>, ZHENG Jian<sup>1\*\*</sup>, MA Shuang - cheng<sup>1\*\*</sup>, MI Jia<sup>3</sup>

(1. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China; 2. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China;

3. Yili Institute of Inspection, Testing and Certification, Yili 835000, China)

**Abstract Objective:** To provide reference for quality control and authenticity identification of *Arnebiae Radix* medicinal materials and decoction pieces in the market. By studied on the ITS2 sequences' characters of imported *Arnebiae Radix*, based on DNA barcoding and PCR - RFLP technologies. **Methods:** The ITS2 region was selected as the DNA barcode sequence for comparison and identification of imported *Arnebiae Radix* and reference medicinal materials. The ITS2 sequences of imported *Arnebiae Radix* from different sources with reference medicinal materials were compared based on DNA barcoding and PCR - RFLP technologies. **Results:** After the

\* 国家药品监督管理局药品监管科学体系建设重点项目“新技术新方法在中药质量控制中的应用”(RS2024Z006 - 105); 中国食品药品检定研究院学科带头人培养基金(2021X4); 新疆维吾尔自治区药品监督管理局智力援疆创新拓展人才计划——“新疆特色民族药研究(以新疆紫草为例)团队”项目

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

马双成 Tel: (010) 53832076; E - mail: masc@nifdc.org.cn

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

restriction endonuclease AluI enzyme digestion, the agarose – gel electrophoresis results of 39 imported *Arnebiae Radix* samples showed that, only DH3 had bands at around 500 bp, and none bands between 100 bp and 300 bp. And the results of other imported *Arnebiae Radix* samples had two or three obvious bands between 100 bp and 300 bp. The ITS2 sequences of imported *Arnebiae Radix* samples were compared with the reference medicinal materials, among which DH3 had the largest differences of 15 bases compared to the reference medicinal materials, the ITS2 sequence of F2 was same to the reference medicinal materials, and other imported *Arnebiae Radix* samples had 1 – 9 bases difference compared to the reference medicinal materials. The clustering results showed that the imported *Arnebiae Radix* sample DH3 was clearly distinguished from other imported *Arnebiae Radix* samples and reference medicinal materials which was in a single branch. There were 14 samples, which were clustered together with the reference medicinal materials in one branch with support rate  $\geq 50\%$ . **Conclusion:** The ITS2 region is selected to compare the similarities and differences of ITS2 sequences between imported *Arnebiae Radix* samples and reference medicinal materials based on DNA barcode and PCR – RFLP technologies, which provides a reference for effective identification of *Arnebiae Radix* medicinal materials and decoction pieces, and a strong guarantee for market supervision of *Arnebiae Radix* medicinal materials.

**Keywords:** imported *Arnebiae Radix*; internal transcribed spacer 2 (ITS2); DNA barcoding; restriction endonuclease; polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism (PCR – RFLP)

紫草因根部富含色素,最早作为古代人民印染衣物的植物染料,同时,紫草还是古代化妆品胭脂、唇脂的原料。据本草考证,紫草作为药材记载,最早见于《神农本草经》,随后历代本草中均有记载。紫草作为民族地区常用药材,同时也是常用大宗中药材,其需求量不断升高。现有可查的应用紫草药材的中成药处方 122 条,中药方剂 195 条<sup>[1]</sup>。2020 年版的《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》)中记载紫草的来源为紫草科软紫草属的新疆紫草[软紫草, *Arnebia euchroma* (Royle) Johnst.]、内蒙紫草(黄花软紫草, *Arnebia guttata* Bunge)的干燥根<sup>[2]</sup>。紫草的功能为清热凉血、活血解毒、透疹消斑。用于血热毒盛、斑疹紫黑、麻疹不透、疮疡、湿疹、水火烫伤。现代药理研究表明,紫草具有抗肿瘤、治疗皮肤病、创面修复、抗疲劳的作用<sup>[3-13]</sup>。目前市场上常见的紫草品种除 2020 年版《中国药典》规定的 2 个外,在河北、辽宁和江西等地常用硬紫草,在云南等地常用滇紫草和露蕊滇紫草,在四川等地常用密花滇紫草,在广西和广东等地常用蔷薇科的委陵菜做紫草用,俗称北紫草。由于紫草药材存在较多基原品种的问题,很多非药典规定的植物作为紫草药材混入市场,其中包括一些进口药材,导致了紫草在药材市场中的混乱情况。

中药鉴定是研究中药品种与质量,制定中药标准,

寻找和扩大药源的前提和基础。近年来,中药鉴定技术的迅速发展,为中药材基原物种的鉴定奠定了良好的基础。DNA 条形码(DNA barcoding)技术作为中药材物种鉴定研究中的新方法,具有鉴定结果准确、重复性好、方法通用性强等优点<sup>[14-17]</sup>。国家药典委员会已将中药材 DNA 条形码分子鉴定指导原则收载于 2015 年版和 2020 年版《中国药典》四部,其在中药材鉴定、药品流通与监督等诸多方面也得到了很好的应用。ITS2 区域作为中药材鉴定的潜在标准 DNA 条形码序列,具有可用于设计通用引物的保守区域,易于扩增,且有足够的碱基变异用以区分亲缘物种。

本试验选用 ITS2 区域作为对进口紫草及紫草对照药材比较、鉴定的 DNA 条形码序列,并基于 DNA 条形码和 PCR – RFLP 技术比较不同来源进口紫草的 ITS2 序列特征。

## 1 仪器、试药和方法

**1.1 仪器与试药** AB135 – S 万分之一分析天平(Mettler 公司); Milli – Q Biocel 纯水仪(Millipore 公司); MM400 球磨仪(Retsch 公司); ABI Veriti PCR 仪(ThermoFisher 公司); EPS – 301 电泳仪(Amersham 公司); GelDoc XR + 全自动凝胶成像系统(Biorad 公司)。

植物基因组 DNA 提取试剂盒(批号 DP305,天根生化科技有限公司); 2 × Taq Master Mix 缓冲液(批号 GK8006, GENEray 公司); GelRed(批号 41003, Bi-

otium 公司); 6 × Loading buffer(货号 GR0206, GEN-Eray 公司); 琼脂糖凝胶(编号 A610709 - 0100, BBI Life Sciences); MassRuler Express LR Forward DNA Ladder(货号 SM1263, Thermo FisherTRANS); FastDigest AluI(货号 FD0014, TIANGEN); 50 × TAE Buffer(货号 RT204, 天根生化科技有限公司); 无水乙醇(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 引物 ITS2F: 5' - ATGCGATACTTGGTGT GAAT - 3', ITS3R: 5' - GACGCTTCTCCAGACTACAAT - 3' 引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成。

试验收集的样品主要来源于塔吉克斯坦(编号 A1 ~ 7, AH3)、吉尔吉斯斯坦(编号 B1 ~ 5, BH3)、巴基斯坦(编号 C1 ~ 3, CH3, F1 ~ 5, FH3, G1 ~ 5, GH3)、阿富汗(编号 D2, D5, DH3)、哈萨克斯坦(编号 E1 ~ 5, EH2), 其中紫草对照药材(批号 121430 - 201705)为中国食品药品检定研究院制备标定的国家标准物质。

**1.2 DNA 模板的制备** 取紫草样品用无水乙醇常温浸泡 24 h, 取出晾干后用球磨仪粉碎成极细粉, 平行取样每份约 100 mg, 利用植物基因组 DNA 提取试剂盒进行 DNA 提取, 加入试剂盒中 GP1 后应裂解过夜(12 ~ 15 h), 后续按照 DNA 提取试剂盒说明书进行操作。

**1.3 PCR 反应** PCR 反应体系的制备: 20 μL 反应体系含 2 × Taq Master Mix 缓冲液 10 μL, 上下游引物各 1 μL (10 μmol · L<sup>-1</sup>), DNA 模板 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 7 μL。阴性对照为无 DNA 模板的反应体系。PCR 反应条件: 以 4 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 10 s 后, 将 PCR 管插入 PCR 仪中进行反应, 反应条件为 95 °C 预变性 4 min; 95 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 循环 35 次; 72 °C 延伸 7 min, 即得 PCR 扩增产物。

**1.4 酶切反应** 酶切反应体系的制备: 30 μL 反应体系含 10 × FastDigest 2 μL, FastDigest 酶 1 μL, PCR 产物 10 μL, ddH<sub>2</sub>O 17 μL。酶切反应条件: 以 4 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 10 s 后, 将 PCR 管插入 PCR 仪中进行反应, 反应条件为 37 °C 酶切 15 min, 65 °C 灭活 5 min, 即得酶切产物。

**1.5 琼脂糖凝胶电泳检测** 1 × TAE 电泳缓冲液的配制: 将 50 × TAE Buffer 稀释 50 倍作为工作液, 用于琼脂糖凝胶配制及进行凝胶电泳; 2.0% 琼脂糖凝胶的制备: 取琼脂糖凝胶片 2 片(1 g), 加入 50 mL 1 × TAE 电泳缓冲液, 微波炉中火加热煮沸 3 次至琼脂糖全部融化, 摇匀, 冷却至 65 °C 左右加入显色剂 GelRed(1: 10 000) 充分混匀, 小心地倒入内槽板上, 使胶液缓慢

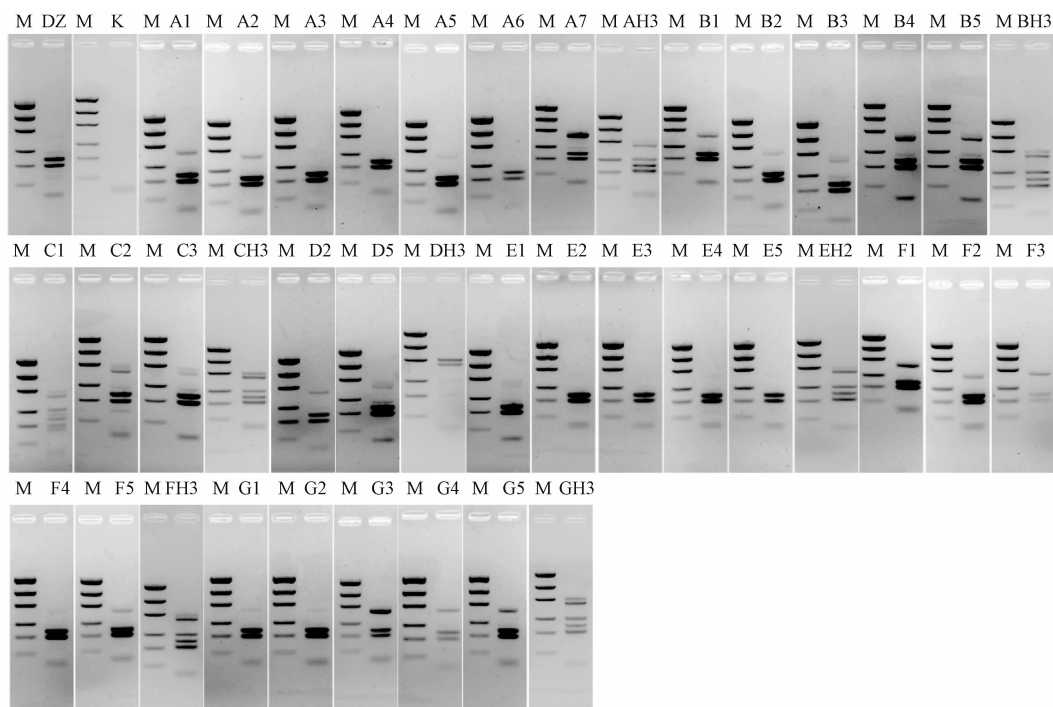
展开, 直到整个玻璃板表面形成均匀胶层, 室温下静置直至凝胶完全凝固, 垂直轻拔梳子, 将凝胶及内槽放入电泳槽中; 加样: 在已制备好的 2.0% 琼脂糖凝胶上用移液器将 3 μL 扩增产物、酶切产物、DNA Marker 分别加入胶板的样品槽内; 电泳: 添加 1 × TAE 电泳缓冲液至刚没过胶板为止, 将加样后的凝胶板立即进行电泳, 电压 5 V · cm<sup>-1</sup>。当溴酚蓝(Loading buffer) 移动到距离胶板下沿约 2 cm 处时, 停止电泳; 凝胶成像: 用凝胶成像系统拍照并保存结果。

**1.6 测序与分析** 扩增产物测序: 电泳检测结果显示单一明亮条带的 PCR 扩增产物送测序公司进行测序。测序结果分析: 测序结果使用 CodonCode Aligner 3.7.1 软件(CodonCode Co., USA) 校对拼接, 去除引物和 5.8S、28S 区段。将所得序列利用 MEGA 6.0 软件(molecular evolutionary genetics analysis) 与新疆紫草对照药材的序列进行分析比对, 并基于邻接法(neighbor - joining, NJ) 建立聚类树, 通过 bootstrap (1 000 次重复) 对各分支进行支持率检验。

## 2 结果

**2.1 PCR - RFLP 结果** 进口紫草样品与紫草对照药材酶切产物的琼脂糖凝胶电泳检测结果如图 1 所示。紫草对照药材在 100 ~ 300 bp 有 2 条明显条带, 300 ~ 500 bp 无明显条带, 阴性对照在 100 ~ 300 bp 和 300 ~ 500 bp 均无条带。39 份进口紫草的酶切反应产物琼脂糖凝胶电泳检测结果显示, A ~ 6、E1 ~ 5、F4、G1 ~ 2 共 12 份进口紫草样品与紫草对照药材的检测结果一致, 在 100 ~ 300 bp 有 2 条明显条带, 300 ~ 500 bp 无明显条带; A1 ~ 2、A7、B3 ~ 5、C2 ~ 3、D2、D5、F1 ~ 3、F5、G3 ~ 5 共 19 份进口紫草样品在 100 ~ 300 bp 有 2 条明显条带, 且在 300 ~ 500 bp 有明显条带; AH3、BH3、C1、CH3、EH2、FH3、GH3 共 7 份进口紫草样品在 100 ~ 300 bp 有 3 条明显条带, 且在 300 ~ 500 bp 有明显条带; DH3 在 500 bp 左右有条带, 而 100 ~ 300 bp 无条带。结果发现, 39 份进口紫草的酶切反应产物中, 仅 DH3 不能被限制性内切酶 AluI 进行酶切, 其余均可。限制性内切酶 AluI 的酶切位点为“AG<sup>^</sup>CT”, 因此可以确定 DH3 的 ITS2 序列中不存在“AG<sup>^</sup>CT”位点, 其余进口紫草样品均存在。

**2.2 进口紫草与紫草对照药材的变异位点比较分析** ITS2 引物的 PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测, 结果显示为单一明亮条带, 将扩增产物进行测序。测序峰图使用 CodonCode Aligner 3.7.1 软件



M. DNA Marker, 由上至下分别为 1 000、700、500、300、200、100 bp (from top to bottom are 1 000, 700, 500, 300, 200, 100 bp) A1 ~ A7、AH3、B1 ~ B5、BH3、C1 ~ C3、CH3、D2、D5、DH3、E1 ~ E5、EH2、F1 ~ F5、FH3、G1 ~ G5、GH3. 进口紫草样品 (imported *Arnebie Radix*) DZ. 紫草对照药材 (*Arnebie Radix* reference drug) K. 阴性对照 (negative reference)

图 1 进口紫草与紫草对照药材酶切产物的琼脂糖凝胶电泳检测结果

Fig. 1 The agarose gel electrophoresis results of enzyme - digested product from imported *Arnebie Radix* and *Arnebie Radix* reference drug

校对拼接,去除 5.8S 和 28S 区段,并利用 MEGA 6.0 软件分析比对。紫草对照药材的 ITS2 序列信息为: CACATCGCGTCACCCCATCCAAAATAATGTTGGATGTGGT GGATTGTGACCTCCTGTGTCTTGAGATGCAGTTGGTCGAAATTTCGAGTCCGGAGCTTAGGACTTCACGACAAGTGGTGGTTGGATAACAACCTCGCGTCATGTCGTGTGCCAAGCCTCCGTGTCTCCGTAGACCCTAAGGCCGCTGCTTTCCAACCTCGTTTCGTTGGAAACCGTGCTACGACCG,进口紫草样品与紫草对照药材的 ITS2 序列进行比对,具体变异位点信息见表 1,其中 DH3 与紫草对照药材的碱基差异最多,有 15 个碱基差异;F2 与紫草对照药材的 ITS2 序列一致;其他进口紫草样品与紫草对照药材的碱基差异为 1 ~ 9 个碱基。

**2.3 邻接法聚类分析** 利用 MEGA 6.0 软件将进口紫草样品与紫草对照药材的 ITS2 序列基于邻接法建立聚类树,通过 bootstrap(1 000 次重复)对各分支进行支持率检验,结果如图 2 所示,聚类树上数值表示自展支持率。可以看出 DH3 与其他进口紫草样品、紫草对照药材均明显区分,独自为 1 枝;F2 与紫草对照药材聚为 1 枝,支持率为 64%;E1、E4、D5、CH3、

C3、C2、F2、A5 与紫草对照药材共同聚为 1 枝,支持率为 65%;BH3、B1、B3、B4、B5、F5 与 E1、E4、D5、CH3、C3、C2、F2、A5 及紫草对照药材共同聚为 1 枝,支持率为 50%;C1、A1、B2、F1、G4、GH3、F3、A7、G3、A2、D2、FH3、G5 与紫草对照药材聚类的支持率低于 50%;AH3、EH2、A3、A4、A6、E2、E5、F4、G1、E3、G2 聚为 1 枝并区别于紫草对照药材,支持率为 97%。

### 3 分析与讨论

紫草 DH3 的 ITS2 序列为:CGAATCGCGTCACC CCATCCATGATACTCTTGGATGTGGTGGATTGTGACCTCCTGTGTCTTGAGATGCAGTTGGTTCGAAATTTGAGTCCGGATCTTAGGACTTCACGACAAGTGGTGGTTGGATAACAACCTTCGTCATGTCTGTGCCGAACCTCCGTGTCTCCCTAGACCCTAAGGCCGCTGCTTTCCAACCTCGTTGTTCGGAAACCGCGCTACGACCG,根据 PCR - RFLP、变异位点比较分析和邻接法聚类分析的结果,进口紫草样品 DH3 与其他进口紫草样品及紫草对照药材的差异明显,为 2015 年市场紫草药材的主要来源品种,2015 年该品种的市场占有率 > 50%。将以上 DH3 的 ITS2 序列输入到 NCBI 数据库的 BLAST

表 1 进口紫草与紫草对照药材的变异位点信息

Tab. 1 The variation point information of imported *Arnebiae Radix* and *Arnebiae Radix* reference drug

编号 (No.)	碱基位点(nucleotide site)																									
	2	3	14	22	23	26	27	29	63	84	94	133	143	147	151	153	158	167	168	180	181	189	196	200	203	213
121430-201705、F2	A	C	C	A	A	A	A	G	G	C	G	C	C	T	A	G	C	G	T	C	G	T	C	C	T	T
A5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
A1、A2、B2、C1、D2、F1、FH3、G4、G5、GH3	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
C2、C3、CH3、D5、E1、E4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
BH3	.	.	.	.	T	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
B1、B3、B4、B5、F5	.	.	.	.	T	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	T	.	.	T	.	.	.	.
A3、A4、A6、E2、E5、F4、G1、G2	.	.	A	.	.	.	C	C	C	.	.	.	.	.	.	A	T	.	.	.	C	T	.	.	.	.
E3	.	.	A	.	.	.	C	C	C	.	.	.	.	.	.	A	T	.	.	A	C	T	.	.	.	.
AH3、EH2	.	.	.	.	.	.	C	C	C	.	.	.	.	.	.	A	T	.	.	.	C	T	.	.	.	.
A7、G3	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	G	.	A	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.
F3	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	G	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
DH3	G	A	.	T	G	.	C	C	.	T	T	T	.	.	G	A	.	C	.	.	.	.	.	T	C	C

注(note):“.”与第一排(121430-201705 和 F2)的碱基相同(same as the base of 121430-201705 and F2 in the first row)

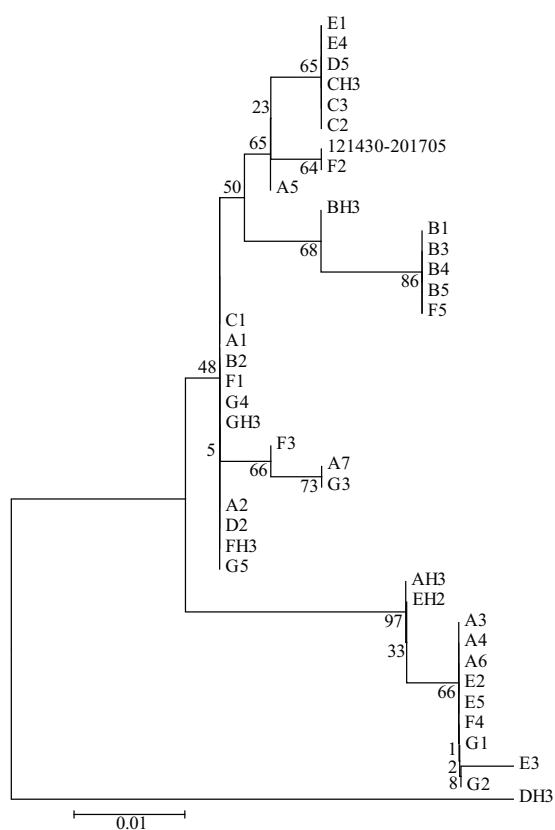


图 2 基于邻接法建立进口紫草样品与紫草对照药材 ITS2 序列的聚类树  
Fig. 2 Establish the phylogenetic tree of the ITS2 sequences from imported *Arnebiae Radix* and *Arnebiae Radix* reference drug based on NJ method

(Basic Local Alignment Search Tool)中进行比对,对比结果显示 DH3 的 ITS2 序列与序列 KF287949.1

致性最高,序列 KF287949.1 为植物 *Arnebia benthamii* 的 ITS2 序列,由德克萨斯国际农工大学上传<sup>[18-19]</sup>。DH3 的 ITS2 序列与植物 *Arnebia benthamii* 存在 7 个变异位点,而与紫草对照药材存在 15 个变异位点,说明 DH3 与植物 *Arnebia benthamii* 的亲缘关系更近。经查,*Arnebia benthamii* 收载于巴基斯坦植物志(Flora of Pakistan)中,DH3 收集自阿富汗,巴基斯坦位于阿富汗南部,与阿富汗有着漫长的国界线,推测 DH3 可能为植物 *Arnebia benthamii* 的变种或近缘物种。

限制性内切酶 AluI 的酶切位点为“AG<sup>^</sup>CT”,紫草对照药材及部分进口紫草样品的 ITS2 序列中存在“AG<sup>^</sup>CT”酶切位点,因此在 PCR-RFLP 结果中在 100~300 bp 有明显的酶切条带,而在邻接法聚类分析结果中,是对二者的 ITS2 序列(约 220 bp)进行聚类。因此,部分进口紫草样品与紫草对照药材的 PCR-RFLP 结果一致,却在邻接法聚类分析时分布在不同的分枝中,且分枝的支持率 > 50%。以上 2 个结果的对比中可以发现,邻接法聚类分析的结果更能在 ITS2 序列中的差异。Chen 等<sup>[20]</sup>对超过 6 600 份植物样本进行了 ITS2 序列鉴别能力的测试,这些植物样本在植物分类学中分布广泛,结果显示 ITS2 在种的水平上的鉴别成功率达 92.7%,可作为中药材鉴定的潜在标准 DNA 条形码序列。在本课题前期研究中发现,采自新疆不同地区的新疆紫草其 ITS2 序列完全一致,与国内常见同科属近缘物种紫草、滇紫草、露蕊滇紫草、密花滇紫草、黄花滇紫草、

黄花软紫草、疏花软紫草存在稳定差异,而进口紫草中存在 ITS2 序列与新疆紫草具有 15 个稳定变异位点的非药典品,在 Genebank 中比对与植物 *Arnebia benthamii* 更接近;同时也存在与新疆紫草的 ITS2 序列较为一致(变异位点 1~9 个)的样品,在 Genebank 中比对与植物 *Arnebia euchroma*(新疆紫草)更接近。

DNA 条形码和 PCR-RFLP 技术均为较成熟的技术,已在中药、民族药材及饮片的真伪鉴别中广泛应用,2020 年版《中国药典》一部中,川贝母、霍山石斛、金钱白花蛇、乌梢蛇、蕲蛇的药材或饮片【鉴别】项下均收录了此类鉴别方法。目前,进口紫草的市场占有量大,填补了市场上紫草药材需求的空缺,但进口紫草并未被纳入药典标准中,其安全性、有效性、用量及进口途径等均有待考证。本文选用 ITS2 区域作为对进口紫草及紫草对照药材比较、鉴定的 DNA 条形码序列,并基于 DNA 条形码和 PCR-RFLP 技术比较不同来源进口紫草的 ITS2 序列特征,为了解目前药材市场中紫草药材的真实品种情况、样品来源情况以及质控标准建立提供参考,同时为紫草药材的市场监管提供保障。

#### 参考文献

- [1] Chinese Patent Medicines & Chinese Medicine Prescriptions of *Arnebia Radix* [DB/OL]. [2023-04-09]. [https://db.yaozh.com/yaocai\\_bz?comprehensivesearchcontent=%E7%B4%AB%E8%8D%89&](https://db.yaozh.com/yaocai_bz?comprehensivesearchcontent=%E7%B4%AB%E8%8D%89&)
- [2] 中华人民共和国药典 2020 年版. 一部[S]. 2020:805  
ChP 2020. Vol I [S]. 2020:805
- [3] JANG SY, LEE JK, JANG EH, *et al.* Shikonin blocks migration and invasion of human breast cancer cells through inhibition of matrix metalloproteinase-9 activation[J]. *Oncol Rep*, 2014, 31(6):2827
- [4] ZHANG SR, XU YS, JIN E, *et al.* Capilliposide from *Lysimachia capillipes* inhibits AKT activation and restores gefitinib sensitivity in human non-small cell lung cancer cells with acquired gefitinib resistance[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2017, 38(1):100
- [5] JANG WJ, JUNG SK, KANG JS, *et al.* Anti-tumor activity of WK88-1, a novel geldanamycin derivative, in gefitinibresistant non-small cell lung cancers with Met amplification[J]. *Cancer Sci*, 2014, 105(10):1245
- [6] YANG J, QIN G, LUO M, *et al.* Reciprocal positive regulation between Cx26 and PI3K/Akt pathway confers acquired gefitinib resistance in NSCLC cells via GJIC-independent induction of EMT[J]. *Cell Death Discov*, 2015, 6:e1829
- [7] KIM WJ, KIM S, CHOI H, *et al.* Histological transformation from non-small cell to small cell lung carcinoma after treatment with epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor[J]. *Thorac Cancer*, 2015, 6(6):800
- [8] KLEMI P, PYLKKÄNEN L, KIILHOLMA P, *et al.* P53 protein detected by immunohistochemistry as a prognostic factor in patients with epithelial ovarian carcinoma[J]. *Cancer*, 2015, 76(7):1201
- [9] JIN YT, KAYSER S, KEMP BL, *et al.* The prognostic significance of the biomarkers p21WAF1/CIP1, p53, and bcl-2 in laryngeal squamous cell carcinoma[J]. *Cancer*, 2015, 82(11):2159
- [10] RADICE PD, MATHIEU P, LEAL MC, *et al.* Fibulin-2 is a key mediator of the pro-neurogenic effect of TGF- $\beta$ 1 on adult neural stem cells[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2015, 67:75
- [11] DA C, LIU Y, ZHAN Y, *et al.* Nobiletin inhibits epithelial-mesenchymal transition of human non-small cell lung cancer cells by antagonizing the TGF- $\beta$ 1/Smad3 signaling pathway[J]. *Oncol Rep*, 2016, 35(5):2767
- [12] HU ZC, SHI F, LIU P, *et al.* TIEG1 represses Smad7-mediated activation of TGF- $\beta$ 1/Smad signaling in keloid pathogenesis[J]. *J Invest Dermatol*, 2017, 137(5):1051
- [13] LIU XH, ZHANG QY, PAN LL, *et al.* NADPH oxidase 4 contributes to connective tissue growth factor expression through Smad3-dependent signaling pathway[J]. *Free Radical Bio Med*, 2016, 94:174
- [14] 陈士林, 庞晓慧, 姚辉, 等. 中药 DNA 条形码鉴定体系及研究方向[J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2011, 13(5):747  
CHEN SL, PANG XH, 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*, 2011, 13(5):747
- [15] 陈士林, 姚辉, 宋经元, 等. 基于 DNA barcoding(条形码)技术的中药材鉴定[J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2007, 9(3):7  
CHEN SL, YAO H, SONG JY, *et al.* Use of DNA barcoding to identify Chinese medicinal materials[J]. *World Sci Technol Mod Tradit Chin Med Mater Med*, 2007, 9(3):7
- [16] LI DZ, LIU JQ, CHEN ZD, *et al.* Plant DNA barcoding in China[J]. *J Syst Evol*, 2011, 49(3):165
- [17] LI M, CAO H, BUT PPH, *et al.* Identification of herbal medicinal materials using DNA barcodes[J]. *J Syst Evol*, 2011, 49(3):271
- [18] COHEN JL. A phylogenetic analysis of morphological and molecular characters of *Lithospermum* L. (Boraginaceae) and related taxa: evolutionary relationships and character evolution[J]. *Cladistics*, 2011, 27(27):559
- [19] 李谦, 刘杰, 过立农, 等. 基于 ITS2 序列的紫草 PCR-RFLP 鉴别研究[J]. *药物分析杂志*, 2016, 36(9):1611  
LI Q, LIU J, GUO LN, *et al.* Molecular identification of *Arnebia Radix* by PCR-RFLP based on the ITS2 sequence[J]. *Chin J Pharm Anal*, 2016, 36(9):1611
- [20] CHEN SL, YAO H, HAN JP, *et al.* Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species[J]. *PLoS One*, 2010, 5(1):1

(本文于 2023 年 4 月 12 日收到)