

黄琼林,马新业,詹若挺,等. 基于 *rbcL* 条形码的鸡血藤真伪鉴别[J]. 江苏农业科学,2016,44(6):57-60.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.06.013

基于 *rbcL* 条形码的鸡血藤真伪鉴别

黄琼林¹, 马新业², 詹若挺², 陈蔚文²

(1. 广东医科大学, 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/岭南中药资源教育部重点实验室, 广东广州 510006)

摘要:为了建立鸡血藤基于 *rbcL* 基因的 DNA 条形码鉴别体系,为其资源保护和用药安全提供分子依据,采用商业试剂盒提取鸡血藤样品的基因组 DNA,以及 *rbcL* 通用引物进行 PCR 扩增和测序;并从 GenBank 数据库获取鸡血藤混伪品的 *rbcL* 基因序列。采用 DNAMAN、ClustalX 软件进行序列比对分析,MEGA 5.1 软件构建系统发生树。结果表明:获取的鸡血藤及其混伪品 *rbcL* 序列均为 498 bp,GC 含量分布在 40.0%~44.4% 间,存在 64 处变异,种间遗传距离远远大于种内遗传距离。基于 *rbcL* 基因的系统发生树能很好地区分鸡血藤及其混伪品。因此,*rbcL* 基因可用作鸡血藤及其混伪品鉴别的 DNA 序列。

关键词:鸡血藤;*rbcL* 条形码;鉴别;混伪品

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)06-0057-03

鸡血藤为中国常用大宗药材,主产于广东、广西,味苦甘、性温,具有补血活血、祛风通络之功效,用于治疗月经不调、血虚萎黄、麻木瘫痪、风湿痹痛等病症^[1]。《中华人民共和国药典》所载的鸡血藤药材为豆科植物密花豆 (*Spatholobus suberectus* Dunn.) 的干燥藤茎,但在市场流通过程中,大血藤 (*Sargentodoxa cuneata*)、香花崖豆藤 (*Callerya cinerea*)、鱼藤 (*Derris trifoliata*)、槭藤 (*Entada phaseoloides*) 等多种植物的藤茎被混淆为鸡血藤药材。这些混伪品的成分和功效与鸡血藤均存在差异,严重影响了鸡血藤的临床用药安全及其资源的可持续性利用。因此,有必要建立鸡血藤及其常见混伪品的有效鉴别体系。

DNA 条形码是指利用一段短的标准 DNA 序列来实现物种的快速、准确鉴别^[2]。2012 年,国家药典委颁布了《中药材 DNA 条形码分子鉴定指导原则》,新版药典或将新增 DNA 条形码鉴定,表明 DNA 条形码具有良好的推广和应用价值。应用于中药材鉴别的推荐 DNA 条形码片段主要位于叶绿体 DNA、核糖体 DNA 转录间隔区。*rbcL* 基因编码 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶大亚基,位于叶绿体 DNA 的大单拷贝区,是植物分子系统学研究中应用最普遍的基因之一^[3-5]。*rbcL* 基因目前已被用于青天葵^[6]、十大功劳^[7]、溪黄草^[8]等中药的真伪鉴别,但尚未见其应用于鸡血藤及其混伪品的快速鉴别。因此,本研究分析鸡血藤与 4 种常见混伪品的 *rbcL* 基因序列差异,为鸡血藤的真伪鉴别和临床用药提供分子依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

鸡血藤及其混伪品的 *rbcL* 基因序列来源于植物样品或 GenBank 数据库(表 1)。鸡血藤样品包括植物叶片和干药材,植物叶片采自广州中医药大学城校区药王山,药材购自广东省湛江市连锁药店,均经广州中医药大学鉴定为豆科植物密花豆。以鸡血藤混伪品的拉丁学名为主题词,从 NCBI(National Center for Biotechnology Information)的 GenBank 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)下载相应物种的 *rbcL* 基因序列。

植物基因组 DNA 提取试剂盒购自北京天根生物科技有限公司;Ex Taq、10 × Ex Taq buffer、dNTPs、DL2000 marker 等 PCR 试剂购自宝生物工程(大连)有限公司;其他试剂均为分析纯。引物合成和测序由北京六合华大基因科技股份有限公司广州分公司完成。

1.2 DNA 提取

称取 100 mg 鸡血藤叶片或 30 mg 药材,用无水乙醇擦拭表面,叶片用剪刀剪成小片状或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粉末,参照植物基因组 DNA 提取试剂盒的说明书提取总 DNA,并适当延长药材样品在提取液中的残解和温育时间。

1.3 PCR 扩增

用于扩增 *rbcL* 基因的引物为 *rbcLa*-F(5'-ATGTCAC-CACAAACAGAG ACTAAAGC-3')、*rbcLa*-R(5'-GTA-AAATCAAGTCCACCRGC-3'),其中简并碱基 R=A/G。PCR 反应体系包括 5 μL 10 × Ex Taq buffer、3.0 μL dNTP(10 mmol/L)、各 1.0 μL 正反向引物(10 μmol/L)、50 ng 模板 DNA、0.5 μL Ex Taq DNA 聚合酶(2.5 U/μL),并用灭菌蒸馏水补至 50 μL。PCR 反应程序为:94 ℃ 3 min;94 ℃ 0.5 min,55 ℃ 0.5 min,72 ℃ 1.0 min,32 个循环;72 ℃ 5 min。目的产物经 0.8% 琼脂糖电泳检测确定,送样纯化并用上下游引物进行双向测序。

收稿日期:2015-05-14

基金项目:广东省高等院校学科与专业建设专项资金(编号:2013CXZDA011);国家工信部中药材生产建设项目(编号:[2014]737号);广东省自然科学基金博士启动项目(编号:2015A030310519)。

作者简介:黄琼林(1986—),男,广东湛江人,博士,讲师,主要从事分子生物学研究。E-mail:perfecthql@163.com。

通信作者:陈蔚文,博士,教授,主要从事创新中药开发与研究。E-mail:chenww@gzucm.edu.cn。

表 1 样品信息

物种	类型	来源/产地	样本数(个)	<i>rbcL</i> 序列登记号
鸡血藤(<i>Spatholobus suberectus</i>)	植物	广州中医药大学药王山	3	KP202394、KP202395、KP202396
鸡血藤(<i>Spatholobus suberectus</i>)	药材	广西	2	KP313861、KP313862
鸡血藤(<i>Spatholobus suberectus</i>)	药材	湖北	2	KP313863、KP313864
鸡血藤(<i>Spatholobus suberectus</i>)	药材	贵州	2	KP313865、KP313866
大血藤(<i>Sargentodoxa cuneata</i>)		GenBank		KF181529、FJ626605、AF093731
香花崖豆藤(<i>Callerya cinerea</i>)		GenBank		GQ436360
鱼藤(<i>Derris trifoliata</i>)		GenBank		KF496391
槭藤(<i>Entada phaseoloides</i>)		GenBank		JF738904、KF496514

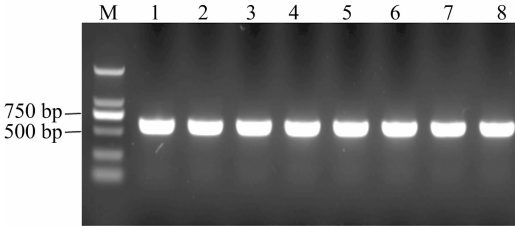
1.4 序列分析

将测得的 *rbcL* 序列导入 DNAMAN 6.0 软件进行拼接和校对,去掉 5' 和 3' 端的低可信区序列。将拼接序列进行 Blastn(Nucleotide Blast) 比对确认后,运用 Bankit 软件提交至 GenBank 数据库,获取序列登记号。采用 ClustalX 1.83 软件进行序列多重比对,并基于 Kimura 2 - Parameter(K2P) 双参数和 Neighbor - Joining(NJ) 邻接法,利用 MEGA 5.1 软件计算鸡血藤及其混伪品的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 DNA 提取和 PCR 扩增

不同鸡血藤样品的 DNA 提取效果不尽相同,叶片样品 DNA 经电泳检测后条带较为清晰,浓度为 80 ng/mL;鸡血藤药材 DNA 条带则呈弥散状态,说明药材 DNA 存在较为明显的降解和断裂。取 50 ng 上述鸡血藤 DNA 为模板进行 PCR 扩增,均获得约 600 bp 的 *rbcL* 基因片段(图 1),目的产物条带清晰,符合预期结果。取 30 μL PCR 产物送样,进行纯化以及双向测序,并将序列提交到 GenBank,序列登记号见表 1。



M—DL2000; 1~2—鸡血藤(药王山); 3~4—鸡血藤(广西); 5~6—鸡血藤(湖北); 7~8—鸡血藤(贵州)

图1 鸡血藤 *rbcL* 基因片段的 PCR 扩增结果

2.2 序列差异分析

经过序列多重比对分析,本研究获得鸡血藤及其混伪品 *rbcL* 序列共 16 条,长度均为 498 bp,GC 含量分布范围为 40.0% ~ 44.4%(图 2)。鸡血藤不同叶片和药材样品的 *rbcL* 序列完全一致,鸡血藤及其混伪品之间存在 64 个差异位点,表明鸡血藤及其混伪品的 *rbcL* 基因存在着较大程度的变异。

2.3 遗传距离分析

基于 K2P 模型计算的供试样品间遗传距离见表 2。鸡血藤种内不同个体的遗传距离为 0.000,种内没有存在变异。

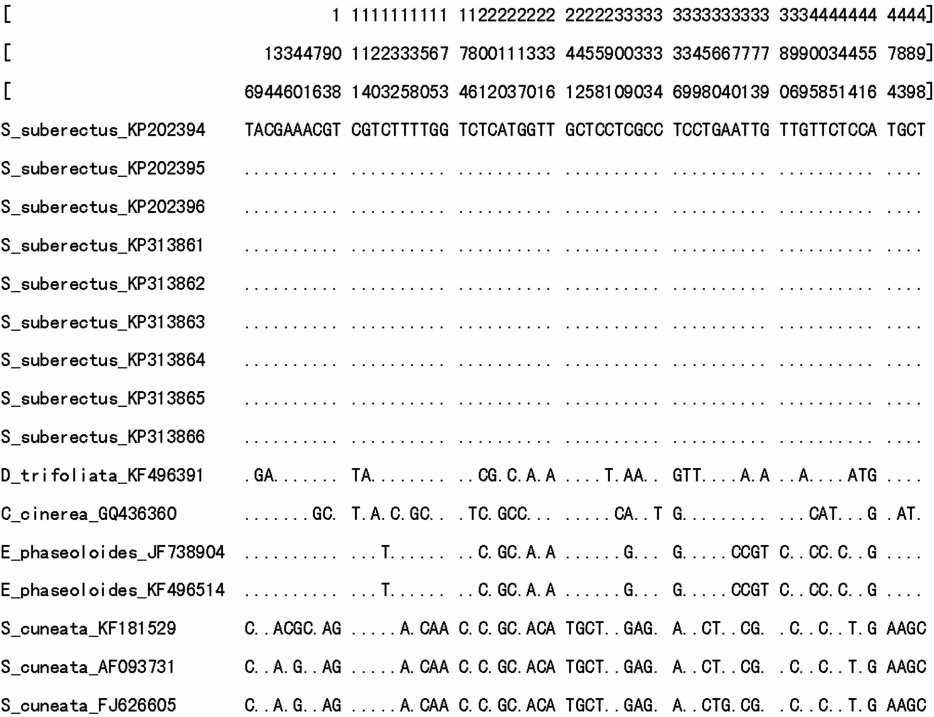


图2 鸡血藤及其混伪品 *rbcL* 序列的变异位点

表 2 鸡血藤及其混伪品的 K2P 遗传距离

样品	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1(<i>S. suberectus</i> KP202394)																
2(<i>S. suberectus</i> KP202395)	0.000															
3(<i>S. suberectus</i> KP202396)	0.000	0.000														
4(<i>S. suberectus</i> KP313861)	0.000	0.000	0.000													
5(<i>S. suberectus</i> KP313862)	0.000	0.000	0.000	0.000												
6(<i>S. suberectus</i> KP313863)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000											
7(<i>S. suberectus</i> KP313864)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000										
8(<i>S. suberectus</i> KP313865)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000									
9(<i>S. suberectus</i> KP313866)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000								
10(<i>C. cinerea</i> GQ436360)	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044	0.044	0.000							
11(<i>D. trifoliata</i> KF496391)	0.046	0.046	0.046	0.046	0.046	0.046	0.046	0.046	0.046	0.065						
12(<i>E. phaseoloides</i> JF738904)	0.035	0.035	0.035	0.035	0.035	0.035	0.035	0.035	0.035	0.052	0.047					
13(<i>E. phaseoloides</i> KF496514)	0.035	0.035	0.035	0.035	0.035	0.035	0.035	0.035	0.035	0.052	0.047	0.000				
14(<i>S. cuneata</i> KF181529)	0.081	0.081	0.081	0.081	0.081	0.081	0.081	0.081	0.081	0.092	0.092	0.072	0.072			
15(<i>S. cuneata</i> FJ626605)	0.077	0.077	0.077	0.077	0.077	0.077	0.077	0.077	0.077	0.088	0.088	0.068	0.068	0.004		
16(<i>S. cuneata</i> AF093731)	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.090	0.090	0.070	0.070	0.006	0.002	

在不同物种之间,鸡血藤与大血藤的种间遗传距离最大,为 0.081;与香花崖豆藤种间遗传距离最小,为 0.044。鸡血藤与混伪品的种间距离远大于鸡血藤的种内距离,表明在 *rbcL* 基因中有足够的差异鉴别鸡血藤及其混伪品。

2.4 聚类分析

以 *rbcL* 序列构建的鸡血藤及其混伪品的系统发生树见图 3,16 个样品聚成 2 个主分支。不同个体的鸡血藤先聚成

1 个小分支,然后再与同科的香花崖豆藤、鱼藤和槭藤聚成 1 支;本通科的大血藤则单独成为 1 支,系统发生树聚类结果与传统分类学相符合。各分支的 bootstrap 支持率均在 70% 以上,具有较好的单系性。基于 *rbcL* 基因建立的鸡血藤及其混伪品系统发生树鉴别效果良好,表明 *rbcL* 基因可作为鉴别鸡血藤及其混伪品的 DNA 标准序列。

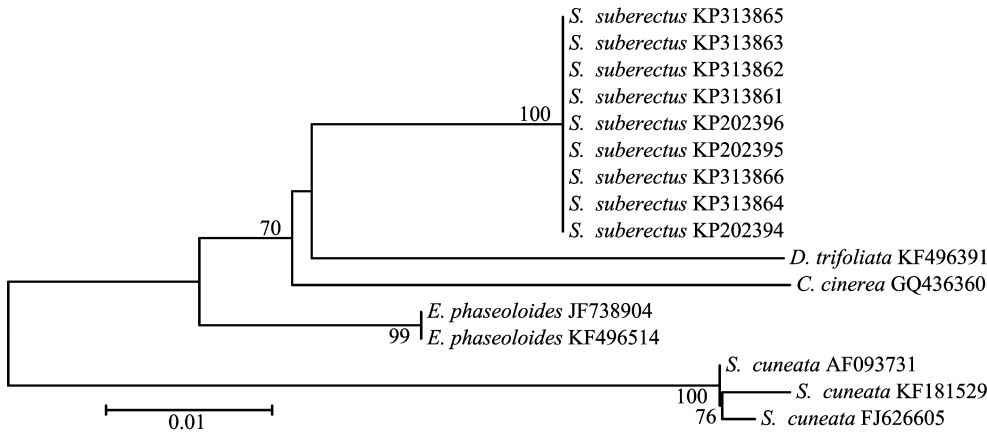


图3 基于 *rbcL* 序列的鸡血藤及其混伪品的系统发生树

3 讨论

对于鸡血藤及其混伪品的鉴定,相关报道主要是采取性状鉴别^[9]、显微鉴别^[10]、理化鉴别^[11]等传统方法,但这些方法的鉴定标识在生物学上增多为物种的遗传表现型,不仅受到遗传因素的影响,还与物种的发育阶段、生长环境以及人类活动如引种、炮制等有密切的关系,而且鉴别人员需有专业的知识背景,主观性强,重复性和稳定性差。翟明等也曾用 RAPD 分子标记鉴别鸡血藤及常见混伪品^[12],但 RAPD 鉴别物种需要多条引物,操作复杂,而且试验结果的重复性容易受 PCR 试剂用量等多种因素的影响。

近年来,DNA 条形码技术已被公认为中药材鉴定的有效手段,它以遗传信息 DNA 为鉴定依据,鉴别特征不因物种所

处的发育阶段和药材的状态影响,具有很好的可重复性和稳定性。只需 1 个或少数几个基因片段就可以完成绝大多数物种的鉴定,试验过程标准化,容易实现物种鉴定的自动化。DNA 序列可以通过互联网和信息平台进行收集和共享,任何人都可以用来鉴定物种^[13]。作为植物 DNA 条形码的热门片段之一,*rbcL* 基因具有通用性好、易 PCR 扩增和序列比对等优点,在种属水平有良好的鉴别效果^[14]。本研究中,采用 1 对通用引物进行 PCR 扩增,仅需 1 次试验就可以成功扩增目的片段,简单快捷,并且测得序列在不同的鸡血藤样品中也有很好的重复性和稳定性。在鸡血藤与混伪品的 496 bp 序列中,存在变异碱基 64 个,变异程度达 12.9%,种间变异程度也远大于种内变异程度。*rbcL* 基因有足够的差异区别鸡血藤及其混伪品,基于 *rbcL* 基因的系统发生树也能直观地证实这

吴秀林,丁炜东,曹哲明,等. 环境因子对黄鳝 *DMRT* 基因甲基化的影响[J]. 江苏农业科学,2016,44(6):60-63.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.06.014

环境因子对黄鳝 *DMRT* 基因甲基化的影响

吴秀林¹, 丁炜东^{1,2}, 曹哲明^{1,2}, 刘旭^{1,2}, 邴旭文^{1,2}

(1. 南京农业大学无锡渔业学院, 江苏无锡 214182; 2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 江苏无锡 214081)

摘要: DNA 甲基化是一种重要的 DNA 修饰方式, 它能在不改变 DNA 一级结构的情况下调控基因的表达, 能够维持正常的细胞功能, 在胚胎发育、遗传印记中起重要作用。以黄鳝为对象, 采用限制性内切酶-PCR 检测特定 DNA 片段是否发生甲基化的方法, 研究不同温度、pH 值、光照周期条件下 *DMRT* 基因在各组织中的甲基化差异。用甲基化敏感的限制性内切酶 *Hpa* II 酶切黄鳝的性腺、肾、脾、肝、肠等 5 个组织, 根据已知的 *DMRT2*、*DMRT3*、*DMRT4* 基因序列设计特异的引物扩增酶切产物, 并设置未酶切对照组, 用 1% 琼脂糖检测, 分析差异条带, 若未酶切组泳道出现条带, 酶切组泳道也出现条带则判定为阳性结果, 否则判定为阴性结果。结果表明: 不同生态因子条件下, 在 5 个组织中 *DMRT2* - FR2 扩增序列中的位点均表现为阳性结果; *DMRT3* - FR2、*DMRT4* - FR2、*DMRT4* - FR3 扩增序列中的位点均表现为阴性结果, 说明这 4 个序列中位点的甲基化状态非常稳定, 环境因子的小幅变化对其影响不大。

关键词: 黄鳝; 温度; 光照; 甲基化

中图分类号: S966.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)06-0060-04

黄鳝 (*Monopterus albus*) 是重要的淡水经济鱼类, 隶属硬骨鱼纲辐鳍亚纲合鳃目合鳃科黄鳝属, 其肉质细嫩、营养丰富, 具有较高的食用价值、药用价值。黄鳝多生活在河道、湖

泊、沟塘等水体中, 我国的珠江流域、长江流域盛产黄鳝。泰国、印度尼西亚等国也有黄鳝分布^[1]。研究发现, 黄鳝繁殖比较特殊, 具性逆转现象, 一般经历雌性发育阶段—间性发育阶段—雄性发育阶段, 这种独特的生理现象使得黄鳝成为研究探讨鱼类性别控制机理的极好材料^[2]。*DMRT* 基因家族成员的典型特征是具有一个保守的 DM 结构域, DM 是一个靠特殊的锌指结构连接 DNA 的结构域, 通过调节目的基因转录参与发育调节过程^[3]。目前, 已在多种鱼类体内检测到 *DMRT* 家族基因^[4]。*DMRT* 基因普遍被认为与性别分化有关, 如 *DMRT1*、*DMRT2*、*DMRT3* 与雄性性别分化密切相关, 对精巢正常发育有重要作用。Kim 等研究发现, 小鼠 *DMRT3* 参

收稿日期: 2015-04-30

基金项目: 江苏省科技支撑计划 (编号: BE2013315); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (编号: 2015JBFM06); 江苏省自然科学基金 (编号: BK2011184)。

作者简介: 吴秀林 (1990—), 女, 重庆人, 硕士研究生, 主要从事水产动物遗传育种研究。E-mail: 764859546@qq.com。

通信作者: 邴旭文, 研究员, 主要从事特种水产养殖与育种研究。E-mail: bingxw@ffrc.cn。

一结论。

本研究采用 DNA 条形码技术分析鸡血藤及其混伪品的 *rbcl* 基因, 序列中存在着多处鉴别位点, 基于 *rbcl* 基因构建的系统发生树可直观地鉴别鸡血藤及 4 种混伪品, 为其资源保护和临床用药安全提供了一定的保障。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 134.
- [2] Hebert P, Gregory T R. The promise of DNA barcoding for taxonomy [J]. Systematic Biology, 2005, 54(5): 852.
- [3] Blaxter M, Floyd R. Molecular taxonomics for biodiversity surveys: already a reality[J]. Trends in Ecology & Evolution, 2003, 18(6): 268-269.
- [4] Chase M W, Salamin N, Wilkinson M, et al. Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences, 2005, 360(1462): 1889.
- [5] Newmaster S G, Fazekas A J, Ragupathy S. DNA barcoding in land plants: evaluation of *rbcl* in a multigene tiered approach [J].

Canadian Journal of Botany, 2006, 84(3): 335-341.

- [6] 黄琼林, 梁凌玲, 何瑞, 等. 青天葵及其混伪品的 *rbcl* 基因序列鉴定研究[J]. 热带作物学报, 2012, 33(9): 1630-1634.
- [7] 谭丽盈, 郑婕. 基于 *rbcl* 序列鉴别十大功劳叶及其伪品[J]. 北方药学, 2012, 9(4): 1-2.
- [8] 张慧哗, 刘锋, 王德勤, 等. 溪黄草 DNA 条形码鉴定研究[J]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2014, 16(7): 1487-1490.
- [9] 胡旻. 鸡血藤与常用混淆品的真伪鉴别[J]. 浙江中西医结合杂志, 2013, 23(5): 419.
- [10] 林君清, 洪侃, 吴敏. 鸡血藤药材与易混品的鉴别[J]. 海峡药学, 2010, 22(5): 47-48.
- [11] 翟明, 刘军民. 鸡血藤与其常见混淆品的薄层色谱鉴别研究[J]. 广州中医药大学学报, 2012, 29(3): 305-307, 340.
- [12] 翟明, 刘军民, 安冉, 等. 鸡血藤类药材种质资源的 RAPD 分析[J]. 中药新药与临床药理, 2010, 21(4): 413-415.
- [13] 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): 747-754.
- [14] CBOL Plant Working Group. A DNA barcode for land plants[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(31): 12794-12797.