基于 ITS2 序列的准噶尔铁线莲及其易混品的分子鉴别

杨俊玲[1]，俞丽婷[1]，赵　媛[1]，刘　艺[1]，程　波[2*]

（1. 新疆乌鲁木齐市中医医院，新疆乌鲁木齐 830000；2. 新疆维吾尔自治区药物研究院，新疆乌鲁木齐 830010）

摘要：应用核糖体第二内转录间隔区（ITS2）DNA 条形码技术，对民族药材准噶尔铁线莲及其易混品（黄花铁线莲、威灵仙和明铁线莲）进行分子鉴定。首先，对准噶尔铁线莲及其易混品的 ITS2 序列进行扩增及双向测序。随后，采用 CodonCode Aligner 12.0.5 软件完成测序峰图拼接，再运用 MEGA 6.0 软件进行多重序列比对，计算种内、种间遗传距离，并构建邻接（NJ）系统进化树，预测 ITS2 二级结构。经 PCR 扩增及测序后，准噶尔铁线莲及其易混品的 ITS2 序列长度分别为 219、221、218 和 226 bp。样品 ITS2 序列与 GenBank 数据库中对应物种参考序列的相似度均≥ 99%。NJ 系统进化树分析结果显示，准噶尔铁线莲及其易混品分别聚为独立分支，各分支支持率均大于 80%。准噶尔铁线莲种内遗传距离（0.003 7）小于其与易混品的种间遗传距离（0.025 4 ～ 0.055 2），存在清晰的条形码间隔。ITS2 二级结构的预测结果显示，准噶尔铁线莲与易混品在螺旋区的茎环数目、大小、位置等方面存在明显差异。上述结果表明，ITS2 序列作为 DNA 条形码，能准确鉴别准噶尔铁线莲及其易混品，为铁线莲药材的真伪鉴别与用药安全提供可靠的技术支撑。

关键词：准噶尔铁线莲；易混品；第二内转录间隔区；分子鉴别；多重序列比对；质量控制

中图分类号：R282.5　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2026)09-1099-06

引用：杨俊玲, 俞丽婷, 赵媛, 等. 基于ITS2序列的准噶尔铁线莲及其易混品的分子鉴别[J]. 中国医药工业杂志, 2026, **57**(9): 1099-1104. DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2026.09.010

Molecular Identification of *Clematis songarica* Bunge and Its Adulterants Based on ITS2 Sequence

YANG Junling[1], YU Liting[1], ZHAO Yuan[1], LIU Yi[1], CHENG Bo[2*]

(*1. Xinjiang Urumqi Hospital of Traditional Chinese Medicine, Urumqi 830000; 2. Xinjiang Institute of Materia Medica, Urumqi 830010*)

ABSTRACT: Using the nuclear ribosomal second internal transcribed spacer (ITS2) barcoding technique, molecular identification was performed on the ethnic medicinal plant *Clematis songarica* Bunge and its easily confused adulterants (*Clematis intricata* Bunge, *Clematis chinensis* Osbeck, and *Clematis mae* Z. Z. Yang & L. Xie). The ITS2 sequences of *C. songarica* Bunge and its adulterants were amplified and subjected to bidirectional sequencing. Sequencing chromatograms were assembled using CodonCode Aligner 12.0.5 software. Multiple sequence alignment was performed with MEGA 6.0. Subsequently, the intra- and inter-specific genetic distances were calculated, a Neighbor-Joining (NJ) phylogenetic tree was constructed, and the ITS2 secondary structures were predicted. The ITS2 sequence lengths of *C. songarica* Bunge and its adulterants were 219, 221, 218 and 226 bp, respectively. The similarities between sample ITS2 sequences and the matching reference sequences obtained from GenBank were all no less than 99%. The NJ phylogenetic tree showed that *C. songarica* Bunge and the above adulterants clustered into independent clades with bootstrap support values greater than 80% for each branch. The intraspecific genetic distance within *C. songarica* (0.003 7) was significantly smaller than the interspecific genetic distances to its adulterants (0.025 4–0.055 2), forming a clear barcoding gap. Prediction of ITS2 secondary structures revealed obvious differences in the number, size and position of stem-loops within helical regions. The results indicated that, as a DNA barcode, the ITS2 sequence could accurately identify *C. songarica* Bunge and its adulterants, which provided a reliable technical basis for the authenticity identification and safe application of *Clematis* medicinal materials.

Key Words: *Clematis songarica* Bunge; adulterant; second internal transcribed spacer; molecular identification; multiple sequence alignment; quality control

准噶尔铁线莲（*Clematis songarica* Bunge）为毛茛科铁线莲属植物，主要分布于中国的新疆地区，在蒙古国、俄罗斯亦有分布，生长于荒漠低山麓前洪积扇、石砾质冲积堆与荒漠河岸等地。准噶尔铁线莲是维吾尔族、哈萨克族等习用药材，临床应用历史悠久。铁线莲属药材主要含有皂苷类、黄酮类、木脂素类、香豆素类等化学成分，具有抗炎、镇痛、抗肿瘤、抗氧化、抑菌等药理作用[1-2]。当前，准噶尔铁线莲药材的需求量不断增加，其潜在的经济与药用价值日益凸显。对和田、阿克苏、伊犁等地的民间药材市场的调研结果表明，准噶尔铁线莲尚无规范化商品规格。并且，其与黄花铁线莲（*Clematis intricata* Bunge）、威灵仙（*Clematis chinensis* Osbeck）和明铁线莲（*Clematis mae* Z. Z. Yang & L. Xie）在外观形态上较为相似，传统理化鉴别方法难以准确区分；加之传统检测方法易受产地环境、采收加工、人为混杂等因素干扰，在一定程度上制约了该药材临床应用的安全性与有效性。

近年来，DNA 条形码分子鉴定技术因操作简便、准确性高、快速高效等优势，已被广泛应用于药材鉴定领域[3-4]。陈士林院士团队提出将核糖体第二内转录间隔区（second internal transcribed spacer，ITS2）序列作为药用植物鉴定的标准 DNA 条形码[5]。目前，ITS2 已被广泛用于药用植物种质资源鉴别及系统进化研究[6-7]。本研究旨在建立一种快速、准确的民族药材准噶尔铁线莲及其易混品鉴别方法，为该药材的质量研究和临床用药安全提供科学依据。

1　仪器与试药

C1000 型 PCR 扩增仪、Gel Doc XR+ 型凝胶成像系统均购自美国 Bio-Rad 公司；5424R 型冷冻离心机（德国 Eppendorf 公司）；JW-100 型电子天平（余姚市纪铭称重校验设备有限公司）；DYY-6C 型电泳仪（北京六一生物科技有限公司）；LDZX-30L 型立式压力蒸汽灭菌器（上海申安医疗器械厂）。

Ezup 柱式深加工产品基因组 DNA 抽提试剂盒［生工生物工程（上海）股份有限公司］；RNase A（批号 1250807-V2，规格 20 mg/mL）、GelStain 1000× 核酸染料（批号 20230925）和 Trans 2K DNA Marker（批号 20240228）均购自北京全式金生物技术股份有限公司；琼脂糖（上海贝晶生物技术有限公司，含量≥ 95%，批号 162135）；无水乙醇、三氯甲烷均购自成都市科隆化学品有限公司。

各药材样品均于 2024 年 5—10 月采集于新疆乌鲁木齐、吐鲁番、吉木萨尔等地，其中准噶尔铁线莲药材 5 批，黄花铁线莲药材 3 批，威灵仙药材 3 批，明铁线莲药材 2 批，共计 13 批、37 份样品（表 1）。所有样品均经新疆维吾尔自治区药物研究院何江研究员鉴定，凭证标本保存于该院标本室。准噶尔铁线莲基原物种参照的美国国家生物技术信息中心（National Center for Biotechnology Information，NCBI）GenBank 核酸序列登录号为 PV901466.1、KC415710.1，黄花铁线莲为 PV901462.1，威灵仙为 KT602425.1，明铁线莲为 PQ842604.1。

2　方法与结果

2.1　基因组总 DNA 提取

各药材样品用 75% 乙醇清洗，自然挥干后取 0.1 g，采用液氮冷冻后研磨成粉，用 DNA 抽提试剂盒提取各批样品的基因组总 DNA，于 －20 ℃保存备用。

表 1　准噶尔铁线莲及其易混品的样品信息

Tab.1　Information of *C. songarica* Bunge and Its Adulterants

名称	批号	份数	采集地
准噶尔铁线莲	ZGE-1	3	吐鲁番市鄯善县库木塔格沙漠
准噶尔铁线莲	ZGE-2	3	昌吉市吉木萨尔县泉子街镇
准噶尔铁线莲	ZGE-3	3	乌鲁木齐市天山区乌拉泊村
准噶尔铁线莲	ZGE-4	3	乌鲁木齐市乌鲁木齐县板房沟镇
准噶尔铁线莲	ZGE-5	3	乌鲁木齐市沙依巴克区永丰三队
黄花铁线莲	HH-1	3	喀什地区疏附县萨依库尔干 314 国道
黄花铁线莲	HH-2	3	乌鲁木齐市沙依巴克区永丰镇
黄花铁线莲	HH-3	3	吐鲁番市托克逊县克尔碱镇
威灵仙	WLX-1	3	福州市长乐区保福山
威灵仙	WLX-2	3	贵阳市花溪区云碧路 462 号
威灵仙	WLX-3	3	安顺市镇宁布依族苗族自治县 356 国道香村农庄
明铁线莲	MTX-1	2	乌鲁木齐市天山区燕儿窝街道
明铁线莲	MTX-2	2	乌鲁木齐市天山区燕儿窝街道

收稿日期：2026-04-24

基金项目：全国中药特色技术传承人才培训项目（国中医药人教函 96 号）、天山英才医药卫生高层次人才培养计划项目（TSYC202401B070）、新疆维吾尔自治区药学会科研基金资助项目（YXH202417）、2025 年全国老药工传承工作室建设项目（国中医药人教函 181 号）

作者简介：杨俊玲，主管中药师，从事中药鉴定与炮制的研究。

通信作者：程　波，副研究员，从事分子生药学及中药材鉴定研究。

2.2 PCR 扩增与测序

采用植物 DNA 条形码通用引物（S2F：5′-ATGCGATACTTGGTGTGAAT-3′；S3R：5′-GACGCTTCTCCAGACTACAAT-3′）扩增 ITS2 序列[8]，引物由生工生物工程（上海）股份有限公司合成。用 PCR 扩增仪进行扩增［反应体系（25 μL）：10× Taq Buffer 2.5 μL，dNTPs 2 μL，正反引物（10 mol/L）各 0.5 μL，Taq 酶 0.25 μL，总 DNA 2 μL，ddH_2O 17.25 μL；扩增程序：94 ℃预变性 5 min，94 ℃变性 30 s，56 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 45 s，共 40 个循环，72 ℃延伸 10 min］。取 PCR 反应产物 5 μL，用 1%琼脂糖凝胶进行电泳检测，于凝胶成像系统中成像，将目的条带的 PCR 产物送至生工生物工程（上海）股份有限公司进行双向测序。

2.3 序列分析与处理

采用 CodonCode Aligner 12.0.5 软件对测序峰图进行序列拼接，除去引物区和低质量序列，再用隐马尔可夫模型剔除 5.8S rDNA 和 28S rDNA 区段，获得完整的 ITS2 间隔区序列[9-10]。用 MEGA 6.0 软件对拼接后的序列进行多重序列比对，采用邻接（Neighbor-Joining，NJ）法，基于 Kimura 双参数模型计算各序列间的遗传距离，构建 NJ 系统进化树。利用 ITS2 数据库（http://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de）预测各药材样本 ITS2 的二级结构。

2.4 ITS2 序列分析

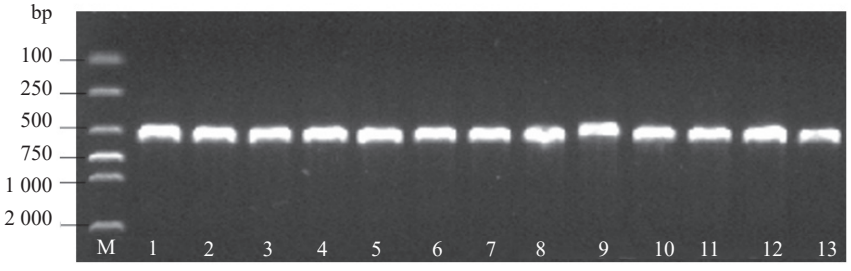
电泳结果显示，扩增产物长度约为 500 bp，条带清晰明亮，无拖尾现象（图 1）。准噶尔铁线莲（ZGE-1 ～ ZGE-5）的核酸序列长度为 490 ～ 495 bp，基于隐马尔可夫模型剔除 5.8S rDNA 和 28S rDNA 区段后，ITS2 核酸序列长度为 219 bp，有 2 个单倍型基因；黄花铁线莲（HH-1 ～ HH-3）核酸序列长度为 475 ～ 494 bp，仅有 1 个单倍型基因，ITS2 核酸序列长度为 221 bp；威灵仙（WLX-1 ～ WLX-3）核酸序列长度为 484 ～ 493 bp，仅有 1 个单倍型基因，ITS2 核酸序列长度为 218 bp；明铁线莲（MTX-1 ～ MTX-2）核酸序列长度为 498 bp，仅有 1 个单倍型基因，ITS2 核酸序列长度为 226 bp。

2.5 种属同源比对分析

将 ITS2 序列上传至 GenBank 数据库进行 BLAST 比对（http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi），以获取序列间的百分比相似度和期望值。百分比相似度越高、期望值越低，表明查询序列越接近真实的同源物种。本研究依据 ITS2 序列比对相似度进行物种鉴定，评判标准为：≥ 99%为同种，95%～99%为同属，小于 90%则为不同基原。准噶尔铁线莲及其易混品的完整 ITS2 序列 BLAST 比对结果如表 2 所示。

2.6 聚类分析

用 ITS2 序列构建准噶尔铁线莲及其易混品的 NJ 系统进化树（图 2）。结果表明，不同来源 ITS2 序列被分为 2 大支 4 小支，其中 5 个批次准噶尔铁线莲的 ITS2 序列与 GenBank 核酸序列登录号 PV901466.1 和 KC415710.1 单独聚为 1 支，3 批威灵仙的 ITS2 序列与 KT602425.1 单独聚为 1 支，3 批黄花铁线莲的 ITS2 序列与 PV901462.1 单独聚为 1 支，2 批明铁线莲的 ITS2 序列与 PQ842604.1 单独



M—Trans 2K® DNA 相对分子质量标准；1—ZGE-1；2—ZGE-2；3—ZGE-3；4—ZGE-4；5—ZGE-5；6—HH-1；7—HH-2；8—HH-3；9—WLX-1；10—WLX-2；11—WLX-3；12—MTX-1；13—MTX-2。

图 1 准噶尔铁线莲及其易混品的 ITS2 PCR 产物琼脂糖电泳图

Fig.1 Agarose Gel Electrophoresis of ITS2 PCR Products from *C. songarica* Bunge and Its Adulterants

表 2　准噶尔铁线莲及其易混品 ITS2 序列多重比对结果

Tab.2　Results of Multiple Sequence Alignment of ITS2 Sequences from *C. songarica* Bunge and Its Adulterants

批号	百分比相似度 /%	期望值	NCBI GenBank 核酸序列登录号	基原鉴定
ZGE-1，ZGE-3 ～ ZGE-5	100	1×10^{-108}	PV901466.1、KC415710.1	准噶尔铁线莲
ZGE-2	99	7×10^{-107}	PV901466.1、KC415710.1	准噶尔铁线莲
HH-1 ～ HH-3	100	1×10^{-109}	PV901462.1	黄花铁线莲
WLX-1 ～ WLX-3	100	5×10^{-108}	KT602425.1	威灵仙
MTX-1 ～ MTX-2	100	2×10^{-112}	PQ842604.1	明铁线莲

聚为 1 支。通过 MEGA 6.0 软件计算得各支支持率均大于 80%。由此可见，构建的 NJ 系统进化树可用于准噶尔铁线莲及其易混品物种的鉴别。

2.7　种内与种间遗传距离分析

对准噶尔铁线莲（ZGE-1 ～ ZGE-5）及其易混品黄花铁线莲（HH-1 ～ HH-3）、威灵仙（WLX-1 ～ WLX-3）及明铁线莲（MTX-1 ～ MTX-2）进行种内和种间遗传距离分析。结果表明，准噶尔铁线莲（ZGE-1 ～ ZGE-5）与易混品黄花铁线莲（HH-1 ～ HH-3）、威灵仙（WLX-1 ～ WLX-3）、明铁线莲（MTX-1 ～ MTX-2）的种间遗传距离，远大于其种内遗传距离（表 3）。准噶尔铁线莲的平均种内遗传距离仅为 0.003 7，最大值为 0.004 9；而其与黄花铁线莲、威灵仙、明铁线莲的平均种间遗传距离分别为 0.055 2、0.025 4 和 0.048 4。通过比较各药材的种间遗传距离最小值与准噶尔铁线莲种内遗传距离最大值可见，准噶尔铁线莲与其易混品间存在明显的条形码间隔，即种间遗传距离的最小值（0.023 6）也远大于准噶尔铁线莲种内遗传距离的最大值（0.004 9），表明 ITS2 序列在物种水平上具有显著的遗传分化特性。此外，易混品种黄花铁线莲、威灵仙及明铁线莲的平均种内遗传距离分别为 0.003 1、0 和 0，显示出较高的种内遗传保守性，进一步验证了 ITS2 条形码对该类群具有稳定的物种鉴别能力。

2.8　ITS2 二级结构预测分析

准噶尔铁线莲及其易混品 ITS2 序列的二级结构预测结果如图 3 所示。这 4 种药材的 ITS2 二级结构均由 1 个中心环（主环）和 4 个螺旋区（Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ）组成。准噶尔铁线莲及其易混品 4 个螺旋区的茎环数目、大小、位置，以及螺旋发出时的角度均有明显差异。与黄花铁线莲相比，其螺旋臂Ⅰ中间的茎环更靠近中心环；与威灵仙和明铁线

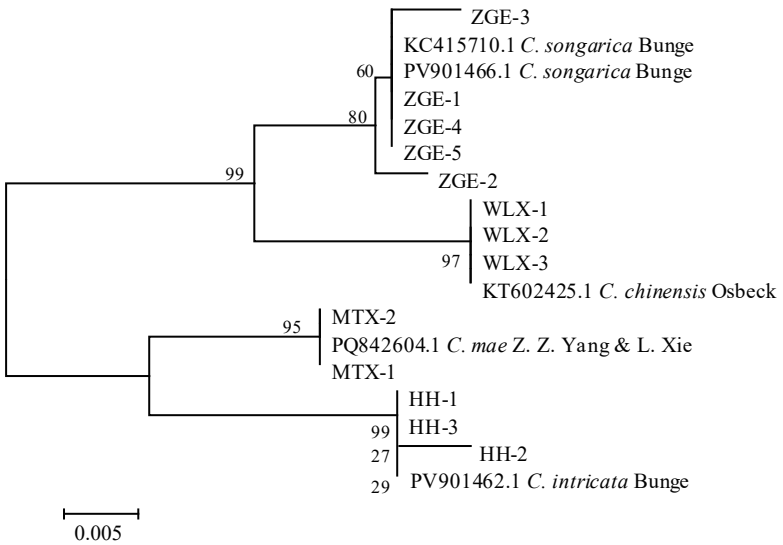


图 2　ITS2 序列构建的准噶尔铁线莲及其易混品的 NJ 系统进化树

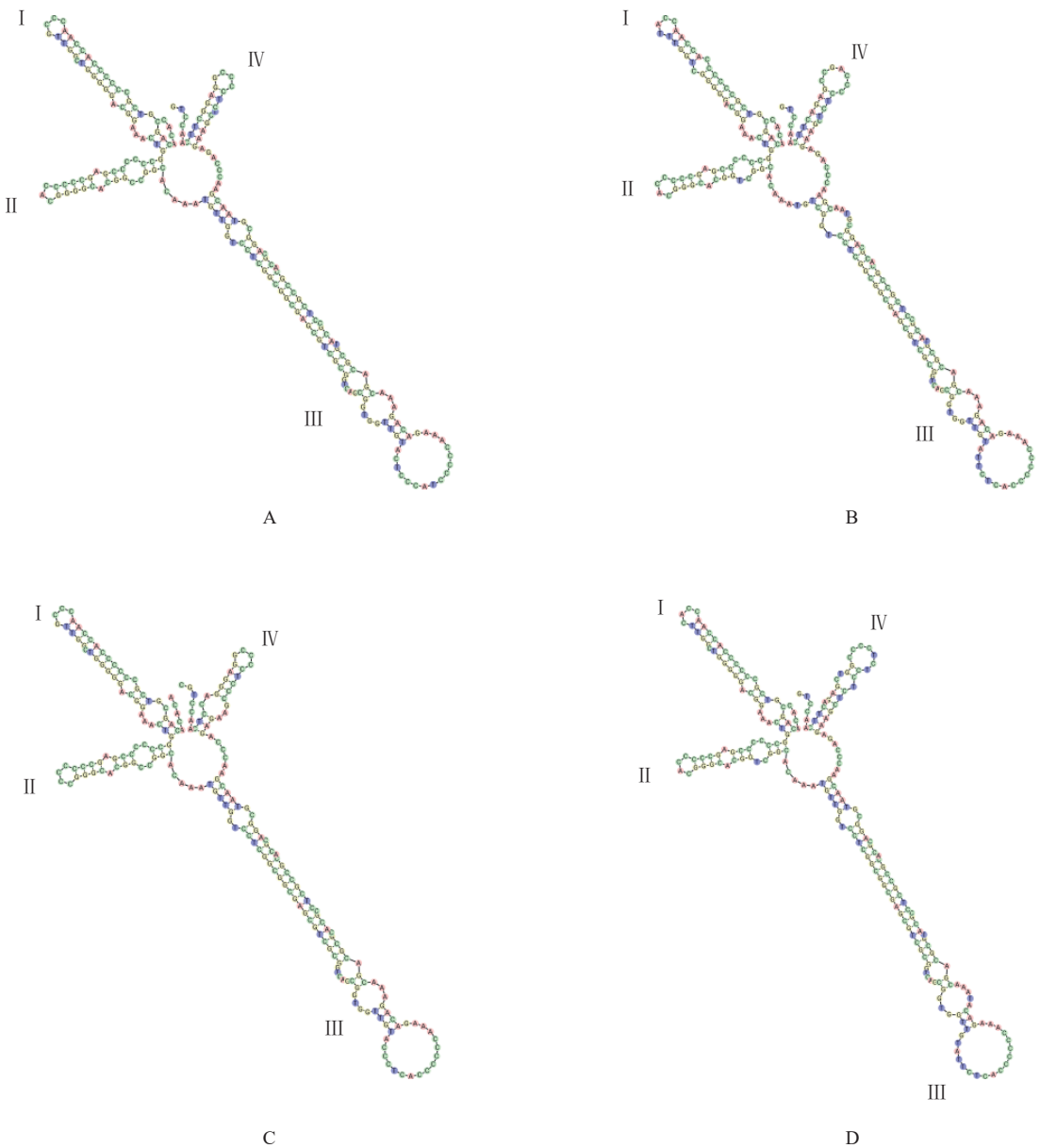
Fig.2　NJ Phylogenetic Tree of *C. songarica* Bunge and Its Adulterants Constructed Based on ITS2 Sequences

表 3 准噶尔铁线莲及其易混品的种内和种间遗传距离

Tab.3 Intra- and Inter-specific Genetic Distances of *C. songarica* Bunge and Its Adulterants

药材名称[1)]	种内遗传距离（$\bar{x}\pm s$）	药材名称	种间遗传距离[1)]
准噶尔铁线莲（ZGE-1 ～ ZGE-5，*n*=15）	0.003 7±0.001 2	准噶尔铁线莲和黄花铁线莲	0.055 2（0.052 4 ～ 0.058 1）
黄花铁线莲（HH-1 ～ HH-3，*n*=9）	0.003 1±0.000 8	准噶尔铁线莲和威灵仙	0.025 4（0.023 6 ～ 0.027 3）
威灵仙（WLX-1 ～ WLX-3，*n*=9）	0	准噶尔铁线莲和明铁线莲	0.048 4（0.046 0 ～ 0.050 9）
明铁线莲（MTX-1 ～ MTX-2，*n*=4）	0	—	—

注：[1)] 种间遗传距离为两两距离的算术平均值，括号中为遗传距离矩阵的最大值和最小值所构成的范围。



A—准噶尔铁线莲；B—黄花铁线莲；C—威灵仙；D—明铁线莲。

图 3 准噶尔铁线莲及其易混品 ITS2 序列的预测二级结构

Fig.3 Predicted Secondary Structure of ITS2 Sequences from *C. songarica* Bunge and Its Adulterants

莲相比，其螺旋臂Ⅳ中少了1个茎环。因此，通过ITS2序列的预测二级结构能鉴别准噶尔铁线莲及其混伪品，对其药材基原鉴定具有一定的参考价值。

3 讨论

传统中药鉴定多依靠性状、显微特征、理化性质，易受样品完整性、人员鉴定经验、成分差异等条件制约，并且在对近缘种、碎段及粉末状药材进行鉴定时，所得结果的准确性存在一定局限性[11-12]。ITS2序列作为药用植物鉴定的核心DNA条形码，扩增稳定性好[13]，适合劣变药材样本的检测。本研究采用ITS2测序完成了准噶尔铁线莲与黄花铁线莲、威灵仙、明铁线莲的分子鉴别。结果显示，4种植物ITS2核酸序列长度各不相同，分别为219、221、218、226 bp；所有样品序列在GenBank数据库中的比对相似度≥99%，确定样品基原准确；NJ系统发育树中4个物种各自形成独立支系，分支支持率均超80%，可清晰区分种间亲缘关系；遗传距离存在标准DNA条形码间隔，准噶尔铁线莲平均种内遗传距离为0.003 7，显著低于种间遗传距离0.025 4～0.055 2；4种药材ITS2序列的预测二级结构骨架一致，但螺旋区的茎环数量、大小、排布存在物种特异性差异，可作为可视化辅助鉴别的结构特征。

尽管如此，ITS2应用时仍应注意以下局限：种间与种内遗传变异可能存在重叠，形成“鉴定盲区”；ITS2序列在基因组中拷贝数较高，易受内生真菌等外源DNA干扰；试验过程中需严格控制DNA的提取与扩增条件；公共数据库中部分序列质量参差不齐，而缺乏凭证标本支撑的序列可能产生错误的鉴定结果。此外，单一ITS2条形码仅能实现物种基原鉴定，无法反映内部化学型或道地性差异，难以全面体现药材的药效质量特征。

本研究基于ITS2序列，结合序列比对、遗传距离计算、系统聚类分析及预测二级结构，成功建立了民族药材准噶尔铁线莲及其易混品的分子鉴定方法，有效弥补了传统鉴别方法应用于近缘种及破碎药材的不足，为该药材的质量控制与临床用药安全提供了可靠的科学依据。

参考文献：

[1] 吴思琪, 吕雅心, 胡怡婷, 等. 藏药铁线莲属植物化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国民间疗法, 2025, **33**(15): 94-101.

[2] 郭舒艳, 杨颖, 边媛, 等. 中国铁线莲属植物研究进展[J]. 农学学报, 2025, **15**(1): 57-67.

[3] 孟祥松, 王雨朦, 王孟虎, 等. 基于DNA条形码、特异性引物鉴定益母草及其易混淆品[J]. 中国现代应用药学, 2025, **42**(11): 1896-1907.

[4] 张金玲, 肖秋肖, 王倩, 等. 基于DNA条形码ITS序列的杜鹃兰与山慈菇其他基原药材及混伪品分子鉴定[J]. 中国中医药信息杂志, 2025, **32**(6): 142-146.

[5] Chen S L, Yin X M, Han J P, *et al*. DNA barcoding in herbal medicine: retrospective and prospective [J]. *J Pharm Anal*, 2023, **13**(5): 431-441.

[6] 张高曼, 赵立佳, 刘光富, 等. 基于ITS和ITS2序列的药用石斛DNA条形码鉴定研究[J]. 中草药, 2024, **55**(2): 575-587.

[7] Chen Z F, Zeng Q M, Gong M H, *et al*. DNA barcoding identification of *Angelicae Sinensis* radix and its adulterants based on internal transcribed spacer 2 region and secondary structure prediction [J]. *Genes* (Basel), 2025, **16**(11): 1333.

[8] Travadi T, Shah A P, Pandit R, *et al*. A combined approach of DNA metabarcoding collectively enhances the detection efficiency of medicinal plants in single and polyherbal formulations [J]. *Front Plant Sci*, 2023, **14**: 1169984.

[9] 穆威杉, 谢红波, 赵晴, 等. 基于ITS2序列的市售木通药材及其混伪品的分子鉴定12[J]. 中草药, 2022, **53**(7): 2108-2114.

[10] 满尔哈巴·海如拉, 程波, 地力努尔·吐尔逊江, 等. 雪菊ITS2序列鉴定及药材质量评价研究[J]. 药学学报, 2026, **61**(4): 1398-1407.

[11] 崔俊丽, 侯林. DNA条形码技术在中药领域的应用研究进展[J]. 现代中药研究与实践, 2024, **38**(1): 89-94.

[12] 李雨桐, 陈雪, 刘颖, 等. 以红花为例的中药材饮片掺杂增重“五位一体”综合鉴别体系的构建与应用研究[J]. 中国现代应用药学, 2026, **43**(2): 211-218.

[13] 刘安莉, 罗君, 于佳, 等. 基于ITS2序列的苗药金果榄及其混伪品分子鉴定[J]. 中国医药导报, 2025, **22**(28): 59-64.