

DOI:10.11937/bfyy.201517024

鸡血藤及其混伪品 *matK* 基因分析和分子鉴定

黄琼林¹, 马新业^{2,3}, 詹若挺^{2,3}, 陈蔚文^{2,3}

(1. 广东医学院, 广东 湛江 524023; 2. 广州中医药大学 中药资源科学与工程研究中心, 广东 广州 510006;
3. 岭南中药资源教育部重点实验室, 广东 广州 510006)

摘要:以鸡血藤及其 4 种常见混伪品为试材, 采用植物基因组 DNA 提取试剂盒提取鸡血藤样品总 DNA, 并采用 *matK* 基因通用引物扩增和测序, 从 GenBank 获取鸡血藤 4 种混伪品的 *matK* 基因序列, 采用 DNAMAN、MEGA 等生物软件比对分析序列差异, 计算遗传距离并构建聚类树, 研究 *matK* 基因对鸡血藤及其混伪品的鉴别效果。结果表明: 获得的鸡血藤及其混伪品 *matK* 序列长度为 690 bp, 平均 GC 含量为 31.1%, 共发现 236 个差异位点, 占总碱基数的 34.2%。8 个鸡血藤样品 *matK* 序列在 41 bp 处存在 A-G 碱基差异。鸡血藤与混伪品之间的种间变异大于鸡血藤样品内的变异。基于 *matK* 基因序列建立的聚类树能够明显地鉴别鸡血藤及其混伪品。*matK* 基因可作为鉴别鸡血藤及其混伪品的标准 DNA 序列。

关键词:鸡血藤; *matK* 基因; 序列分析; 分子鉴别; 混伪品

中图分类号:R 282.71 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)17-0094-05

DNA 条形码技术是利用一段短的标准 DNA 序列来实现物种的快速、准确鉴定的技术^[1]。与性状鉴别、显微鉴别和理化鉴别等传统的对中药鉴定方法相比, DNA 条形码技术以 DNA 遗传信息为鉴别标准, 不受药

材的形态特征、发育阶段、生长环境和炮制状态等因素所限制, 具有很好的特异性、可重复性和稳定性, 而且不需要鉴定人员长期经验积累。因此, DNA 条形码技术具有强大的中药材鉴别能力, 特别是在鉴别外观形状极其相似的近缘种药材上, 能够弥补传统鉴别方法的不足。应用于中药材鉴别的 DNA 条形码片段主要位于叶绿体 DNA 和核糖体 DNA 转录间隔区^[2]。*matK* 基因是叶绿体基因蛋白编码区中进化最快的基因之一, 其进化速率在 ITS2 与 *rbcL* 之间并且是 *rbcL* 基因的 3~4 倍, 具有易扩增、测序成功率高、序列容易比对和聚类结果可靠等优点, 已被公认为植物的核心 DNA 条形码^[3-4]。目前, *matK* 基因也已广泛应用于阳春砂^[5]、青天葵^[6]、

第一作者简介:黄琼林(1986-), 男, 博士, 讲师, 研究方向为分子生物学。E-mail: perfectq@163.com.

责任作者:陈蔚文(1950-), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向为创新中药研究与开发。E-mail: chenww@gzucm.edu.cn.

基金项目:广东省高等院校学科与专业建设专项资金资助项目(2013CXZDA011); 2014 年国家工信部中药材生产建设资助项目(工信厅消费函[2014]737 号); 广东医学院博士学位人员科研启动资助项目(B2013017)。

收稿日期:2015-05-28

hormone, additional different concentration, different sucrose concentration. It was discussed that shoot spex proliferation ability on five heterogeneous habitat distribution populations of wild almonds. The results showed that the most suitable medium seedling proliferations were 'Habahe': MS+6-BA 1.5 mg/L+IBA 0.1 mg/L+GA₃ 0.5 mg/L, 'Buerjin': MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L+GA₃ 0.5 mg/L, 'Tuoli': MS+6-BA 0.8 mg/L+IBA 0.2 mg/L+GA₃ 1.0 mg/L, 'Yumin': MS+6-BA 0.6 mg/L+IBA 0.2 mg/L+GA₃ 1.0 mg/L, 'Tacheng': MS+6-BA 1.0 mg/L+IBA 0.1 mg/L+GA₃ 0.5 mg/L. The optimum rooting culture medium of 'Habahe' whose proliferation was better was screened. The optimal rooting medium of 'Habahe' materials was 1/2MS+6-BA 0.04 mg/L+IBA 1.5 mg/L.

Keywords: *Prunus tenella*; heterogeneous habitat; rapid propagation; bud seedling; root

大黄^[7]等多种中药材的真伪鉴别、亲缘关系分析和系统发育探讨等方面的研究。

鸡血藤是南方地区常用中药,来源于豆科攀援木密花豆(*Spatholobus suberectus* Dunn.)的藤茎,能行血补血、调经和舒筋活络,治疗月经不调、痛经、风湿痹痛、手足麻木等症^[8]。市售的鸡血藤药材,除了药典收录的正品密花豆的藤茎外,还混淆有豆科香花崖豆藤(*Callerya cinerea*)、鱼藤(*Derris trifoliata*)和槭藤(*Entada phaseoloide*)以及大血藤科大血藤(*Sargentodoxa cuneata*)的藤茎,这些形态与鸡血藤很相似的混伪品的存在严重威胁着鸡血藤的临床用药安全和资源种质保护。目前,对鸡血藤类药材的鉴别,多以传统鉴别方法为主,但这不足以简便、准确地鉴别其真伪^[9]。因此,该研究应用 *matK* 基因鉴别鸡血藤及其常见混伪品,旨在从分子水平上为鸡血藤资源的可持续利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

鸡血藤新鲜植物采自广州中医药大学大学城校区药王山,干药材购自广东省湛江市各连锁药店,经广州中医药大学詹若挺研究员鉴定为豆科植物密花豆(*Spatholobus suberectus* Dunn.)及其干燥藤茎(表1)。鸡血藤混伪品的 *matK* 基因序列在 GenBank 数据库中获得(表2)。

表1 鸡血藤(*Spatholobus suberectus*)样品信息

编号	类型	来源/产地	序列登记号
1	植物	广州中医药大学药王山	KP 300028
2	植物	广州中医药大学药王山	KP 300029
3	药材	广西	KP 300030
4	药材	广西	KP 300031
5	药材	湖北	KP 300032
6	药材	湖北	KP 300033
7	药材	贵州	KP 300034
8	药材	贵州	KP 300035

表2 鸡血藤伪品 *matK* 基因序列

物种(学名)	序列登记号
香花崖豆藤(<i>Callerya cinerea</i>)	HG004938、KF294876
鱼藤(<i>Derris trifoliata</i>)	HM049528
槭藤(<i>Entada phaseoloide</i>)	EU328411、EU328412、EU328413、HM049539
大血藤(<i>Sargentodoxa cuneata</i>)	AJ966807、DQ401351、FJ626515、HG004956

植物基因组 DNA 提取试剂盒购自北京天根生物科技公司;PCR 试剂、Ex *Taq* DNA 聚合酶、DNA Markers、Loading buffer 均为日本 TAKARA 生物公司的产品;引物合成和测序由广州华大基因科技股份有限公司完成。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 提取 取 100 mg 植物叶片或 30 mg 干药材,叶片用剪刀剪成小片状、药材用铜盅砸碎成小细块后,置于研钵中,加入液氮快速研磨成细粉,按照植物基

因组 DNA 提取试剂盒的说明书提取样品的总 DNA。采用紫外分光光度法测定 DNA 溶液的浓度和纯度,并将 DNA 溶液稀释至 10 ng/ μ L,置于-20℃保存备用。

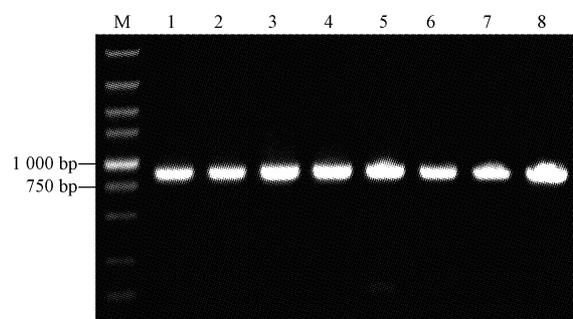
1.2.2 PCR 扩增 利用通用引物(上游:5'-CGTACAG-TACTTTTGTGTTTACGAG-3';下游:5'-ACCCATGC-CATCTGGAATCTTGGTTC-3')扩增鸡血藤样品的 *matK* 基因片段^[4]。PCR 反应体系包含 10×Ex *Taq* buffer 5 μ L、dNTPs (10 mmol/L) 3.0 μ L、上下游引物 (10 μ mol/L) 各 1.0 μ L、模板 DNA 5.0 μ L、Ex *Taq* DNA 聚合酶 (2.5 U/ μ L) 0.5 μ L,最后用灭菌蒸馏水补充至 50 μ L。PCR 反应程序为:94℃ 120 s;94℃ 30 s,52℃ 30 s,72℃ 60 s,32 个循环;72℃ 300 s。PCR 产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测确认后,送样切胶纯化并测序。

1.2.3 序列分析 利用 Codoncode Aligner 软件评估测得的序列的质量,采用 DNAMAN 6.0.40 和 Omega 2.0 软件进行序列拼接校对,去除序列两端的低质量区。将获得的 *matK* 基因片段序列进行 Blastn (Nucleotide Blast) 比对确认后,通过 Bankit 在线工具提交至 GenBank。采用 ClustalX 1.83 软件比对序列,基于 Kimura 2-Parameter 双参数模型和 Neighbor-Joining 邻接法,运用 MEGA 4.0 软件计算遗传距离并构建系统发育树(1 000 次重复 bootstrap 检验各分支的支持率)。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增

鸡血藤新鲜叶片和干药材的 DNA 提取效果不尽相同,干药材由于经过晒干等处理过程,DNA 降解严重,获得的 DNA 溶液浓度较低,约 10 ng/ μ L,而来源于新鲜叶片的 DNA 溶液浓度为 100 ng/ μ L。经过以等量 DNA 为模板进行 PCR 扩增,不同样品均获得约 800 bp 的目的产物,条带清晰明亮(图1)。将 PCR 产物纯化后测得的序列提交至 GneBank,序列登记号见表1。



注:M为DL 2 000 Marker;1~8为表1中1~8号样品。

图1 鸡血藤样品 *matK* 基因片段的 PCR 扩增

2.2 序列分析

将 19 条鸡血藤及其混伪品 *matK* 基因序列经比对后发现,序列长度均为 690 bp,GC 含量分布在 27.8%~

[1111111111	1111111111	1111111111	1111222222	2222222222	
[1111122223	3334444555	5677788889	0011122334	4455555666	6667777788	8899000111	1222234444	
[0134502573	4590148145	6006902457	4524802590	2714789013	5691567834	6768239467	8024798046	
<i>S.suberectus</i>	KP300034	CCCAACTATC	CACAGATCAA	AGGACACCAT	GCTTCGGCTG	AGTCAACCAT	TTTGTGAAGC	ACTGCAATAC	CATCAATAGT
<i>S.suberectus</i>	KP300035	
<i>S.suberectus</i>	KP300033	
<i>S.suberectus</i>	KP300032	
<i>S.suberectus</i>	KP300031	
<i>S.suberectus</i>	KP300030	
<i>S.suberectus</i>	KP300029	
<i>S.suberectus</i>	KP300028	
<i>D.trifoliata</i>	HM049528	
<i>C.cinerea</i>	HG004938	T.....G...	A..G.GC..G	A..CT..T..C	...T...A...	...G...A...	CG...T...G	C...C..G..	CCTG...G
<i>C.cinerea</i>	KF294876	T.....G...	A..G.GC..G	A..CT..T..C	...T...A...	...G...A...	CG...T...G	C...C..G..	CCTG...G
<i>E.phaseoloides</i>	EU328412	.TT..TA...	A..G.GCA.G	...TT..T..C	...T..T...	...CCAAT..	CC...CC..	..C...G..G	CCTG..C..A
<i>E.phaseoloides</i>	EU328413	.T...TA...	A..G.GCA.G	...TT..T..C	...T..T...	...CCAAT..	CC...CC..	..C...G..G	CCTG..C..A
<i>E.phaseoloides</i>	EU328411	.T...TA...	A..G.GCA.G	...TT..T..C	...T..T...	...CCAAT..	CC...CC..	..C...G..G	CCTG..C..A
<i>E.phaseoloides</i>	HM049539	.T...TA...	A..G.GCA.G	...TT..T..C	...T..T...	...CCAAT..	CC...CC..	..C...GCG.	CCTG..C..C
<i>S.cuneata</i>	AJ966807	...CC.AGGA	AG.T.GC.G	G..C.GT.GC	..GC.A..G.	.ACA.G.A.A	C.ATGA..CT	GTCTGGG.G	.TC.G.CGTC
<i>S.cuneata</i>	DQ401351	...CC.AGGA	AG.T.GC.G	G..C.GT.GC	..GC.A..G.	.ACA.G.A.A	C.ATGA..CT	GTCTGGG.G	.TC.G.CGTC
<i>S.cuneata</i>	FJ626515	...CC.AGGA	AG.T.GC.G	G..C.GT.GC	..GC.A..G.	.ACA.G.A.A	C.ATGA..CT	GTCTGGG.G	.TC.G.CGTC
<i>S.cuneata</i>	HG004956	...CC.AGGA	AG.T.GC.G	G..C.GT.GC	..GC.A..G.	.ACA.G.A.A	C.ATGA..CT	GTCTGGG.GT	.TC.G.CGTC
[2222222222	2222233333	3333333333	3333333333	3333344444	4444444444	4444444444	4444444444	
[4455566688	8889900000	0112223333	4455556666	6678800122	2333333444	4455555666	6677778889	
[7906802813	4683801238	9194570146	6947891345	6842909812	7012579012	3401569045	8913895680	
<i>S.suberectus</i>	KP300034	AATCGTTGGT	TTGGATATCT	GATAGTAAGA	ATAGAGATAT	TTAGCAGACT	GTGAAGATAG	GACCCGACGT	CAGTTATCTG
<i>S.suberectus</i>	KP300035	
<i>S.suberectus</i>	KP300033	
<i>S.suberectus</i>	KP300032	
<i>S.suberectus</i>	KP300031	
<i>S.suberectus</i>	KP300030	
<i>S.suberectus</i>	KP300029	
<i>S.suberectus</i>	KP300028	
<i>D.trifoliata</i>	HM049528	...TCG.A..	C...C...C	..C..A...C	..C...C...T	TT.....C	A.T.T.C..GC.
<i>C.cinerea</i>	HG004938	...TCG...C	...C...A	AC.G...G	..C...CC..	..G...A...	...T...G.CG.A.TCG..A
<i>C.cinerea</i>	KF294876	...TCG...C	...C...A	AC.G...G	..C...CC..	..G...A...	...T...G.CG.A.TCG..A
<i>E.phaseoloides</i>	EU328412	...CG..T..	C...C.AA.	.C.G..G..	TC.AG.C...	..GT..AG..	..CC.G.GG.C	AG..T.....	..A...G...
<i>E.phaseoloides</i>	EU328413	...CG..T..	C...C.AA.	.C.G..G..	TC.AG.C...	..GT..AG..	..CC.G.GG.C	AG..T.....	..A.A.G...
<i>E.phaseoloides</i>	EU328411	...CG..T..	C...CAA.	.C.G..G..	TC.AG.C...	..GT..AG..	..CC.G.GG.C	AG..T.....	..A...G...
<i>E.phaseoloides</i>	HM049539	...CG..T..	C...C.AA.	.C.G..G..	TC.AG.C...	..GT..AG..	..CC.G.GG.C	AG..T.....	..A...G...
<i>S.cuneata</i>	AJ966807	GGG.TGG.CA	.CTTCAG...	ACAT.C.GA.	CCG..A..CC	CCG..GC.AC	CCC.GAGGTC	TG.ACG.AA.	...G..CG..
<i>S.cuneata</i>	DQ401351	GGG.TGG.CA	.CTTCAG...	ACAT.C.GA.	CCG..A..CC	CCG..GC.AC	CCC.GAGGTC	TG.ACG.AA.	...G..CG..
<i>S.cuneata</i>	FJ626515	GGG.TGG.CA	.CTTCAG...	ACGT.C.GA.	CCG..A..CC	CCG..GC.AC	CCC.GAGGTC	TG.ACG.AA.	...G..CG..
<i>S.cuneata</i>	HG004956	GGG.TGG.CA	.CTTCAG...	ACGT.C.GA.	CCG..A..CC	CCG..GC.AC	CCC.GAGGTC	TG.ACG.AA.	..G..CG..
[4444555555	5555555555	5555555555	5555555555	5555666666	6666666666	6666666666	66666666	
[9999001111	1111222223	3334445566	6666778888	8999001112	2333344444	5555666777	888889	
[4567270123	4568145670	5671671312	3589450128	9018690672	4567834569	3467025268	024580	
<i>S.suberectus</i>	KP300034	AAAACAAAAC	GCGATTTGAA	CTGGTCTGA	AGAGATCCGA	TAATAAATGA	TGTATCCAAT	GGGTAATAAA	TGAAAA
<i>S.suberectus</i>	KP300035	
<i>S.suberectus</i>	KP300033	
<i>S.suberectus</i>	KP300032	
<i>S.suberectus</i>	KP300031	
<i>S.suberectus</i>	KP300030	
<i>S.suberectus</i>	KP300029	
<i>S.suberectus</i>	KP300028	
<i>D.trifoliata</i>	HM049528	T...T.G...	..A.G.CT.C	A.....A...	...T...A...A..	GTG.TC	AT.T.C.C.	A....
<i>C.cinerea</i>	HG004938	.T.....	.T.G..T.C	A...G...GA.A.	A..G..T...	...G.G.T.	AAAT.CT..	AAT..G
<i>C.cinerea</i>	KF294876	.T.....	.T.G..T.C	A...G...GA.A.	A..G..T...	...G.G.T.	AAAT.CT..	AAT..G
<i>E.phaseoloides</i>	EU328412	T.G...GC.T	T.CGGG.T.C	A.AA...G..	C.G.G.A.A.	A...G...C	...G..TT.	...T.C...	..CC..G
<i>E.phaseoloides</i>	EU328413	T.G...GC.T	T.CGGG.T.C	A.AA...G..	C.G.G.A.A.	A...G...C	...G..TT.	...T.C...	..CC..G
<i>E.phaseoloides</i>	EU328411	T.G...GC.T	T.CGGG.T.C	A.AA...G..	C.G.G.A.A.	A...G...C	...G..TT.	...T.C...	..CC..G
<i>E.phaseoloides</i>	HM049539	T.G...GG.T	T.CGGG.T.C	A.AA...G..	C.G.G.A.A.	A...GG...C	...G..TT.	...T.C...	..CC..G
<i>S.cuneata</i>	AJ966807	TGTG.G.GG.	TTTGGG.TGC	AC.AGTAGTG	.TG.GCATAG	AGT...GGCC	CAAGGGA.TC	T...TGC..G	GCCGGG
<i>S.cuneata</i>	DQ401351	TGTG.G.GG.	TTTGGG.TGC	AC.AGTAGTG	.TG.GCATAG	AGT...GGCC	CAAGGGA.TC	T...TGC..G	GCCGGG
<i>S.cuneata</i>	FJ626515	TGTG.G.GG.	TTTGGG.TGC	AC.AGTAGTG	.TG.GCATAG	AGT...GGCC	CAAGGGA.TC	T...TGC..G	GCCGGG
<i>S.cuneata</i>	HG004956	TGTG.G.GG.	TTTGGG.TGC	AC.AGTAGT.	.TG.GCATAG	AGT...GGCC	CAAGGGA.TC	T...TCC..G	GCCGGG

注:仅列出碱基变异位点,每行显示 80 个位点,各列上面竖列的数字表示碱基变异位点的顺序数;圆点表示该位点的碱基与第一行序列相同。

图 2 鸡血藤及其混伪品的 matK 基因序列多重比对和差异位点

36.3%范围内,平均 GC 含量为 31.1%。发现鸡血藤及其混伪品共存在 236 个变异位点,占碱基总数的 34.2%,其中鉴别信息位点 210 个。鸡血藤样品的 8 条 *matK* 序列中,仅在 41 bp 处,存在 1 处变异,植物样品为碱基 A,药材样品则为碱基 G(图 2)。

2.3 遗传距离分析

采用 MEGA 软件分析鸡血藤及其混伪品进行种间

表 3 基于 *matK* 基因的鸡血藤及其混伪品遗传距离

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1. <i>S. suberectus</i> KP300034																			
2. <i>S. suberectus</i> KP300035	0.000																		
3. <i>S. suberectus</i> KP300033	0.000	0.000																	
4. <i>S. suberectus</i> KP300032	0.000	0.000	0.000																
5. <i>S. suberectus</i> KP300031	0.000	0.000	0.000	0.000															
6. <i>S. suberectus</i> KP300030	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000														
7. <i>S. suberectus</i> KP300029	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001													
8. <i>S. suberectus</i> KP300028	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001												
9. <i>D. trifoliata</i> HM049528	0.114	0.114	0.114	0.114	0.114	0.114	0.116	0.116											
10. <i>C. cinerea</i> HG004938	0.123	0.123	0.123	0.123	0.123	0.123	0.125	0.125	0.114										
11. <i>C. cinerea</i> KF294876	0.123	0.123	0.123	0.123	0.123	0.123	0.125	0.125	0.114	0.000									
12. <i>E. phaseoloides</i> EU328412	0.155	0.155	0.155	0.155	0.155	0.155	0.156	0.156	0.148	0.128	0.128								
13. <i>E. phaseoloides</i> EU328413	0.154	0.154	0.154	0.154	0.154	0.154	0.156	0.156	0.148	0.128	0.128	0.003							
14. <i>E. phaseoloides</i> EU328411	0.154	0.154	0.154	0.154	0.154	0.154	0.156	0.156	0.148	0.128	0.128	0.003	0.003						
15. <i>E. phaseoloides</i> HM049539	0.156	0.156	0.156	0.156	0.156	0.156	0.158	0.158	0.153	0.130	0.130	0.010	0.010	0.010					
16. <i>S. cuneata</i> AJ966807	0.286	0.286	0.286	0.286	0.286	0.286	0.288	0.288	0.299	0.258	0.258	0.248	0.247	0.245	0.248				
17. <i>S. cuneata</i> DQ401351	0.286	0.286	0.286	0.286	0.286	0.286	0.288	0.288	0.299	0.258	0.258	0.248	0.247	0.245	0.248	0.000			
18. <i>S. cuneata</i> FJ626515	0.286	0.286	0.286	0.286	0.286	0.286	0.288	0.288	0.299	0.258	0.258	0.248	0.247	0.245	0.248	0.001	0.001		
19. <i>S. cuneata</i> HG004956	0.288	0.288	0.288	0.288	0.288	0.288	0.291	0.291	0.301	0.264	0.264	0.250	0.249	0.247	0.250	0.007	0.007	0.006	

2.4 聚类分析

以鸡血藤及其 4 种混伪品的 19 条 *matK* 基因序列构建聚类树,由图 3 可知,鸡血藤的 2 个植物样品首先聚在一起,然后与 6 个药材样品聚成一小支,鸡血藤样品再与同为豆科来源的鱼藤、香花崖豆藤和榼藤等亲缘关系较近的伪品聚成一支;大血藤科的大血藤则单独成另外一个分支。聚类树能直观地反映出鸡血藤与混伪品的 *matK* 序列差异,表明 *matK* 基因能有效地鉴别鸡血藤及其混伪品。

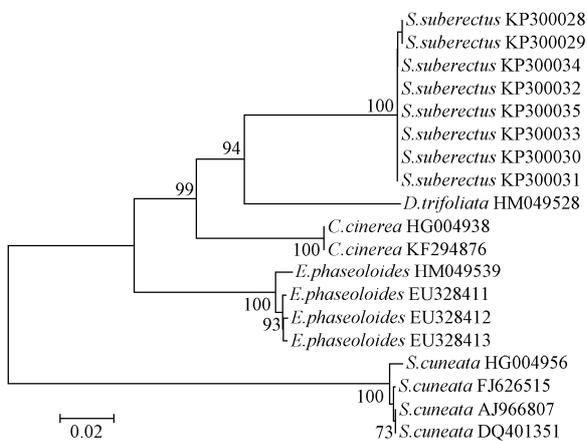


图 3 基于 *matK* 基因构建的鸡血藤及其混伪品聚类树

及种内遗传距离,如表 3 所示,所有样品间的平均遗传距离为 0.153。鸡血藤的不同样品间有 1 处变异,最大种内遗传距离为 0.001。在鸡血藤与混伪品之间,鸡血藤与同为豆科的香花崖豆藤的遗传距离最小,为 0.114,与大血藤科的大血藤的遗传距离最大,达到 0.288。遗传距离分析结果说明鸡血藤与混伪品之间的变异大于鸡血藤样品内的个体变异。

3 讨论

利用 DNA 序列鉴别鸡血藤类药材的研究曾有报道,安冉等^[9]采用核糖体 DNA 区域 26S rDNA D1-D3 序列鉴别鸡血藤及其混淆品,但该区域变异程度较小,仅为 5.86%(41/700 bp),不适合更广泛样品的鉴别,而且聚类结果与传统分类并不完全一致。该研究分析鸡血藤及其混伪品的叶绿体 *matK* 基因序列,在 690 bp 序列中共发现 236 个差异位点,其中鸡血藤与同科的混伪品也存在 154 个变异位点,同科物种的变异率达到 22.32%,种间遗传距离也远大于种内遗传距离,表明 *matK* 基因具有丰富的碱基差异来鉴别鸡血藤及其混伪品。基于 *matK* 基因构建的聚类树也准确地反映了鸡血藤及其混伪品之间的亲缘关系和序列差异。

提取到高质量 DNA 是干药材 DNA 条形码研究的关键前提。与新鲜的植物组织相比,干药材由于存储时间久和经过干燥等炮制处理,DNA 严重降解、断裂,导致其中 DNA 含量和质量均较低。该研究采用商业通用试剂盒即可提取到满足 *matK* 基因扩增和测序的鸡血藤药材 DNA,事先也未对药材样品进行特殊处理,说明 *matK* 基因对 DNA 模板要求较低,容易 PCR 扩增和获取序列,具有较好的通用性。试验中也曾尝试利用上述鸡血藤干药材 DNA 扩增 ITS2 条形码片段,虽然获得单一清

晰的 PCR 产物,但由于测序时出现结合问题,即从峰图起始端出现不规则的“套峰”,多次重复试验依然无法取得质量合格的 ITS2 序列,造成这一现象可能是由于 ITS 在核基因中有多个拷贝^[10]。

虽然,陈士林等^[11-12]推荐进化速率快于 *matK* 的 ITS2 作为中药的通用 DNA 条形码,但在该研究中发现,*matK* 基因在对鸡血藤药材样品的鉴定试验上比 ITS2 更有优势,试验更具有可操作性,测序方便,序列在种内具有良好的稳定性,在种间又有足够的序列差异来鉴别鸡血藤及其混伪品,因此,*matK* 基因可作为鸡血藤真伪鉴别潜在的标准 DNA 序列。

该研究建立的基于 *matK* 基因的鸡血藤及其混伪品 DNA 条形码鉴定方法,可为鸡血藤的资源保护和用药安全提供科学保障。

参考文献

- [1] HEBERT P D N,GREGORY T R. The promise of DNA barcoding for taxonomy [J]. *Syst Biol*,2005,54(5):852-859.
 [2] 黄琼林,梁凌玲,何瑞,等. 应用 *matK* 基因鉴别青天葵及其常见混伪品[J]. *广西植物*,2014,34(3):299-303.
 [3] HILU K W,BORSCH T,MÜLLER K,et al. Angiosperm phylogeny based on *matK* sequence information[J]. *Amer J Bot*,2003,90(12):1758-

1776.

- [4] HOLLINGSWORTH P M, FORREST L L, SPOUGE J L, et al. A DNA barcode for land plants[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,2009,106(31):12794-12797.
 [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京:人民卫生出版社,2010:134.
 [6] HUANG Q,DUAN Z,YANG J,et al. SNP typing for germplasm identification of *Amomum villosum* Lour. based on DNA barcoding markers [J]. *PLoS ONE*,2014,9(12):e114940.
 [7] HUANG Q,LIANG L,HE R,et al. Applying DNA barcodes to identify *Nervilia fordii* and six congeneric species [J]. *Plant Omics*,2013,6(5):325-332.
 [8] 张晓芹,刘春生,闫兴丽,等. 多基原药材大黄叶绿体 *matK* 基因序列分析及鉴定研究[J]. *药学报*,2013,48(11):1722-1728.
 [9] 安冉,杨锦芬,刘军民,等. 基于 26S rDNA D1-D3 区序列分析的鸡血藤及其混伪品的分子鉴别[J]. *广州中医药大学学报*,2010,27(3):403-406.
 [10] 罗焜,马培,姚辉,等. 中药 DNA 条形码鉴定中的 DNA 提取方法研究[J]. *世界科学技术-中医药现代化*,2012,14(2):1433-1439.
 [11] 陈士林. 中药 DNA 条形码分子鉴定[M]. 北京:人民卫生出版社,2012.
 [12] 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*,2012,7(5):e8613.

Comparative Analysis and Molecular Identification of *matK* Gene From *Spatholobus suberectus* and Its Adulterants

HUANG Qionglin¹, MA Xinye^{2,3}, ZHAN Ruoting^{2,3}, CHEN Weiwen^{2,3}

(1. Guangdong Medical University, Zhanjiang, Guangdong 524023; 2. Research Center of Chinese Medicinal Resource Science and Engineering, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510006; 3. Key Laboratory of Chinese Medicinal Resource from Lingnan, Ministry of Education, Guangzhou, Guangdong 510006)

Abstract: In order to investigate the efficiency of *matK* gene on identifying *Spatholobus suberectus* and its adulterants, *S. suberectus* and four common adulterants were used as materials in this study. Genomic DNA was isolated from fresh leaves and dry materials of *S. suberectus*, and *matK* gene was amplified and sequenced using a pair of universal primers. *matK* sequences of the adulterants were downloaded from GenBank database. The sequences were aligned and analyzed to find the difference and then genetic distance were calculated and the clustering tree was constructed using biological software. The results revealed that *matK* sequences acquired from *S. suberectus* and its adulterants contained 690 base pairs with an average GC content of 31.1%. The maximal intraspecific distances among *S. suberectus* were 0.001, whereas the interspecific distance between *S. suberectus* and its adulterants ranged from 0.114 to 0.288. The clustering tree based on *matK* sequences can intuitively discriminate *S. suberectus* and its adulterants. *matK* gene can be used as a standard DNA sequence to distinguish *Spatholobus suberectus* and its adulterants.

Keywords: *Spatholobus suberectus* Dunn.; *matK* gene; sequence analysis; molecular identification; adulterants