

3种DNA分子标记法联合鉴别草珊瑚及其混伪品

罗育¹, 黄春喜^{2#}, 吴耀生¹, 蔡丹昭¹, 郭宏伟³, 朱丹^{3*}

1. 广西医科大学基础医学院, 广西 南宁 530021

2. 广西医科大学第一附属医院 药学部, 广西 南宁 530021

3. 广西医科大学药学院, 广西 南宁 530021

摘要: 目的 采用18S rRNA基因、ITS2序列、SCAR标记等3种DNA分子标记法鉴别草珊瑚, 为其分子鉴定提供依据。方法 通过PCR扩增、克隆测序后获得草珊瑚18S rRNA基因序列, 并进行Blast比对; 通过PCR扩增、测序并注释后获得草珊瑚ITS2序列, 从GenBank上收集混伪品和其他植物的ITS2序列, 使用MEGA 5.5软件, 计算种内种间遗传距离, 构建系统聚类树; 通过RAPD法获得草珊瑚SCAR分子标记, 克隆测序后, 设计特异性引物扩增草珊瑚及其混伪品。结果 获得的草珊瑚18S rRNA基因长度为1 820 bp, Blast比对显示草珊瑚与金粟兰科同源性最高, 同源性为99%, 证明其为草珊瑚的18S rRNA基因。获得的草珊瑚ITS2序列长度为500 bp, 草珊瑚与其混伪品之间的遗传距离为0.190~0.219, 混伪品之间的遗传距离为0~0.074, 聚类分析显示草珊瑚聚为一支, 混伪品聚为一支, 与其他植物距离较远。获得草珊瑚的SCAR分子标记, 用特异性引物扩增出现草珊瑚特异性产物, 混伪品未出现特异性产物。结论 3种分子标记法联合可更有效地鉴别草珊瑚及其混伪品, 从而建立一套新的鉴别草珊瑚与混伪品的方法, 为其鉴别提供新的思路。

关键词: 草珊瑚; 混伪品; 18S rRNA基因; ITS2序列; SCAR标记; 鉴别

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)03-0733-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.03.025

Molecular authentication of *Sarcandra glabra* and its adulterants using three DNA molecular markers

LUO Yu¹, HUANG Chun-xi², WU Yao-sheng¹, CAI Dan-zhao¹, GUO Hong-wei³, ZHU Dan³

1. School of Preclinical Medicine, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

2. Department of Pharmacy, First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

3. College of Pharmacy, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

Abstract: Objective To identify *Sarcandra glabra* and its adulterants using three DNA molecular markers including 18S rRNA gene, ITS2 sequence and SCAR marker, and then provide the basis for its molecular authentication. **Methods** 18S rRNA gene sequence of *S. glabra* was obtained by PCR amplification, cloning and sequencing, and then Blast comparison was made in NCBI. The ITS2 sequence of *S. glabra* was obtained by PCR amplification, sequencing and annotation in ITS2 Database. In the meanwhile, the ITS2 sequences of adulterants and other plants were collected from GenBank. Using MEGA5.5, the genetic distance was calculated between species and then the ITS2 sequences were aligned to construct a phylogenetic clustering tree. SCAR molecular marker of *S. glabra* was obtained by RAPD. After cloning and sequencing, specific primers were designed to amplify *S. glabra* and its adulterants. **Results** The length of 18S rRNA obtained in our research was 1 820 bp. Blast comparison revealed that there was 99% homology between *S. glabra* and Chloranthaceae, which proved to be 18S rRNA gene of *S. glabra*. The length of the ITS2 sequence in our research was 500 bp. Genetic distance between *S. glabra* and its adulterants ranged from 0.190 to 0.219, which was far more than genetic distance among adulterants (0.000—0.074). Cluster analysis showed that *S. glabra*

收稿日期: 2019-10-02

基金项目: 广西自然科学基金青年基金项目(2013GXNSFB019150); 广西高校中青年教師基础能力提升项目(2018KY0136); 广西一流学科(药学)建设项目(GXFCDP-PS-2018); 广西医科大学青年科学基金项目(GXMUYSF2014015)

作者简介: 罗育(1980—), 男, 在读博士, 讲师, 研究方向为肿瘤及中草药应用分子生物学。Tel: (0771)5358817 E-mail: luoyu2005@126.com

*通信作者: 朱丹(1980—), 女, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为中药质量评价及中药药理学。

Tel: (0771) 5360143 E-mail: zdgxmu2006@163.com

#并列第一作者 黄春喜(1984—), 女, 主管药师, 研究方向为中草药鉴定与应用。Tel: (0771)3483933 E-mail: 67972652@qq.com

and its adulterants respectively clustered into a different branch, which was far away from other plants. In our research, we obtained SCAR molecular marker of *S. glabra* and then a pair of specific primers were designed. Using the pair of specific primers, specific products were amplified from genomic DNA of *S. glabra*, but no specific products were obtained from that of its adulterants. **Conclusion** We could authenticate *S. glabra* and its adulterants effectively with the combination of three molecular markers for establishing a novel method to identify *S. glabra* and its adulterants, which provides a new idea for the authentication of *S. glabra*.

Key words: *Sarcandra glabra* (Thunb.) Nakai; adulterants; 18 S rRNA gene; ITS2 sequence; SCAR marker; identification

草珊瑚 *Sarcandra glabra* (Thunb.) Nakai 是金粟兰科 (Chloranthaceae) 草珊瑚属 *Chloranthus* Gardn. 植物, 其药材名为肿节风^[1], 又名九节茶、接骨木、接骨金粟兰、九接风等, 全草入药。草珊瑚具有清热凉血、活血消斑、祛风通络的功效, 主要用于血热发斑发疹、风湿痹痛、跌打损伤等疾病, 现代药理研究证明, 其具有抗菌、抗肿瘤、抗疲劳、促进骨折愈合、治疗胃溃疡和镇痛等作用^[2-3]。草珊瑚作为传统中药, 在我国应用历史悠久, 是草珊瑚片、血康口服液、复方草珊瑚含片等中成药的原料药。

近年来由于市场需求不断扩大, 出现了金粟兰、鸡爪兰、及己及鱼子兰等混伪品, 严重影响着草珊瑚的临床应用, 造成了用药安全问题。目前, 对中药材鉴定的方法主要有性状鉴别^[4]、显微鉴别^[5-6]和理化鉴别^[7-8], 但是显微鉴别要求鉴别者具有一定的经验, 导致其应用较局限; 而通过理化、性状鉴别, 虽然可靠, 但却费时费力。与之相比, 采用分子鉴别法对中药材进行鉴别, 具有准确性高且省时省力的优点。国内外已有报道^[9-11], 从分子水平上对中药材进行鉴别, 一般包括以 DNA 序列的鉴定为主的鉴定技术, 以重复序列与 PCR 扩增为基础的分子标记技术^[12]、DNA 条形码技术^[13]、DNA 序列分析技术^[14]等。

常用的分子鉴定技术中, RAPD 技术是最早提出的一种 DNA 分子标记技术, 该技术无需专门扩增反应引物, 简便、易行^[15], 但重复性差, 为了克服 RAPD 重复性差进而发展了特征性扩增片段区域 (Sequence characterized amplified region, SCAR) 标记, 但有时不易找到特异的 SCAR 标记, 且需大量的样本数支持。DNA 序列分析技术是通过 DNA 测序发展的一种 DNA 分子标记技术^[16], 其稳定性强, 重复性好, 但序列要求十分保守, 而 18 S rRNA 基因序列结构、功能十分保守, 进化速率较慢, 是 DNA 序列分析技术常用的测序对象, 但不同物种间的 18 S rRNA 基因序列需要存在变异才能用于鉴定。DNA 条形码技术是 2003 年首次提出的, 利用

基因组中一段公认标准的、相对较短的 DNA 片段作为物种标记而建立的一种新的分子鉴定技术^[17], 以 ITS2 序列作为核心条形码, 其不受形态特征和生物个体发育限制, 检测样本范围广, 高效、准确、易于实现自动化和标准化, 已成为中药材的研究热点, 但并不是所有药材均具有 DNA 差异烙印^[15]。因此, 如果仅使用其中某一种方法有可能对鉴定产生偏颇, 会出现鉴别的失误, 从而影响到中药材的正品和混伪品的误用, 若将几种鉴别方法联合起来, 则可以增加鉴别的准确性。本研究联合采用 18 S rRNA 序列、ITS2 条形码、SCAR 标记等 3 种分子鉴别手段对草珊瑚进行鉴定并区分混伪品, 以期能够作为传统中药鉴别方法的重要补充, 同时也为中药材鉴别提供思路和方法。

1 材料

草珊瑚及同科植物均为新鲜品, 详细信息见表 1, 材料由广西中医药研究院赖茂祥研究员进行鉴定, 于 -20 °C 条件下储藏。

2 方法

2.1 基因组 DNA 提取与检测

采用改良 CTAB 法^[18]提取基因组 DNA, 使用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳检测, 凝胶成像系统观察并拍照, 同时采用微量核酸蛋白分析仪测定浓度及纯度, 每份样品平行测定 3 次。-20 °C 保存备用。

2.2 草珊瑚 18 S rRNA 的获得与 Blast 比对

2.2.1 草珊瑚 18 S rRNA 的 PCR 扩增 使用文献方法^[19] 18 S rRNA 通用引物进行 PCR 扩增。反应体系: 10× Buffer, 25 mmol/mL Mg²⁺, 2.5 mmol/L dNTP, 10 μmol/L 上、下游引物, 模板, 5.0 U/μL rTaq DNA 聚合酶, 三蒸水补足体积为 25 μL。反应程序: 98 °C 预变性 10 s; 98 °C 变性 10 s, 65 °C 退火 3 min, 进行 30 个循环; 72 °C 延伸 8 min。1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

2.2.2 草珊瑚 18 S rRNA 基因克隆及测序 将草珊瑚 18 S rRNA 与 pEASY-T1 进行连接, 加入 50 μL 的感受态细胞, 冰浴 30 min, 紧接着 42 °C 水浴 45

表 1 草珊瑚及其他植物信息
Table 1 Information of *S. glabra* and other plants

编号	植物名称	拉丁名	来源	生长情况
CSH-1	草珊瑚	<i>Sarcandra glabra</i> (Thunb.) Nakai	广西药用植物园	栽培 3 年
CSH-2	草珊瑚		广西药用植物园	栽培 4 年
CSH-3	草珊瑚		福建	栽培 5 年
CSH-4	草珊瑚		广西融水	栽培 4 年
CSH-5	草珊瑚		广西药用植物园	野生
CSH-6	草珊瑚		广西石亨竹山	栽培 3 年
CSH-7	草珊瑚		广西铺上屯基地	栽培 3 年
CSH-8	草珊瑚		广西大用基地	栽培 5 年
CSH-9	草珊瑚		广西药用植物园	栽培 5 年
JZL	鸡爪兰	<i>Artabotrys hexapetalus</i> (Linn. f.) Bhandari	广西药用植物园	栽培
JSL	金粟兰	<i>Chloranthus spicatus</i> (Thunb.) Makino	广西药用植物园	野生
JJ	及己	<i>C. serratus</i> (Thunb.) Roem. et Schult.	广西药用植物园	栽培

s, 立即转至冰上 2 min。加入 SOC (super optimal broth with catabolite repression) 培养液, 置于恒温培养振荡器中震荡培养 1 h。涂平板, 37 °C 培养过夜, 采用蓝白斑筛选法与 PCR 鉴定获得得到阳性克隆细菌。从阳性克隆细菌中提取质粒, PCR 验证为阳性质粒后, 将其送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行测序。

2.2.3 提交 NCBI 进行 Blast 比对 测序结果使用生物信息学软件 Vector NTI 进行分析并校正, 校正后的序列提交到 NCBI 进行 Blast 比对。

2.3 草珊瑚 ITS2 的获得与 NJ 系统聚类树的构建

2.3.1 草珊瑚 ITS2 的 PCR 扩增 使用文献报道^[20]中的 ITS2 通用引物进行 PCR 扩增, 反应体系: 10×Buffer, 2.5 mmol/L dNTPs, 10 μmol/L 正向、反向引物, 模板, 5.0 U/L rTaq DNA 聚合酶, 三蒸水补至 25 μL。PCR 扩增程序: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s, 进行 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

2.3.2 草珊瑚 ITS2 的测序 将 PCR 产物纯化后送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行测序。

2.3.3 构建草珊瑚与其混淆品的系统聚类树 使用 CodonCode Aligner 软件比对测序结果, 除去低质量区, 在 ITS2 Database 中选择隐马尔科夫模型 HMMer 注释法进行注释, 获得草珊瑚 ITS2 序列; 从 GenBank 下载 6 条混伪品和 21 条其他植物的 ITS2 序列 (表 2), 用 MEGA 5.5

软件中的 Pairwisedistance 工具计算其相对遗传距离, 并采用邻接法 (neighbour-joining, NJ) 构建系统聚类树。

2.4 草珊瑚 SCAR 的获得与验证

2.4.1 草珊瑚 RAPD 的扩增 从随机引物库中挑选了引物进行 PCR 扩增, 扩增体系: 10×Buffer, 2.0 mmol/L Mg²⁺, 2.5 mmol/L dNTPs, 25 mg/mL BSA, 10 μmol/L 随机引物, Template, 5.0 U/L rTaq DNA 聚合酶, 三蒸水补至 25 μL。扩增程序: 94 °C 预变性 30 s; 94 °C 变性 30 s, 36 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min, 进行 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

2.4.2 草珊瑚 SCAR 分子标记的克隆及测序 将 SCAR 分子标记与 pEASY-T1 进行连接, 加入感受态细胞, 冰浴 30 min, 紧接着 42 °C 水浴 45 s, 立即转至冰上 2 min。加入 SOC 培养基, 置于摇床中震荡培养 1 h。涂平板, 37 °C 培养过夜, 采用蓝白斑筛选法筛选并 PCR 扩增获得阳性克隆细菌。从阳性克隆细菌中提取质粒, PCR 验证为阳性质粒后, 将其送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行测序。

2.4.3 设计扩增草珊瑚 SCAR 的特异性引物 测序结果经 Vector NTI 软件比对获得草珊瑚 SCAR 同源序列, 使用 Primer premier 5.0 软件设计特异性引物, 由生工生物工程 (上海) 有限公司合成。

2.4.4 草珊瑚 SCAR 分子标记的验证 以草珊瑚及其混伪品基因组 DNA 为模板, 使用特异性引物进

表 2 GenBank 中草珊瑚混伪品与部分其他植物 ITS2 序列信息

Table 2 Information of ITS2 sequence in adulterants of *S. glabra* and some other plants from GenBank

序号	基原物种	拉丁名	GenBank 登录号
1	及己	<i>Chloranthus serratus</i> (Thunb.) Roem. et Schult.	AF280412
2	四川金粟兰	<i>C. sessilifolius</i> K. F. Wu	AF280413
3	台湾金粟兰	<i>C. oldhamii</i> Solms	AF280414
4	鱼子兰	<i>C. erectus</i> (Buch. -Ham.) Verdc.	AF280410
5	金粟兰	<i>C. spicatus</i> (Thunb.) Makino	AF280411
6	宽叶金粟兰	<i>C. henryi</i> Hemsl.	AF280415
7	花椒	<i>Zanthoxylum bungeanum</i> Maxim.	YD01
8	贴梗海棠	<i>Chaenomeles speciosa</i> (Sweet) Nakai	GQ434655
9	灵芝	<i>Ganoderma resinaceum</i> Boud.	AM269777
10	枸杞	<i>Lycium chinense</i> Mill.	KY683004
11	酢浆草	<i>Oxalis crassipes</i> Urb.	U74265
12	北悬钩子	<i>Rubus arcticus</i> Linn.	Y15828
13	石刁柏	<i>Asparagus officinalis</i> Linn.	HM357931
14	女贞	<i>Ligustrum lucidum</i> Ait.	AB610492
15	赤芝	<i>G. lucidum</i> (Curtis) P. Karst.	AM906058
16	颠茄	<i>Atropa belladonna</i> Linn.	AB019948
17	柳叶菜	<i>Epilobium pygmaeum</i> (Speg.) Hoch & Raven	L28029
18	蔓乌头	<i>Aconitum volubile</i> Pall. ex Koelle	AB020350
19	凤仙花	<i>Impatiens radicans</i> Benth. ex Hook. f. & Thomson	AB119682
20	紫藤	<i>Wisteria frutescens</i> (L.) Poir.	U50751
21	山黧豆	<i>Lathyrus vernus</i> (L.) Bernh.	JX506155
22	囊萼黄耆	<i>Astragalus cysticalyx</i> Ledeb.	AF121682
23	昌都锦鸡儿	<i>Caragana changduensis</i> Liou f.	FJ537243
24	合萌	<i>Aeschynomene indica</i> Burm. f.	FM242621
25	紫穗槐	<i>Amorpha fruticosa</i> Linn.	U59890
26	黄香草木樨	<i>Melilotus officinalis</i> (L.) Lam.	U50765
27	三叶草	<i>Trifolium longipes</i> Torr. & A.Gray	U56018

行 PCR 扩增, 扩增体系: 10×Buffer, 2.0 mmol/L Mg²⁺, 2.5 mmol/L dNTPs, 10 μmol/L 上、下游引物, 模板, 5.0 U/L rTaq DNA 聚合酶, 三蒸水补至 25 μL。扩增程序: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 53.8 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min, 进行 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

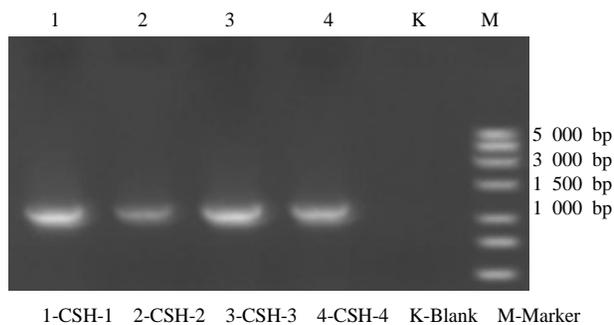
3 结果与分析

3.1 草珊瑚 18 S rRNA 的 PCR 扩增结果

设计特异性 18 S rRNA 引物, 对草珊瑚基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 获得约 1 800 bp 的单一一条带, 与预期结果相符, 重复 3 次均能稳定出现, 结果见图 1。

3.2 草珊瑚 18 S rRNA 基因 NCBI-Blast 比对结果

测序结果经 Vector NTI 分析并校正后提交至 GenBank, 登记号为 KY761967。NCBI-Blast 比对后, 显示草珊瑚 18 S rRNA 基因与毛茛科、菊科、五加



1-CSH-1 2-CSH-2 3-CSH-3 4-CSH-4 K-Blank M-Marker

图 1 草珊瑚 18 S rRNA 基因的 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR amplification of 18 S rRNA gene in *S. glabra*

科及草海桐科等物种同源性均非常高, 与同科雪香兰属、草珊瑚属及金粟兰属植物的同源性高达 99%, 与草珊瑚属珊瑚花 (GenBank 登录号为 AF207012.1) 比对发现只存在有少量的变异位点, 由此可以确定获得了草珊瑚 18 S rRNA 基因序列, 结果见表 3、4。

表 3 不同科属植物与草珊瑚的 18 S rRNA 基因序列同源性分析结果

Table 3 Homology analysis of 18 S rRNA gene sequences between *S. glabra* and different family & genus plants

科	属	同源性/%
金粟兰科	雪香兰	99
	草珊瑚	99
	金粟兰	99
毛茛科	耬斗菜	98
	升麻	98
	唐松草	98
	铁线莲	98
	毛茛	98
	黄连	98
菊科	菊	97
	飞廉	97
五加科	人参	97
	五加	97
草海桐科	草海桐	97

表 4 草珊瑚与珊瑚花 18 S rRNA 基因序列比对结果

Table 4 Alignment of 18 S rRNA gene sequence between *S. glabra* and *S. grandiflora*

植物名称	基因序列					
	707	1 762	1 763	1 764	1 771	1 772
草珊瑚	C	G	A	G	G	A
珊瑚花	T	A	—	—	A	T

表 5 草珊瑚与其混伪品间 ITS2 序列的遗传距离

Table 5 Genetic distance of ITS2 sequences between *S. glabra* and its adulterants

种类	金粟兰	四川金粟兰	及己	宽叶金粟兰	台湾金粟兰	鱼子兰	草珊瑚
金粟兰	1.000						
四川金粟兰	0.000	1.000					
及己	0.068	0.068	1.000				
宽叶金粟兰	0.052	0.052	0.015	1.000			
台湾金粟兰	0.074	0.074	0.041	0.025	1.000		
鱼子兰	0.068	0.068	0.062	0.057	0.067	1.000	
草珊瑚	0.219	0.219	0.203	0.190	0.203	0.210	1.000

3.5 草珊瑚、混伪品及其他科属植物的 ITS2 序列聚类分析

在 ITS2 database 中,对测序结果注释获得草珊瑚 ITS2 序列(图 3),与混伪品及其他科属植物的 ITS2 序列构建的系统聚类树显示草珊瑚虽与金粟兰科金粟兰属距离较近,但能够与混伪品分别聚为

3.3 草珊瑚 ITS2 的 PCR 扩增结果

设计特异性 ITS2 引物,对不同地区、不同栽培年份的草珊瑚基因组 DNA 进行 PCR 扩增,获得约 500 bp 的单一一条带,与预期结果相符,重复 3 次均能稳定出现,结果见图 2。

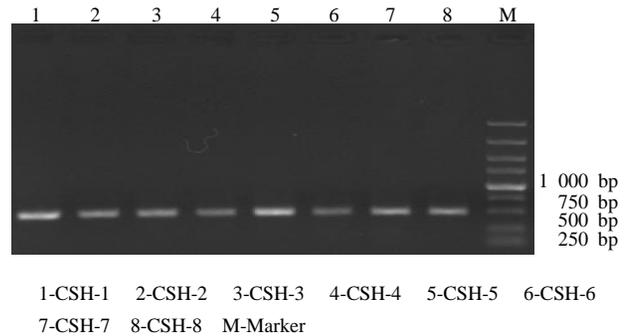


图 2 草珊瑚 ITS2 序列的 PCR 扩增结果

Fig. 2 PCR amplification of ITS2 sequence in *S. glabra*

3.4 草珊瑚种间及其混伪品的 ITS2 序列变异分析

Vector NTI 软件分析显示 8 个草珊瑚受试样品相互间 ITS2 序列相似度达 100%,对草珊瑚与其混伪品的 ITS2 序列变异情况进行分析显示,草珊瑚与鱼子兰、台湾金粟兰、四川金粟兰、宽叶金粟兰、金粟兰、及己的变异位点分别达 47、47、50、45、49、46 个。对草珊瑚与其混伪品的 ITS2 序列遗传距离分析表明,其种间最小遗传距离为 0.190,最大遗传距离为 0.219,而混伪品的种间遗传距离为 0.000~0.074,均低于草珊瑚与其混伪品之间的遗传距离,结果见表 5。

一支,而与其他科植物距离相差较远,因此 ITS2 序列能区分草珊瑚与金粟兰科植物的混伪品,见图 4。

3.6 草珊瑚基因组 DNA RAPD 扩增结果

从随机引物扩增的结果中筛选 SCAR 分子鉴定标记,扩增结果见图 5,结果显示在 1000~2000 bp 有共同条带,重复 3 次均能稳定出现,且清晰明亮,因其相

CGCCTTACGTCGCTCTCAAACAATTGTCCCCCTCGGGGATGTCGAGTTGAGA
 TCGGAGATTGGCCACCCGCGCTCTGTTTCGCGCGGCTGGCTCAAGAGCGGC
 CTTGCCGGTGCAGGGCGCGATTAGTTGTGGATGATAGAAGCTACATTTCCGGT
 GATCGCGTCTCGACCGTCTTTGGACCTTACCTGATGTCGTTTTATGGCATT
 CGGACTG

图 3 草珊瑚 ITS2 序列的碱基组成信息

Fig. 3 Information of ITS2 sequence in *S. glabra*

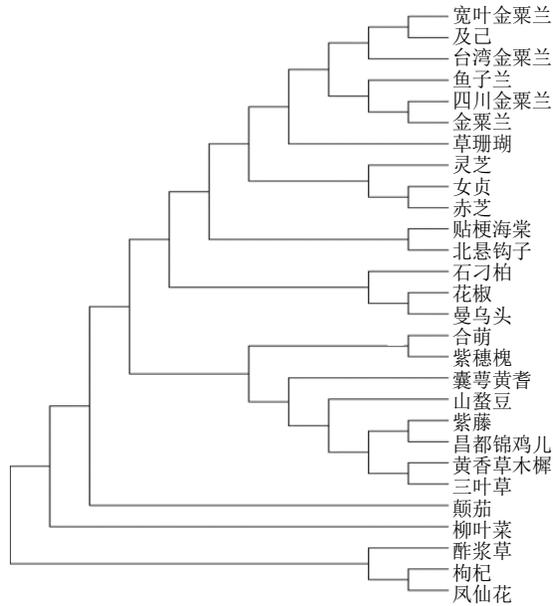
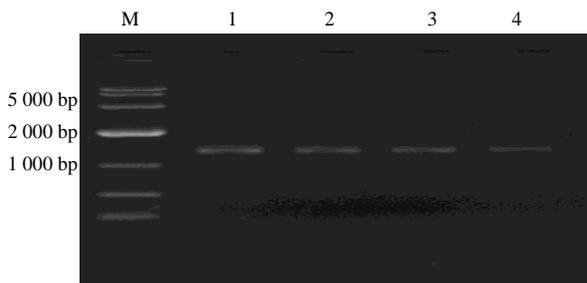


图 4 草珊瑚、混伪品和其他植物的 IST2 序列构建的 NJ 聚类树

Fig. 4 NJ cluster tree of *S. glabra*, adulterants and other plants based on IST2 sequence



M-Marker 1-CSH-1 2-CSH-2 3-CSH-3 4-CSH-4

图 5 草珊瑚 RAPD 的扩增结果

Fig. 5 Amplification of RAPD in *S. glabra*

对分子质量大小适中, 是质量较佳的 SCAR 分子标记。

3.7 草珊瑚特异性引物鉴定的结果

测序获得长度为 1 351 bp 的 SCAR 分子标记, 提交至 GenBank, 登记号为 MN244913; 进而设计特异性引物, 扩增不同来源的草珊瑚及其混伪品,

结果显示, 草珊瑚在 500 bp 左右均出现明亮、清晰条带, 与预期产物相符, 而混伪品均未出现条带, 见图 6。由于特异性引物是根据草珊瑚的 SCAR 序列进行设计的, 所以据此可证明该特异性引物可用于草珊瑚与其混伪品的鉴别, 也说明成功获得了草珊瑚的 SCAR 分子标记。

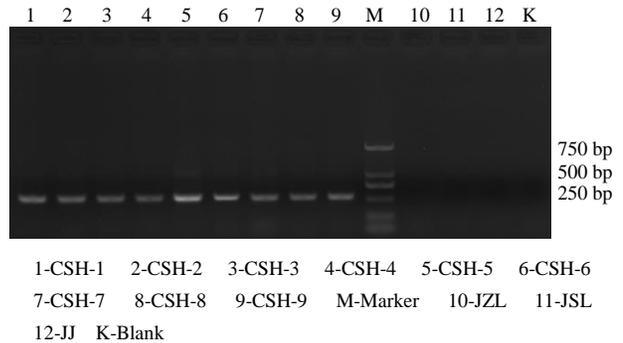


图 6 特异性引物扩增不同来源草珊瑚与混伪品的 PCR 扩增结果

Fig. 6 PCR amplification of specific primers applied in *S. glabra* and adulterants

4 讨论

18 S rRNA 基因是高度重复的序列, 结构和碱基排列复杂度适中, 比较易于进行测序和序列分析, 且其核苷酸替换率相对较低, 在种内遗传稳定^[21]。通过分析了解草珊瑚 18 S rRNA 基因序列的结构特点, 可以克服某些情况下因传统鉴别方法造成的误差, 更准确地对草珊瑚进行鉴别。本研究中, 所获得的草珊瑚 18 S rRNA 基因与其他科属植物进行同源性对比, 显示同源性均在 95% 以上, 说明生长年限与地理环境因素对该基因的进化并没有造成太大的影响; 与金粟兰科、五加科、草海桐科、毛茛科等被子植物的同源性均在 99% 以上, 说明了 18 S rRNA 基因的进化速度较慢, 是十分保守的序列。进一步分析发现与同科雪香兰属、草珊瑚属及金粟兰属植物的同源性均为 99%, 说明 18 S rRNA 基因

在金粟兰科的差异很小,种内遗传稳定,与同为草珊瑚属的珊瑚花(登录号为 AF207012.1)比对,发现有 6 个变异位点,即第 707 (C-T)、1 762 (G-A)、1 771 (G-A) 和 1 772 (A-T) 位点发生替换,在第 1 763 和 1 764 位点分别插入了 A 和 G 2 个碱基,其序列存在的微小变异将会是一种很好的 DNA 标志^[22-23],因此本研究认为 18 S rRNA 基因保持了同科属高度的同源性,又有少量稳定的种内差异,序列十分保守,可以作为草珊瑚鉴别的分子依据。

DNA 条形码 (DNA barcoding) 是近年来物种鉴定的研究热点和方向,Chen 等^[24]对 ITS2 (internal transcribed spacer 2) 序列进行研究,发现 ITS2 序列在中药材的物种鉴定方面具有潜在的研究价值。本研究中,草珊瑚样品来自不同地区、不同栽培年份,均能获得 ITS2 序列,同源性高,且稳定无变异位点,然而其与混伪品的 ITS2 序列中均有较多变异位点,达 45~50 个,占 215 bp ITS2 序列的 20.9%~23.2%,这些位点可考虑用于草珊瑚与其混伪品的分子鉴别;基于 NJ 系统聚类树也可明显区分草珊瑚及其混伪品,说明了 ITS2 条形码技术对草珊瑚进行鉴定具有良好的稳定性,通过构建草珊瑚、混伪品及其他科植物 NJ 系统进化树能够直观、方便地反映鉴定结果,为中药材 DNA 条形码鉴定法在中药材检验工作中提供了良好的实例。

SCAR 分子标记是研究对象基因组中特定序列的 DNA 分子,找到 SCAR 分子标记,并获得它的序列,就可以根据序列设计特异性引物,对研究对象实现特异性 PCR 分子鉴定方法^[25-27]。本研究中,通过 RAPD 技术对不同产地草珊瑚进行 SCAR 分子标记的筛选,对所获 SCAR 分子标记的进行 BLAST 分析,显示与其他科植物不存在同源性,表明所得分子标记是一段主要针对草珊瑚的特异序列。基于此,本研究成功设计出扩增 SCAR 分子标记的特异引物,扩增不同来源的草珊瑚及其混伪品,研究结果显示,草珊瑚均能扩增出条带,而其他混伪品均未能扩增出条带,因此所设计的引物可以特异鉴定草珊瑚与混伪品,成功获得了草珊瑚 SCAR 分子标记,若继续扩大样本量,有望建立一种新的鉴定草珊瑚与其混伪品的方法,为草珊瑚安全用药提供理论和技术上的保障。因此,联合上述几种分子鉴定方法可以系统地对草珊瑚进行鉴定并有效地区分混伪品,为中药肿节风的临床应用提供保障,也为其他药用植物的鉴别提供新的思路。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 梅全喜, 胡莹. 肿节风的药理作用及临床应用研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2011, 22(1): 230-232.
- [3] 冀艳花, 朱学军, 吴洁. 肿节风抗肿瘤作用及其机制的研究进展 [J]. 中医药导报, 2016, 22(9): 44-46.
- [4] 石祥刚, 李小艳, 宋晓虹, 等. 中草药肿节风的解剖结构及显微鉴定 [J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2008, 47(增刊): 48-52.
- [5] 朱迎夏, 张本刚, 齐耀东, 等. 中药材骨碎补及其混淆品的显微鉴定方法研究 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(8): 1152-1156.
- [6] 施晓龙, 林丽, 张竞, 等. 显微鉴定在中药材鉴定中的研究进展 [J]. 甘肃中医学院学报, 2014, 31(6): 84-87.
- [7] 邓伟麟, 吴莹莹, 毕丹, 等. 肿节风药材的 HPLC 指纹图谱研究及其异嗪皮啉与迷迭香酸的含量测定 [J]. 中国药房, 2013, 24(47): 4472-4474.
- [8] 韦卓纯, 姚志红, 王其意, 等. UPLC 结合化学计量学方法的肿节风指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2015, 46(6): 895-900.
- [9] Yang L Q, Asaduzzaman K M, Mei Z Q, et al. Development of RAPD-SCAR markers for *Lonicera japonica* (Caprifoliaceae) variety authentication by improved RAPD and DNA cloning [J]. *Rev Biol Trop*, 2014, 62(4): 1649-1657.
- [10] 李敏, 陈强, 茅学群. 中药白术 SCAR 分子鉴定标记的筛选和克隆 [J]. 中草药, 2015, 46(2): 148-153.
- [11] Cheng J L, Long Y, Asaduzzaman K, et al. Development and significance of RAPD-SCAR markers for the identification of *Litchi chinensis* Sonn. by improved RAPD amplification and molecular cloning [J]. *Electron J Biot*, 2015, 18: 35-39.
- [12] 罗育, 吴耀生, 周娟, 等. 采用随机引物组合对绞股蓝作 RAPD 分析及 SCAR 鉴定 [J]. 植物科学学报, 2011, 56(2): 243-247.
- [13] 陈士林, 姚辉, 韩建萍, 等. 中药 DNA 条形码分子鉴定 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012.
- [14] 王梦亮, 任晓琳, 崔晋龙, 等. 野生红景天的 RAPD 和 ISSR 遗传多样性分析 [J]. 中草药, 2016, 47(3): 469-473.
- [15] 时圣明, 潘明佳, 王洁, 等. 分子鉴定技术在中药中的应用 [J]. 中草药, 2016, 47(17): 3121-3126.
- [16] 朱美玲, 王林娜, 胡培, 等. 分子鉴定技术在南药研究中的应用进展 [J]. 世界中医药, 2018, 13(2): 522-526.
- [17] Gu W, Song J, Cao Y, et al. Application of the ITS2 region for barcoding medicinal plants of

- Selaginellaceae in Pteridophyta [J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e67818.
- [18] 刘小芹, 罗育, 曾麒燕, 等. 两种提取白桂木基因组 DNA 方法的比较研究 [J]. 广西中医药大学学报, 2014, 17(2): 71-72.
- [19] 姜芳燕, 黄海, 杨宁, 等. 海南几种大型绿藻 18S rRNA 基因的克隆与序列分析 [J]. 热带农业科学, 2017, 37(6): 49-54.
- [20] 魏艺聪, 陈莹, 牛广俊, 等. 不同居群草珊瑚的 ITS 序列分析及模式识别研究 [J]. 中草药, 2014, 45(20): 2982-2986.
- [21] 王宝庆, 葛菁萍, 平文祥. 18S rRNA 在系统进化研究中的应用 [J]. 黑龙江医药, 2005, 18(4): 251-252.
- [22] 胡静, 谢俊仁, 王锁民. 多浆早生植物霸王 18S rRNA 基因的克隆及序列分析 [J]. 草业科学, 2012, 29(9): 1369-1373.
- [23] 黄庆阳, 樊锐锋, 常纓. 香鳞毛蕨 18S rRNA 基因片段的克隆与序列分析 [J]. 时珍国医国药, 2016, 27(10): 2418-2420.
- [24] Chen S, Yao H, Han J, *et al.* Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plants species [J]. *PLoS One*, 2010, 5(1): e8613.
- [25] Khan M A, Cheng J L, Mei Z Q, *et al.* Development of two novel specific SCAR markers by cloning improved RAPD fragments from the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* (Leysser: Fr) Karst [J]. *Genet Mol Res: GMR*, 2016, 15(3): 15038536.
- [26] Park I, Yang S, Kim W J, *et al.* Authentication of herbal medicines and using DNA barcodes, chloroplast genome, and sequence characterized amplified region (SCAR) marker [J]. *Molecules*, 2018, 23(7): 1748.
- [27] Xu Y X, Shen S Y, Chen W, *et al.* Analysis of genetic diversity and development of a SCAR marker for green tea (*Camellia sinensis*) cultivars in Zhejiang Province: The most famous green tea-producing area in China [J]. *Biochem Genet*, 2019, 57(4): 555-570.