

• 药材与资源 •

鸡血藤及其混伪品的 DNA 条形码分子鉴定研究

熊瑶¹, 金晨^{2*}, 王晓云³, 曹岚³, 杜小浪³, 李彤¹, 张凌^{1*}

1. 江西中医药大学药学院, 江西 南昌 330004

2. 江西中医药大学 现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004

3. 江西中医药大学 江西中医药大学中药资源与民族药研究中心, 江西 南昌 330004

摘要: 目的 采用分子生物学鉴定技术, 筛选合适的 DNA 条形码序列, 建立快速、准确鉴定鸡血藤的方法。方法 采集 72 份鸡血藤及其混伪品的样本, 分别提取样品 DNA, 对 ITS2、matK、psbA-trnH、ITS 和 rbcL 序列扩增、测序; 计算各序列扩增成功率和测序成功率, 利用 MEGA 7.0 分析比对序列特征; 基于 Kimura-2-Parameter (K2P) 双参数模型计算种内、种间的遗传距离评估 Barcoding gap; 利用 Phylosuite 软件构建 ITS2、matK 和 psbA-trnH 和多基因 (I-M-P) 联合系统发育树。结果 ITS2 的扩增成功率和测序成功率最高, 均为 100%, matK 和 psbA-trnH 的测序成功率亦有 94.4%、91.7%, 而 rbcL 和 ITS 仅为 69.4% 和 61.1%; ITS2 较其他条形码序列具有明显的 Barcoding gap, 且种内、种间重叠少; 系统发育树显示, ITS2 和 psbA-trnH 可将鸡血藤及其混伪品明显聚为不同分支, matK 不能把滇鸡血藤和南五味子分开; I-M-P 系统发育树同 ITS2 和 psbA-trnH 结果相同。结论 以 ITS2 为主、psbA-trnH 序列为辅的鉴定方法能够对鸡血藤及其混伪品进行快速、准确的鉴定, 为鸡血藤临床用药的安全性和合理使用的准确性提供依据。

关键词: 鸡血藤; DNA 条形码; ITS2; matK; psbA-trnH; Phylosuite 软件

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)12-3274-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.12.020

Molecular identification of *Spatholobi Caulis* and its adulterants based on DNA barcodingXIONG Yao¹, JIN Chen², WANG Xiao-yun³, CAO Lan³, DU Xiao-lang³, LI Tong¹, ZHANG Ling¹

1. School of Pharmacy, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Nanchang 330004, China

2. Key Laboratory for Modern TCM Preparations, Ministry of Education, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China

3. Research Center for Traditional Chinese Medicine Resourcing and Ethnic Minority Medicine, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China

Abstract: Objective Molecular biology identification technology was used to screen the appropriate DNA barcoding to establish a fast and accurate method for identifying *Spatholobi Caulis*. **Methods** A total of 72 samples of *Spatholobi Caulis* and its adulterants were collected, the sample DNA was extracted, the ITS2, matK, psbA-trnH, ITS, and rbcL sequences were amplified and sequenced, and the amplification success rate and sequencing success rate of each sequence were calculated. The alignment of all sequences was determined by MEGA 7.0 software, and the interspecies and intraspecific genetic distance of them were analyzed to evaluate the Barcoding gap, based on the Kimura-2-Parameter (K2P) two-parameter model. Phylosuite software was used to construct the ITS2, matK and psbA-trnH and multi-gene (I-M-P) phylogenetic tree. **Results** The amplification success rate and sequencing success rate of ITS2 were the highest (100%), and the sequencing success rates of matK and psbA-trnH were 94.4% and 91.7% respectively, while rbcL and ITS were only 69.4% and 61.1%. Compared with other barcoding, ITS2 has obvious Barcoding gap, and there was less overlap tree showed that ITS2 and psbA-trnH can obviously cluster *Spatholobi Caulis* and its adulterants into different branches, while matK cannot separate *Kadsuræ Caulis* and *Schisandrae Sphenantherae Fructus*. I-M-P phylogenetic tree had the same result as ITS2 and psbA-trnH. between species.

收稿日期: 2019-11-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81460595); 国家自然科学基金资助项目 (81960697)

作者简介: 熊瑶 (1995—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药材分子鉴定及质量控制。Tel: (0791)87118731 E-mail: 765245232@qq.com

*通信作者 张凌 Tel: (0791)87118731 E-mail: dw64810@163.com

金晨 Tel: 15180475730 E-mail: 298250381@qq.com

Conclusion The identification method based on ITS2 and supplemented by the psbA-trnH sequence can quickly and accurately identify *S. Caulis* and its adulterants, which can provide the basis for the safety and the accuracy of the clinical application.

Key words: *Spatholobi Caulis*; DNA barcoding; ITS2; matK; psbA-trnH; Phylosuite software

鸡血藤为常用中药,来源于豆科(Leguminosae)植物密花豆 *Spatholobus suberectus* Dunn 的干燥藤茎,味苦、甘,性温,归肝、肾经。具有补血活血、调经止痛、舒筋活络的功效,用于治疗月经不调、痛经、经闭、风湿痹痛、麻木瘫痪、血虚萎黄等病症^[1],广泛用于妇科、风湿痹痛等中成药中。《中国药典》2015 年版中收录的“血藤”类中药材有“大血藤”“鸡血藤”及“滇鸡血藤”3 种,其中以鸡血藤的基原物种最多,据文献统计多达 26 种,分属于 6 科 12 属^[2],鉴定最为困难。

鸡血藤的本草记载存在差异,进一步加剧了其用药的混乱。《中药志》1960 年版将豆科植物白花油麻藤 *Mucuna birdwoodiana* Tutch 作为鸡血藤正品^[3];《广州植物志》及《中国植物高等图鉴》将豆科崖豆藤属网络崖豆藤 *Millettia reticulata* Benth. 作为其基原植物;《新编中药志》(2001)收录的鸡血藤品种达 10 种,均为豆科植物,常见的有密花豆、网络崖豆藤、香花崖豆藤 *Millettia dielsiana* Harms、白花油麻藤 *Mucuna birdwoodiana* Tutch、常春油麻藤 *Mucuna sempervirens* Hemsl、光叶密花豆 *S. harmandii* Gagnep.、红血藤 *S. sinensis* Chun et T. Chen.^[4]。四川省中药材标准(2010 版)及湖南省中药材标准(1993 版)将豆科崖豆藤属香花崖豆藤作为其基原植物;《中国植物志》将丰城崖豆藤 *Millettia nitida* Benth. var. *hirsutissima* Z. Wei 作为江西等地区鸡血藤的习用品^[5]。由此可见,鸡血藤药材混伪品较多、基原植物的界定存在较大争议、亲缘关系不清晰,严重影响了临床用药的有效性和安全性。

目前,国内外对于鸡血藤的研究主要集中在化学成分和药理作用方面^[6],其鉴定也主要是通过性状^[7]、理化鉴定^[8]等方式,仅通过传统鉴定方法难以实现药材的准确鉴定。DNA 条形码技术自 2003 年由加拿大大学的 Hebert 教授^[9]首次提出,已成为近年来生物分类学研究的热点和前沿,它通过比较物种中的一段标准的 DNA 片段,可对物种进行快速、准确地识别和鉴定。国际标准的植物 DNA 条形码确定为 matK、rbcL、psbA-trnH 以及 ITS/ITS2 等序列^[10]。生命条形码联盟植物工作组对叶绿体 matK 和 rbcL 序列进行考察,从 907 个样品中成功

鉴定 505 个物种,鉴定成功率达到 72%^[11];陈士林团队历时 10 年完成 11 000 余种、4 万余份实验样品的 DNA 条形码研究,提出以 ITS2 序列作为植物通用 DNA 条形码^[12-14]。《中国药典》2015 年版收载 DNA 条形码技术指导原则建立了植物类采用 ITS2/ITS 为主,叶绿体 psbA-trnH 为辅的中药材鉴定体系。由此,本实验以 ITS2、matK、rbcL、psbA-trnH 和 ITS 序列为研究对象,采集 72 份鸡血藤及其混伪品实验样品,包括鸡血藤、香花崖豆藤、网络崖豆藤及白花油麻藤等,以期寻找最适于鸡血藤及其混伪品快速、准确的鉴定方法,为鸡血藤临床用药的安全性和合理使用的准确性提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

本实验收集植物新鲜叶片和药材共 72 份,涉及 4 个科的 12 个不同品种,包括鸡血藤 11 份,丰城鸡血藤 4 份,网络崖豆藤 18 份,香花崖豆藤 18 份,厚果崖豆藤 4 份,滇鸡血藤 3 份,大血藤 2 份及其他藤类 12 份,样品主要来源于江西、广西、四川及云南等地,其中以紫金牛科(Myrsinaceae)的白花酸藤果 *Embelia ribes* Burm. 作为外系。以上所有实验样品经江西中医药大学曹岚副教授鉴定,凭证标本保存于江西中医药大学,样品信息见表 1。

1.2 试剂

植物基因组 DNA 提取试剂盒、2×pfuPCR Master Mix 和 DL2000 Marker 均购于北京天根生化有限公司;引物由上海生工生物试剂公司合成;50×TAE 购于北京索莱宝科技有限公司;琼脂糖和 GoldViewI 核酸染料购于北京鼎国昌盛生物技术公司。

1.3 仪器

台式高速冷冻离心机(Eppendorf 公司);电热恒温水浴锅(Eppendorf 公司);移液枪(Eppendorf 公司);涡旋仪(杭州奥盛仪器有限公司);凝胶电泳仪(Bio-Rad 公司);凝胶成像仪(Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 DNA 提取、扩增及测序

实验样品用 75%乙醇擦拭表面晾干,取干燥叶片(30 mg)或药材(60 mg)经 DNA 提取研磨仪研磨 2 min(30 r/s, 1 min, 2 次)后,用天根植物

表 1 样品信息
Table 1 Experimental sample information

种名	样品编号	采集地	登录号		
			ITS2	matK	psbA-trnH
鸡血藤	JXT19031301	广东肇庆	MT077363	MT077438	MT077506
	JXT01	广西	MT077364	—	—
	JXT02	越南	MT077365	MT077439	MT077507
	JXT03	广东	MT077366	MT077440	—
	JXT04	云南	MT077367	MT077441	MT077508
	JXT05	广西	MT077368	MT077442	MT077509
	JXT06	广西	MT077369	MT077443	—
	JXT07	云南	MT077370	—	—
	JXT08	云南	MT077371	—	—
	JXT09	云南	MT077372	—	—
美丽密花豆	JXT10	广西恭城	MT077373	MT077444	MT077510
	ML19102601	西双版纳大河边村	MT077377	MT077435	MT077511
	ML19102602	西双版纳大河边村	MT077378	MT077436	MT077512
	ML19102603	西双版纳大河边村	MT077379	MT077437	MT077513
香花崖豆藤	XH18060201	江西省龙南县里仁镇	MT077310	MT077382	MT077450
	XH18060202	江西省龙南县里仁镇	MT077311	MT077383	MT077451
	XH18060401	江西省龙南县程龙镇林洞	MT077312	MT077384	MT077452
	XH18060402	江西省龙南县里仁镇	MT077313	MT077385	MT077453
	XH18061101	江西省龙南县南亨乡	MT077314	MT077386	MT077454
	XH18061102	江西省龙南县南亨乡	MT077315	MT077387	MT077455
	XH18061103	江西省龙南县南亨乡	MT077316	MT077388	MT077456
	XH18061104	江西省龙南县南亨乡	MT077317	MT077389	MT077457
	XH18061301	江西省龙南县南亨乡	MT077318	MT077390	MT077458
	XH18061302	江西省龙南县南亨乡	MT077319	MT077391	MT077459
	XH18061401	江西省全南县	MT077320	MT077392	MT077460
	XH18061402	江西省全南县	MT077321	MT077393	MT077461
	XH18062801	江西省永丰县	MT077322	MT077394	MT077462
	XH18062802	江西省永丰县	MT077323	MT077395	MT077463
	XH01	江西省安福县	MT077324	MT077396	MT077464
	XH18071301	江西省龙南县洒泾	MT077325	MT077397	MT077465
	XH18062701	江西省永丰县鹿冈乡	MT077326	MT077398	MT077466
	XH18062301	江西省横峰县	MT077327	MT077399	MT077467
网络崖豆藤	WL18060201	江西省龙南县里仁镇	MT077328	MT077400	MT077468
	WL18060301	江西省龙南县关西镇	MT077329	MT077401	MT077469
	WL18062701	江西省永丰县鹿冈乡	MT077330	MT077402	MT077470
	WL18062702	江西省永丰县鹿冈乡	MT077331	MT077403	MT077471
	WL18071801	江西省永丰县鹿冈乡	MT077332	MT077404	MT077472
	WL18071802	江西省永丰县鹿冈乡	MT077333	MT077405	MT077473
	WL18062801	江西省永丰县白鹭艘下	MT077334	MT077406	MT077474
	WL18063001	江西省永丰县藤田	MT077335	MT077407	MT077475
	WL18063002	江西省永丰县藤田	MT077336	MT077408	MT077476
	WL18071901	江西省永丰县潭城乡	MT077337	MT077409	MT077477
	WL18062301	江西省横峰县	MT077338	MT077410	MT077478
	WL18062801	江西省湾里区	MT077339	MT077411	MT077479
	WL18062802	江西省湾里区	MT077340	MT077412	MT077480
	WL18062803	江西省湾里区	MT077341	MT077413	MT077481
	WL18092801	江西省丰城市铁路镇	MT077342	MT077414	MT077482
	WL18092802	江西省丰城市铁路镇	MT077343	MT077415	MT077483
	WL18112401	江西省广丰县崇高乡	MT077344	MT077416	MT077484
	WL01	四川省南川植物园	MT077345	MT077417	MT077485

续表 1

种名	样品编号	采集地	登录号		
			ITS2	matK	psbA-trnH
丰城鸡血藤	FC18092801	江西省丰城市铁路镇	MT077346	MT077418	MT077486
	FC18092802	江西省丰城市铁路镇	MT077347	MT077419	MT077487
	FC18092803	江西省丰城市铁路镇	MT077348	MT077420	MT077488
	FC18092804	江西省丰城市铁路镇	MT077349	MT077421	MT077489
厚果崖豆藤	HG01	江西中医药大学神农园	MT077355	MT077422	MT077497
	HG02	四川省南川植物园	MT077356	MT077423	MT077498
	HG03	重庆四面山	MT077357	MT077424	MT077499
	HG04	西双版纳大河边村	MT077358	MT077425	MT077500
常春油麻藤	CC18092801	江西省南昌市梅岭	MT077359	MT077431	MT077495
	CC18092802	江西中医药大学	MT077360	MT077432	MT077496
白花油麻藤	BH01	广州	MT077361	MT077433	MT077501
	BH02	广州	MT077362	MT077434	MT077502
滇鸡血藤	DJXT01	云南省临沧市云县	MT077374	MT077445	MT077511
	DJXT02	云南省临沧市云县	MT077375	MT077446	MT077512
	DJXT03	云南省临沧市云县	MT077376	MT077447	MT077513
南五味子	NW18112401	江西省宁都县洛口镇	MT077352	MT077428	MT077492
	NW02	江西中医药大学神农园	MT077353	MT077429	MT077493
	NW03	江西中医药大学神农园	MT077354	MT077430	MT077494
大血藤	DXT01	江西省九江柴桑区	MT077350	MT077426	MT077490
	DXT02	江西省永新县	MT077351	MT077427	MT077491
白花酸藤果	BH19102601	西双版纳大河边村	MT077380	MT077448	MT077514
	BH19102602	西双版纳大河边村	MT077381	MT077449	MT077515

总 DNA 提取试剂盒提取总 DNA; 其中药材 DNA 提取条件根据《中国药典》2010 年版第三增补本中药材 DNA 条形码分子鉴定法指导原则进行优化。ITS2、ITS、psbA-trnH、matK 及 rbcL 扩增所用引物及 PCR 反应条件见表 2。各基因片段的 PCR 扩增在 Bio-PCR

仪上完成, PCR 反应体系为 25 μL : 12.5 μL 2 $\times$ Pfu Taq MasterMix, 9.7 μL ddH₂O, 0.4 μL 10 $\mu\text{mol/L}$ 正反引物, 2.0 μL 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ DNA 模板。PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测, 将条带明亮、单一且清晰的 PCR 产物送至上海生工生物有限公司测序。

表 2 PCR 扩增引物与扩增程序

Table 2 PCR amplification primers and procedures

条形码序列	引物名称	碱基序列 (5'→3')	扩增程序
ITS2	2F	ATGCGATACTTGGTGTGAAT	94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s (30 个循环); 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min
	3R	GACGCTTCTCCAGACTACAAT	
matK	F	CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG	95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s; 56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min (40 个循环) 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min
	R	ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGGTTC	
psbA-trnH	psbAF	GTTATGCATGAACGTAATGCTC	95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1.5 min (30 个循环); 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min
	trnHR	CGCGCATGGTGGATTCAACAATCC	
rbcL	F	ATGTCACCACAAACAGAAACT	95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 3 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s; 62 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min (40 个循环) 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min
	R	TCGCATGTACCTGCAGTAGC	
ITS	1F	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min (35 个循环); 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min
	4R	TCCTCCGCTTATTGATATGC	

2.2 数据处理

测序峰图采用 CodonCode Aligner 8.0.2 软件进行拼接校对, 采用基于隐马尔科夫模型的 HMMer 注释方法去除 5.8 S 和 28 S 序列, 得到准确的 ITS2 间隔区序列; 测序所得的 matK 和 psbA-trnH 序列峰图, 去除引物区和低质量区, 并根据注释文件剪切获得完整序列。将所获序列使用软件 MEGA 7.0 进行分析对比, 同时基于 K2P 双参数模型计算种内种间遗传距离。将获得的完整序列建立 Mrbayes 系统发育树, 并基于贝叶斯原理结合 Phylosuite 软件构建多基因联合的系统发育树。采用相似性搜索法 BLAST 对序列鉴定能力进行评估。

3 结果与分析

3.1 扩增成功率及测序成功率

扩增成功率是指扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检验有明亮、单一条带样本的比例。测序成功率是指扩增产物可获得高质量样本的比例。5 对通用引物的扩增成功率和测序成功率见图 1。在 72 个样本中, ITS2 的扩增成功率和测序成功率均为 100%, matK 和 psbA-trnH 的测序成功率分别 94.4% 和 91.7%; 而 rbcL 和 ITS 的测序成功率仅为 69.4% 和 61.1%。rbcL 和 ITS 序列扩增不成功的样品经多次更改扩增条件, 如降低退火温度等仍无法扩出明亮、单一条带; 测序不成功的样品经多次测序仍出现无规则的重叠峰。因此, 后续实验数据分析以 ITS2、matK 和 psbA-trnH 为主。

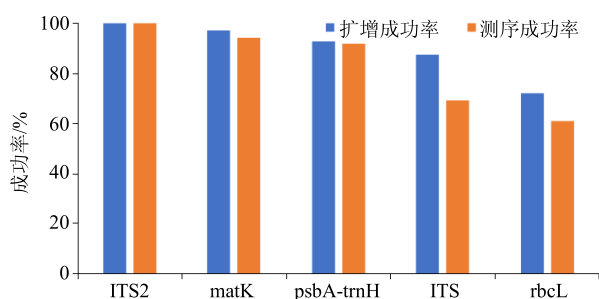


图 1 扩增成功率和测序成功率

Fig. 1 PCR amplification success rate and sequencing success rate

3.2 序列信息和变异分析

本实验共获得 72 条 ITS2 序列, 序列长度为 207~234 bp, GC 含量为 56.0%~70.5%; 获得 68 条 matK 序列, 序列长度为 787~823 bp, GC 含量为 26.8%~36.0%; 获得 66 条 psbA-trnH 序列, 序列长度为 214~441 bp, GC 含量为 21.1%~39.7%

(表 3)。运用 MEGA 7.0 软件对鸡血藤、香花崖豆藤等分别进行比对, 得到各物种的种内变异位点信息。ITS2 序列: 鸡血藤在 17、33、38、176、185 bp 处存在 C-T 变异, 22、108、155 bp 处存在 G-A 变异, 128 bp 处存在 A-G 变异, 83 bp 处存在 T-C 变异; 网络崖豆藤在 23、80、200 bp 处存在 C-T 变异, 206 bp 处存在 A-G 变异; 丰城崖豆藤在 199 bp 处存在 T-A 变异; 厚果崖豆藤在 99、107、140 bp 处存在 C-T 变异, 207 bp 处存在 G-C 变异。matK 序列中, 鸡血藤在 458、525 bp 处存在 C-T 变异, 586 bp 处存在 T-G 变异; 香花崖豆藤在 769 bp 处存在 A-T 变异, 770 bp 处存在 T-G 变异, 771 bp 处存在 G-A 变异; 网络崖豆藤在 146、643 bp 处存在 A-T 变异, 542 bp 处存在 C-A 变异; 丰城崖豆藤在 803 bp 处存在 G-A 变异; 厚果崖豆藤在 82 bp 处存在 A-C 变异; 白花油麻藤在 798 bp 处存在 A-T 变异; 南五味子在 643 bp 处存在 A-T 变异, 801 bp 处存在 G-C 变异。psbA-trnH 序列: 鸡血藤在 61~63 bp 处存在 T-A 变异; 网络崖豆藤在 213 bp 处存在 T-G 变异, 300 bp 处存在 C-A 变异; 厚果崖豆藤在 3 bp 处存在 C-T 变异, 13 bp 处存在 T-G 变异, 126 bp 处存在 T-C 变异, 253 bp 处存在 A~G 变异。

3.3 DNA Barcoding gap 评估

使用 MEGA 7.0 计算 ITS2、matK 和 psbA-trnH 序列的种间、种内的遗传距离, 基于 K2P 遗传距离模型, 计算样品平均种间、种内遗传距离。ITS2 序列的种间平均遗传距离为 0.487, 种内平均遗传距离为 0.008; matK 序列的种间平均遗传距离为 0.196, 种内平均遗传距离为 0.001; psbA-trnH 序列的种间平均距离为 0.417, 种内平均遗传距离为 0.004。统计分析样品种间及种内遗传距离, 得出遗传距离分布图 (图 2)。

理想 DNA 条形码种内遗传距离应明显小于种间距离, 两者之间存在明显的界限, 即 “barcoding gap”。鸡血藤及其混伪品 DNA 条形码候选序列中 ITS2、matK 和 psbA-trnH 序列具有较小的种内变异和较大的种间变异。ITS2 序列中的种间种内遗传距离个别重叠, 但重叠比例小, 有明显的 barcoding gap; matK 序列的种内种间遗传距离个别重叠, 但种间变异位点少, 种间遗传距离小, 致使 barcoding gap 亦不明显; psbA-trnH 序列的种内种间遗传距离有少数重叠, 但 barcoding gap 较 matK 明显。ITS2 序列保守稳定且具有明显的 barcoding gap, 更适合

表 3 鸡血藤及其混伪品 ITS2、matK 和 psbA-trnH 的序列特征

Table 3 Sequence characteristics of ITS2, matK and psbA-trnH in *Spatholobi Caulis* and its adulterants

物种	ITS2			matK			psbA-trnH		
	序列长度/bp	GC/%	种内变异位点数	序列长度/bp	GC/%	种内变异位点数	序列长度/bp	GC/%	种内变异位点数
鸡血藤	207	67.6~70.5	10	791	27.6	3	297	21.1~21.6	3
美丽密花豆	219	69.4	0	823	27.8	0	332	24.7	0
香花崖豆藤	221	59.3	0	787	29.5~29.6	3	310	24.5	0
网络崖豆藤	233	65.7~67.0	4	789	30.0~30.2	3	441	23.1~23.4	2
丰城鸡血藤	221	59.3	1	819	30.4	1	310	24.5	0
厚果崖豆藤	221	56.0~57.0	4	788	27.5~27.6	1	256	20.5~21.7	4
常春油麻藤	212	69.8	0	794	26.8	0	300	23.3	0
白花油麻藤	212	68.4	0	822	27.4	1	295	24.4	0
滇鸡血藤	231	59.7	0	804	35.8	0	286	34.0	0
南五味子	231	60.6	0	802	35.8~36.0	2	246	32.1	0
大血藤	234	67.5	0	793	35.4	0	214	39.7	0
白花酸藤果	217	62.2	0	819	34.0	0	486	28.6	0

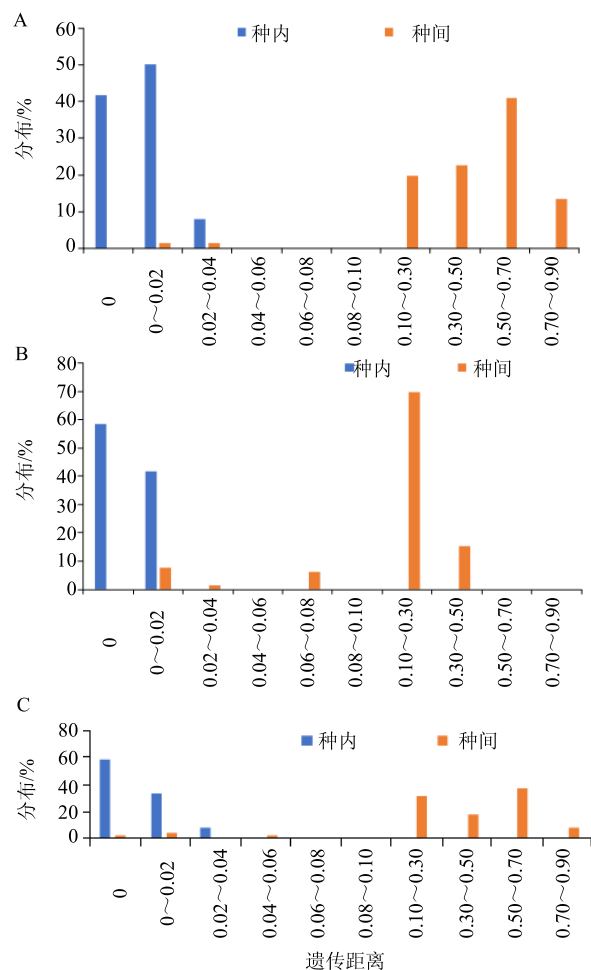


图 2 ITS2 (A)、matK (B) 和 psbA (C) 的遗传距离分布
Fig. 2 Distribution of genetic divergence of ITS2 (A), matK (B), and psbA (C)

作为鸡血藤及其混伪品鉴定的 DNA 条形码。

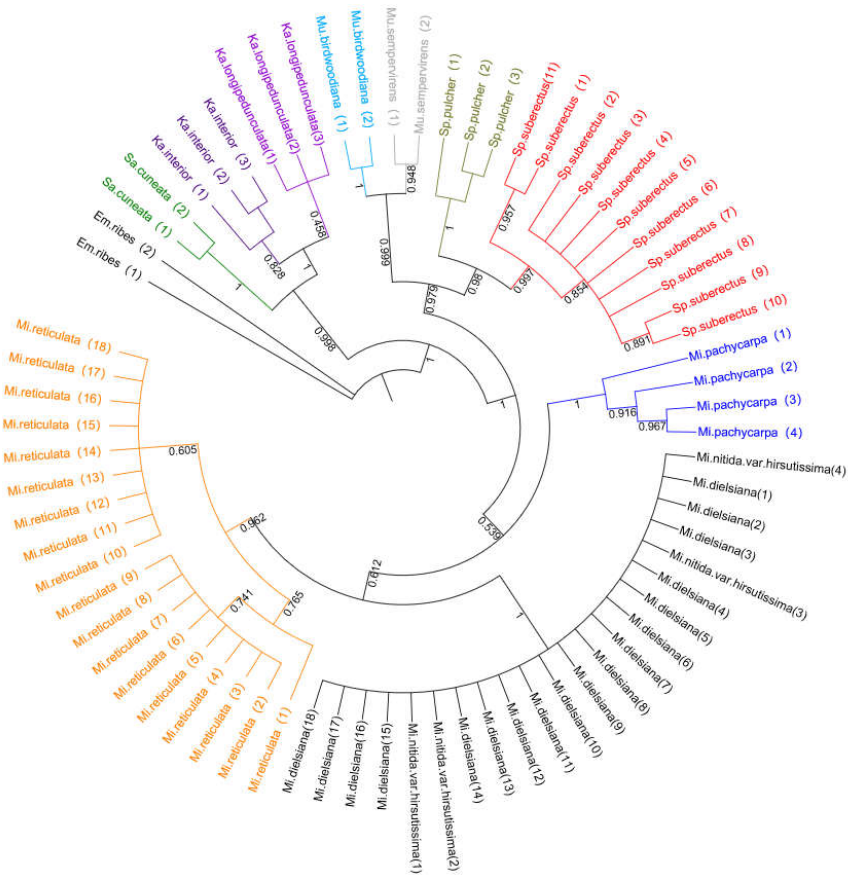
3.4 系统发育树

利用 Phylosuite 软件对 ITS2、matK 和 psbA-trnH 3 对条形码序列分别构建 Mrbayes 系统发育树。如图 3 所示, ITS2 和 psbA-trnH 将系统发育树分为 11 支, 而 matK 将滇鸡血藤(内南五味子)和与其亲缘关系相近的南五味子聚为一支, 仅分为 10 支, 不能很好地反映不同物种间的遗传变异。ITS2 和 psbA-trnH 能将滇鸡血藤和南五味子聚为不同分支; 鸡血藤和同属美丽密花豆明显聚为不同分支; 同时也能将鸡血藤同鸡血藤混伪品香花崖豆藤、丰城鸡血藤和网络崖豆藤明显区分开。ITS2 和 psbA-trnH 单基因系统发育树能将鸡血藤与其混伪品明显聚为不同分支, 并且具有较高的后验概率, 可靠性高, 因此, ITS2 和 psbA-trnH 更利于鸡血藤及其混伪品的鉴定。

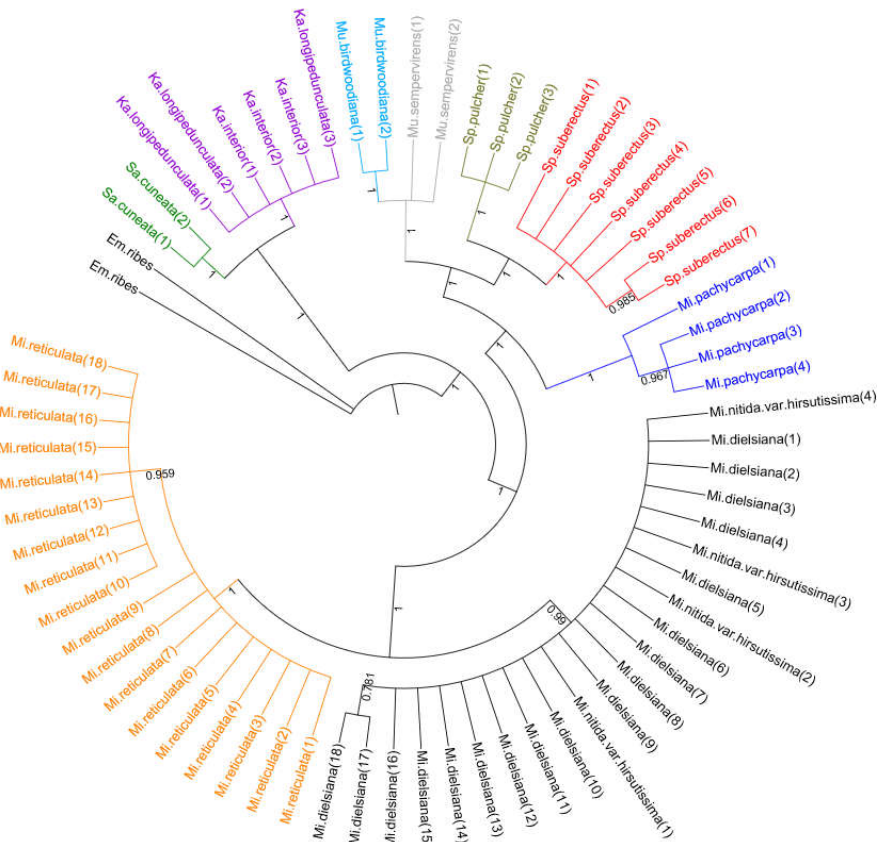
3.5 多基因联合构建系统发育树

利用 Phylosuite 将 ITS2、matK 和 psbA-trnH 3 对 DNA 条形码联合构建 ITS2-matK-psbA-trnH (I-M-P) 贝叶斯系统发育树。结果如图 4, 系统发育树分为 11 支, 具有较高的后验概率, 鸡血藤单独聚为一支, 能与其混伪品明显区分开来。I-M-P 系统发育树的拓扑结构与 ITS2 和 psbA-trnH 相同, 与 matK 不同, 而且 ITS2 较 psbA-trnH 而言, 种内种间遗传距离重叠更少, barcoding gap 更明显。因此, ITS2 和 psbA-trnH 较 matK 更适于鸡血藤及其混伪

A



B



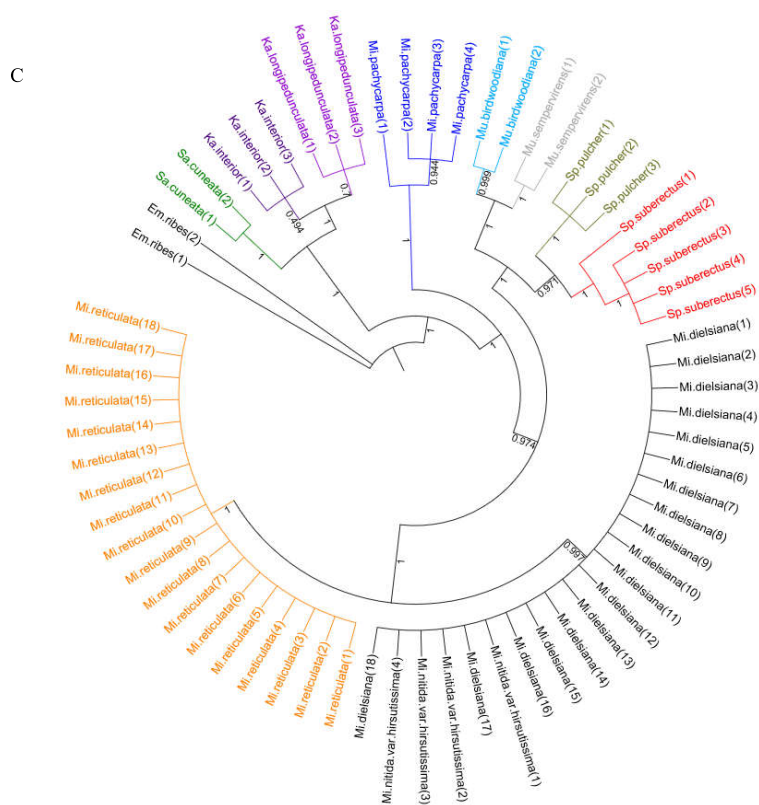


图 3 ITS2 (A)、matK (B) 和 psbA (C) 的贝叶斯系统发育树
Fig. 3 Mrbayes phylogenetic tree of ITS2 (A), matK (B), and psbA (C)

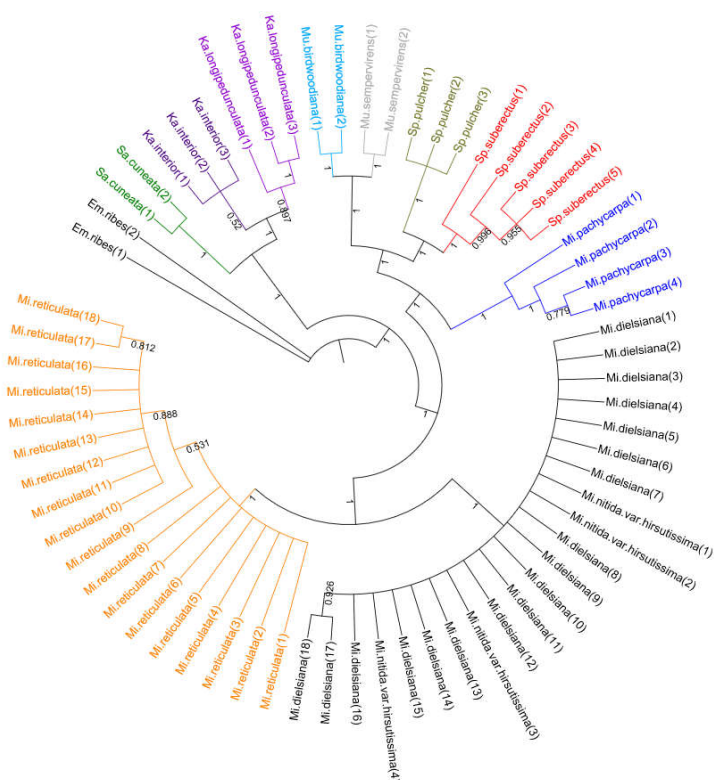


图 4 多基因联合 (I-M-P) 贝叶斯系统发育树
Fig. 4 Multi-gene (I-M-P) Mrbayes phylogenetic tree

品的鉴定, 尤以 ITS2 的效果更佳。

4 讨论

鸡血藤作为一种具有补血活血、调经止痛、舒筋活络的中药在中国沿用千年, 但其混伪品较多、基原植物的界定存在较大争议、亲缘关系不清晰, 严重影响了临床用药的有效性和安全性。目前, 对于鸡血藤及其混伪品的鉴定, 主要是采取性状鉴别和理化鉴别等传统方法, 但这些方法的鉴定标识在生物学上是物种的遗传表现型, 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。DNA 条形码技术近年来已发展为中药鉴定的新技术, Yu 等^[15]从 5 种标准 DNA 条形码中比较各序列扩增成功率及鉴定率, 发现 ITS2 最适于海风藤药材的鉴定。周红等^[16]利用 psbA-trnH 序列对鸡血藤、滇鸡血藤及大血藤等血藤类药材进行鉴定研究, 发现 psbA-trnH 种内序列相似度高, 均高于它们与混伪品间的序列相似性, 可成功用于血藤类药材的鉴定。因此, 本实验通过比较 ITS2、matK、psbA-trnH、rbcL 和 ITS 5 种标准的鉴定效果, 筛选最适于鸡血藤及其混伪品的 DNA 条形码序列, 寻找最快速、准确的鉴定方法, 为鸡血藤临床用药的安全性和合理使用的准确性提供依据。

理想的 DNA 条形码序列应能够使用单引物对进行扩增, 通过测序得到高质量的序列, 同时具有显著的种间差异和较小的种内变异^[17]。对鸡血藤及其混伪品的不同序列分析, 综合扩增、测序成功率, 种内、种间 Barcoding gap 分析和贝叶斯系统发育树分析得出, ITS2 具有明显的优势, psbA-trnH 次之。在多次重复实验过程中, 发现 rbcL 和 ITS 序列在鸡血藤及其混伪品的测序成功率较低, 仅为 69.4% 和 61.1%, 获得的序列不足以进行后续数据分析。matK 序列在扩增上具有一定优势, 测序成功率达 94.4%, 但出现较多 Poly 结构, 平均 GC 含量仅为 30%, 变异位点少, 不能将滇鸡血藤和同属植物南五味子区分开。在结果分析中发现, 3 对条形码序列都无法将香花崖豆藤和丰城崖豆藤区分开。笔者在参与全国中药资源普查江西试点(丰城)时, 发现香花崖豆藤和丰城崖豆藤表观特征相似。分析原因可能是在这 3 对序列中香花崖豆藤和丰城崖豆藤保守性好, 没有变异信息位点, 因此两者的分子生物学鉴定

还有待深入的研究。

构建系统发育树的方法多种多样, 包括 Neighbor-joining (NJ) 法、最大似然法和贝叶斯法 (MrBayes) 等, 其中贝叶斯法建树的速度最慢, 但准确性最高。随着测序技术的发展, 对于系统发育的分析已逐渐由单基因发展至多基因联合分析。Phylosuite 软件不仅可以进行单基因序列建立贝叶斯系统发育树, 还可串联多个不同的基因序列, 选择最优分化模型, 建立多基因联合系统发育树^[18]。本实验通过构建 ITS2-matK-psbA-trnH 多基因联合贝叶斯系统发育树, 发现其与 ITS2 和 psbA-trnH 的结果相同, 均能将鸡血藤及其混伪品区分开, 进一步验证 ITS2 和 psbA-trnH 单基因建树的准确性。因此, 以 ITS2 为主、psbA-trnH 序列为辅的鉴定方法能够对鸡血藤及其混伪品进行快速、准确的鉴定, 为鸡血藤临床用药的安全性和合理使用的准确性提供理论依据。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 郑立雄, 丁艳芬, 杨崇仁. 鸡血藤的品种与考证 [J]. 中国现代中药, 2012, 14(2): 22-30.
- [3] 中国医学科学院药物研究所. 中药志 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1960.
- [4] 肖培根. 新编中药志 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2001.
- [5] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 2004.
- [6] 符影, 程悦, 陈建萍, 等. 鸡血藤化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2011, 42(6): 196-201.
- [7] 陈道峰, 徐国钧, 徐珞珊, 等. 鸡血藤的性状鉴定 [J]. 中药材, 1993, 16(8): 21-24.
- [8] 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.
- [9] Hebert P D, Cywinska A, Ball S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes [J]. *Proc Royal Soc B Biol Sci*, 2003, 270(1512): 313-321.
- [10] Hollingsworth P M, Li D Z, Bank M V D, et al. Telling plant species apart with DNA: From barcodes to genomes [J]. *Philos Trans Royal Soc B*, 2016, 371(1702): 20150338.
- [11] Group CPW. A DNA barcode for land plants [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(31): 12794-12797.
- [12] Chen S, Yao H, Han J, et al. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant

- species [J]. *PLoS One*, 2010, 5(1): 8613.
- [13] Hollingsworth P M. Refining the DNA barcode for land plants [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108 (49): 19451-19452.
- [14] 陈士林, 姚 辉, 韩建萍, 等. 中药材 DNA 条形码分子鉴定指导原则 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(2): 141-148.
- [15] Yu N, Gu H, Wei Y L, *et al*. Suitable DNA Barcoding for identification and supervision of *Piper kadsura* in Chinese medicine markets [J]. *Molecules*, 2016, 21(9): 1221-1232.
- [16] 周 红, 马双姣, 陈贝贝, 等. 鸡血藤、滇鸡血藤、大血藤等血藤类药材的 *psbA-trnH* 条形码分子鉴定 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2016, 18(1): 40-45.
- [17] CBOL Plant Working Group. A DNA barcode for land plants [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 12794-12797.
- [18] Zhang D, Gao F, Ivan Jakovlić, *et al*. PhyloSuite: An integrated and scalable desktop platform for streamlined molecular sequence data management and evolutionary phylogenetics studies [J]. *Mol Ecol Resources*, 2020, 20(1): 348-355.