

基于 matK 序列的积雪草与其易混品的分子鉴定方法分析

魏艺聪 陈建雄 黄泽豪 卢 伟 车苏容 梁一池

(福建中医药大学药学院,福州,350122)

摘要 目的:积雪草容易与多种混淆品相互混淆,本研究拟基于 matK 序列探讨积雪草与其混淆品鉴定的新方法。方法:从 GenBank 核酸数据库下载积雪草、过路黄、连钱草和乌蕪莓的 matK 序列,应用 ClustalX 2.1 软件进行 SNP 鉴别位点分析,应用 MEGA5.0 软件计算种内种间(K2P)遗传距离和构建邻接(NJ)系统聚类树。结果:获得积雪草与过路黄各 5 个 matK 序列及连钱草和乌蕪莓各 1 个 matK 序列,分析显示积雪草与其混淆品的 matK 序列存在较大差异,具有近百个 SNP 位点,且其中多是积雪草特有的,可用于分子鉴定。且积雪草最大种内 K2P 遗传距离 0.001,远远小于其与混淆品的种间 K2P 遗传距离 0.242~0.293,构建的系统发育树显示积雪草与其混淆品可明显分开。结论:综合以上分析,matK 序列为鉴定积雪草及其混淆品提供了新的分子鉴定方法。

关键词 积雪草;混淆品;matK 序列;分子鉴别

Identification of *Centella asiatica* and adulterated Species Based on GenBank Nucleotide Database matK Sequence

Wei Yicong, Chen Jianxiong, Huang Zehao, Lu wei, Che surong, Liang Yichi

(College of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China)

Abstract **Objective:** To identify *Centella asiatica* and adulterated Species by using GenBank nucleic acid database matK sequences. **Methods:** Based on GenBank Nucleotide Database, matK sequences of *Centella asiatica* and adulterated Species were downloaded. The SNP sites were checked by ClustalX 2.1 software, K2P Distances were calculated using MEGA 5.0 software and neighbor-joining (NJ) phylogenetic tree was established. **Results:** There many specific SNP sites can be used to molecular authentication of *Centella asiatica* and adulterated Species. K2P genetic distance between *Centella asiatica* and adulterated Species is between 0.242~0.293, which was far more than intraspecific genetic distance of *Centella asiatica* (0.001) and adulterated Species (0.004). Results of NJ phylogenetic tree showed that *Centella asiatica* can be separated from adulterated Species and classified into a separate one. **Conclusion:** matK sequence is suitable for the identification of *Centella asiatica* and adulterated Species and provides reference for quality and safety identification of *Centella asiatica* and adulterated Species.

Key Words *Centella asiatica*; Adulterated Species; matK sequence; Identification

中图分类号:R282.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2016.01.040

积雪草(*Centella asiatica* (L.) Urban)为伞形科积雪草属植物,《中华人民共和国药典》收载的积雪草又称落得打、半边钱、破铜钱、崩大碗、马蹄草等。具有清热利湿、解毒消肿之功效,被应用于治疗跌打损伤、湿热黄疸、中暑腹泻、痈肿疮毒、流行性脑脊髓膜炎与传染病肝炎等疾病^[1-3]。已有研究表明,积雪草含有丰富的五环三萜皂苷类,其中积雪草苷与积雪草酸被作为评价积雪草质量的指标成分,由于不同产地积雪草的有效成分含量有较大差异,仅凭化学成分,较难确定药材的基原,特别过路黄(*Lysimachia christinae* Hance)、连钱草(*Glechoma longituba* (Nakai) Kupr)与乌蕪莓(*Cayratia japonica* (Thunb.)

Gagnep)等常因为形态相似等原因,常引起相互混淆^[2-3]。

近几年来,DNA 条形码分析技术为物种鉴定提供了可靠的识别方法,已被广泛应用于中药基原的分子鉴定。其中,matK 基因是编码参与 RNA 转录本中 II 型内含子剪切的成熟酶(Maturase)的单拷贝编码基因,位于叶绿体赖氨酸 tRNA 基因(trnK)高度保守的 2 个外显子之间的内含子中,序列长度约 1500 bp,在几乎所有的种子植物中都有分布,是叶绿体基因组中进化最快的编码基因之一,matK 序列可在科、属水平为研究类群内部的系统重建提供了较多的信息^[4-5]。在物种、种下水平,matK 常和

基金项目:中医药公益性行业专项(编号:201407002)

作者简介:魏艺聪(1981—),福建漳浦人,讲师,硕士,研究方向为中药生物技术,E-mail:yicongwei@126.com

通信作者:车苏容,副教授,主要从事中药材鉴定研究,E-mail:8612040@qq.com

rbcL、ITS 联合使用,用于密切相关物种的系统发育关系研究^[6-7]。2009 年,生物条形码联盟(组根据引物通用性、序列测序质量及物种鉴定效率,推荐 matK 为植物 DNA 条形码研究的核心 DNA 条形码序列之一,matK 基因也被用于药用植物的分子鉴定研究^[8-9]。本研究应用 matK 条形码对易混品种积雪草与其易混品过路黄、连钱草与乌荛莓进行鉴定分析,旨在为积雪草与过路黄、连钱草与乌荛莓等易混品的快速准确鉴定及其准确应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 样本 从 GenBank[GenBank 为美国国家生物技术信息中心(NCBI)建立的 DNA 序列数据库]下载积雪草(*Centella asiatica* (L.) Urban)与其易混品过路黄(*Lysimachia christinae* Hance)、连钱草(*Glechoma longituba*(Nakai) Kupr)与乌荛莓(*Cayratia japonica* (Thunb.) Gagnep) matK 基因序列。其中,获不同来源的积雪草与过路黄 matK 序列各 5 条,连钱草与乌荛莓 matK 序列各 1 条;样品采集信息及 matK 序列的 GenBank 登录号见表 1。

表 1 样品采集信息及 matK 序列 GenBank 登录号

编号	名称	拉丁学名	GenBank 登录号
1	积雪草	<i>Centella asiatica</i>	JN407219.2
2	积雪草	<i>Centella asiatica</i>	JN407217.2
3	积雪草	<i>Centella asiatica</i>	JN407218.1
4	积雪草	<i>Centella asiatica</i>	JQ024945.1
5	积雪草	<i>Centella asiatica</i>	GQ434231.1
6	过路黄	<i>Lysimachia christinae</i>	JF954442
7	过路黄	<i>Lysimachia christinae</i>	JF954443
8	过路黄	<i>Lysimachia christinae</i>	JF954440
9	过路黄	<i>Lysimachia christinae</i>	JF954441
10	过路黄	<i>Lysimachia christinae</i>	JF954439
11	乌荛莓	<i>Cayratia japonica</i>	HG004950.1
12	连钱草	<i>Glechoma longituba</i>	FJ513163.1

1.2 序列处理 ClustalX 2.1 是多重序列比对程序,可为进行 DNA 序列的多重序列和轮廓比对和分析。本实验所获所有不同来源的 matK 序列应用 ClustalX 2.1 软件进行多重比对,获得多重比对的 matK 序列,应用该序列应用后续分析。

1.3 数据分析 MEGA5.0 是构建分子进化树的主要软件,是图形化软件,使用非常方便。利用 MEGA5.0 软件进行种内种间 Kimura 2-parameter (K2P)遗传距离分析。采用 BLAST1、最近距离法(Nearsest distance)及构建邻接(NJ)系统聚类树受试样本进行鉴定分析。

2 结果

2.1 SNP 鉴别位点分析 经 ClustalX 2.1 软件进行

多重比对分析显示,所获 5 个不同来源的积雪草 matK 序列样本种内仅有 2 个 SNP 位点,所获 5 个不同来源的过路黄 matK 序列样本种内仅有 3 个 SNP 位点,而积雪草与分别其他 3 种易混品的 matK 序列的 SNP 位点多达近百个以上,其中多数 SNP 位点均属积雪草特异的,可作为积雪草 SNP 鉴别位点。见图 1。

2.2 种内种间遗传距离分析 应用 MEGA5.0 软件进行种内种间 Kimura 2-parameter (K2P)遗传距离分析表明,5 个受试积雪草样本 matK 序列的遗传距离为 0~0.001 之间,可见种内变异极小。5 个受试过路黄样本 matK 序列的遗传距离为 0~0.004 之间,种内变异也很小。而积雪草与其他 3 种混淆品的种间遗传距离在 0.242~0.293 之间,其中与乌荛莓遗传距离最近,达 0.242,而与连钱草的遗传距离最远,达 0.293。结果表明积雪草其他 3 种样本的种间遗传距离远大于积雪草的种内遗传距离。因此,matK 序列能够将积雪草与过路黄、连钱草与乌荛莓等 3 种混淆品区分开,该序列可用于鉴别条形码。

表 2 各样本 matK 序列的种内与种间遗传距离

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1												
2	0.000											
3	0.000	0.000										
4	0.001	0.001	0.001									
5	0.001	0.001	0.001	0.003								
6	0.282	0.282	0.282	0.284	0.284							
7	0.282	0.282	0.282	0.284	0.284	0.000						
8	0.282	0.282	0.282	0.284	0.284	0.000	0.000					
9	0.284	0.284	0.284	0.286	0.286	0.001	0.001	0.001				
10	0.286	0.286	0.286	0.289	0.289	0.003	0.003	0.003	0.003			
11	0.242	0.242	0.242	0.245	0.245	0.255	0.255	0.255	0.257	0.260		
12	0.291	0.291	0.291	0.293	0.293	0.349	0.349	0.349	0.351	0.354	0.300	

注:1~12 编号顺序同表 1,1~5 为:积雪草;6~10:过路黄;11:乌荛莓;12:连钱草。

2.3 系统聚类树鉴定结果 应用 Meg 5.0 软件构建 NJ 系统聚类树分析所获所有样本序列,进一步分析其相互近源关系。见图 2。NJ 系统聚类树结果显示 5 个不同来源的积雪草样本单独聚为一类,与过路黄等 3 种混淆品没有交叉。以上结果表明,matK 序列适用于积雪草与与过路黄等 3 种混淆品之间的鉴别,可为积雪草的准确应用提供鉴定依据。

3 小结

对积雪草及其混淆品的传统鉴别方法主要有基原的外部形态、显微结构和化学成分差异等方面^[1-2]。近年来,阮元等利用 RAPD 等技术对积雪草及其混淆品进行分子鉴定,获得可用于鉴别积雪草的 RAPD 差异条带,可用于鉴别积雪草及其伪

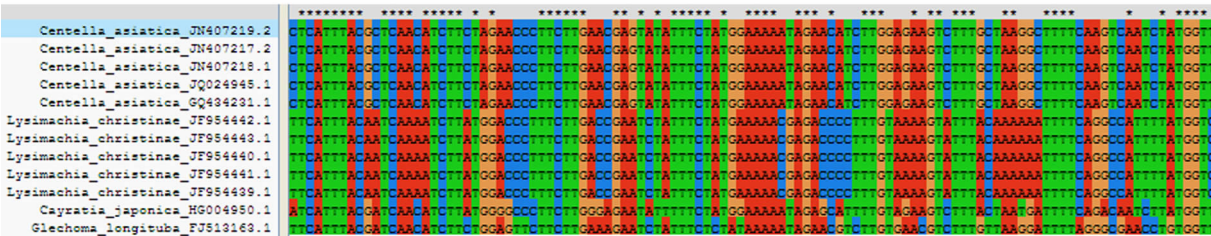


图1 积雪草与其3种混淆品的 matK 序列多重比对

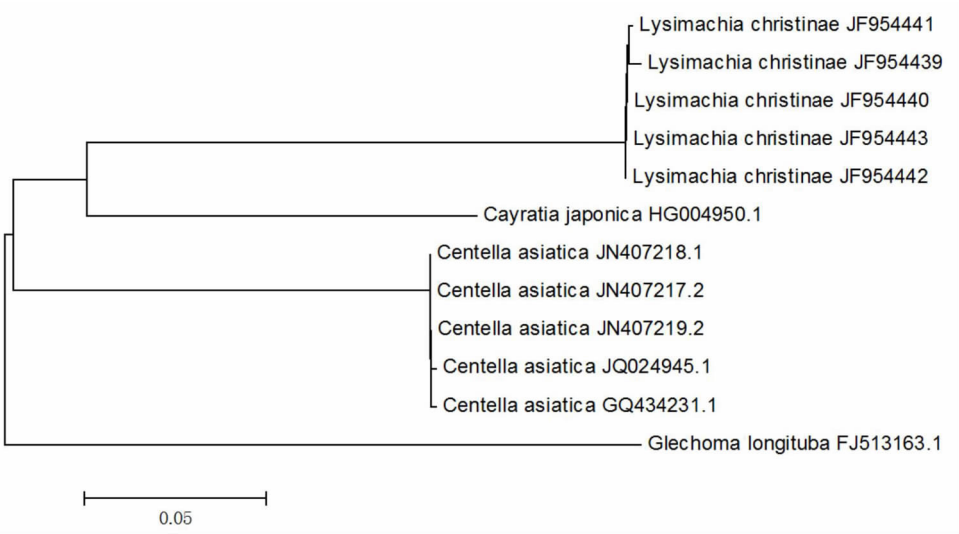


图2 基于 NJ 法构建 matK 序列的积雪草与其3种混淆品的系统聚类树

品^[3]。但由于 RAPD 等技术所用引物是随机引物,扩增效果不够稳定,重复性差,较难形成统一的标准进行准确鉴定。近几年来,DNA 条形码技术以其鉴定结果的可靠性与稳定性高,易于形成统一的操作标准,已经被广泛应用中药基原的鉴定。本研究以植物叶绿体 DNA 中 matK 基因序列作为对积雪草及其混淆品中的 DNA 条形码进行了分析。结果显示,积雪草与其混淆品的 matK 序列存在较大差异,具有近百个 SNP 位点,且其中多是积雪草特有的,可用于分子鉴定。且积雪草最大种内 K2P 遗传距离 0.001 远远小于其与混淆品的种间 K2P 遗传距离 0.242~0.293,构建的系统发育树显示积雪草与其混品可明显分开。总之,作为 DNA 条形码的 matK 序列为准确、简便地鉴定积雪草及其混淆品提供了新的分子鉴定方法。

参考文献

[1]陈瑶,秦路平,郑汉臣,等. 积雪草的资源分布与生药鉴别[J]. 中国中药杂志,2000,25(4):199-202.

[2]林锦明,陈瑶,郑汉臣,等. 差热分析法鉴别积雪草及其混淆品[J]. 中药材,2001,24(7):483-484.
[3]阮元,莫荣浩,李敏,等. RAPD 技术分析积雪草的分子标记特征[J]. 中药材,2008,31(7):970-973.
[4]Plunkett G, Soltis D, Soltis P. Clarification of the relationship between Apiaceae and Araliaceae based on matK and rbcL sequencedata[J]. Am J Bot, 1997, 84(4):565-565.
[5]Specht C D, Kress W J, Stevenson D W, et al. A molecular phylogeny of Costaceae (Zingiberales)[J]. Mol Phylogenet Evol, 2001, 21(3):333-345.
[6]Stanford A M, Harden R, Parks C R. Phylogeny and biogeography of Juglans (Juglandaceae) based on matK and ITS sequence data[J]. Am J Bot, 2000, 87(6):872-882.
[7]Kress W J, Wurdack K J, Zimmer E A, et al. Use of DNA barcode to identify flowering plants[J]. PNAS, 2005, 102(23):8369-8374.
[8]刘静,何涛,淳泽. 药用石斛的叶绿体 matK 基因序列分析及鉴别[J]. 药学报, 2009, 44(9):1051-1055.
[9]陈士林,宋经元,姚辉,等. 药用植物 DNA 条形码鉴定策略及关键技术分析[J]. 中国天然药物, 2009, 7(5):322-327.

(2016-01-22 收稿 责任编辑:洪志强)