

基于DSS标记特异性PCR鉴别冷背药材木槿皮基原植物及其混伪品

刘亚男¹, 华中一², 赵玉洋², 金艳², 彭华胜^{1,2}, 蒋超^{2*}, 蒲靖哲³, 袁媛^{1,2*}

(1. 安徽中医药大学药学院, 合肥 230012;

2. 中国中医科学院中药资源中心道地药材国家重点实验室培育基地, 北京 100700;

3. 安徽食品药品检验研究院, 合肥 230051)

[摘要] 目的:冷背药材作为宝贵的药材资源,但因其本身的特殊性和复杂性,导致其鉴别成为中药鉴定中的难题,因此亟需建立冷背药材的鉴别方法。该研究利用DNA特征序列(DSS)标记,建立一种冷背药材木槿皮基原植物木槿及其混伪品的特异性聚合酶链式反应(PCR)鉴别方法。**方法:**基于叶绿体基因组序列分析获得木槿皮的候选DSS标记,使用DNA测序手段对DSS标记进行验证,基于得到的可靠DSS标记设计木槿皮基原植物特异性鉴别引物,对PCR反应条件进行优化,并进行耐受性和适用性的考察。**结果:**将扩增产物的测序结果与DSS比对后得到了1个可用于鉴定木槿的DSS标记,揭示了木槿正混伪品的区别特征,根据DSS标记设计出一对木槿正品特异性鉴别引物,使用该引物进行PCR扩增和凝胶电泳后木槿均出现约270 bp的单一明亮条带,而其4种混伪品均无此条带。**结论:**该研究得到的1个DSS标记可用于木槿的真伪鉴定,基于此DSS标记设计的特异性鉴别引物可准确、简便的鉴别木槿皮的基原植物及其混伪品,为木槿正伪品的分子鉴定提供了新的方法与思路。

[关键词] DNA特征序列标记;木槿皮;混伪品;特异性聚合酶链式反应(PCR)

[中图分类号] R284.2;R285;R289;R22;R2-031;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)17-0133-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221013

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220616.1529.006.html>

[网络出版日期] 2022-06-17 9:16

Specific PCR Identification of Hibisci Cortex and Its Adulterants Based on DNA Signature Sequence Tags

LIU Yanan¹, HUA Zhongyi², ZHAO Yuyang², JIN Yan², PENG Huangsheng^{1,2}, JIANG Chao^{2*},

PU Jingzhe³, YUAN Yuan^{1,2*}

(1. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China;

State Key Laboratory Breeding Base of Dao-Di Herbs, National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

3. Anhui Institute of Food and Drug Inspection, Hefei 230051, China)

[Abstract] **Objective:** Uncommon medicinal herbs are valuable medicinal resources, but their identification is a difficult problem in Chinese medicine due to their particularity and complexity. It is, therefore, urgent to establish a method for the identification of uncommon medicinal herbs. In this study, DNA signature

[收稿日期] 2022-01-29

[基金项目] 中国中医科学院科技创新工程重大攻关项目(C12021A041);国家科技部科技基础资源调查专项(2018FY100800);东城区优秀人才培养项目(2021-dchrcpyzz-7);青年岐黄学者项目

[第一作者] 刘亚男,在读硕士,从事中药鉴定研究,E-mail:3332744035@qq.com

[通信作者] *蒋超,博士,副研究员,从事中药分子鉴定研究,E-mail:jiangchao0411@126.com;

*袁媛,研究员,博士生导师,从事中药鉴定与分子生药学研究,Tel:010-64087649,E-mail:y_yuan0732@163.com

sequence (DSS) tags were used to establish a specific polymerase chain reaction (PCR) identification method for Hibisci Cortex, the origin plant of Hibisci Cortex, and its adulterants. **Method:** The candidate DSS tags were obtained from the chloroplast genome sequence analysis, and the DSS tags were verified by DNA sequencing. The specific identification primers for *H. syriacus* were designed based on the obtained reliable DSS tags. The PCR reaction conditions were optimized, and the tolerance and feasibility were investigated. **Result:** A DSS tag for identification of *H. syriacus* was obtained from the comparison of sequencing results of the amplified products with DSS, which revealed the distinguishing characteristics of Hibisci Cortex and its adulterants. A pair of specific primers for *H. syriacus* was designed according to the DSS tag. After PCR amplification and gel electrophoresis with the primers, a single bright band of about 270 bp was observed from *H. syriacus*, which did not appear in the four adulterants. **Conclusion:** A DSS tag obtained in this study can be used to identify *H. syriacus*. The specific primers designed based on this DSS tag can accurately and simply identify the original plant of Hibisci Cortex and its adulterants, which provides a new method and idea for the molecular identification of genuine and counterfeit products of Hibisci Cortex.

[**Keywords**] DNA signature sequence tag; Hibisci Cortex; adulterants; allele-specific polymerase chain reaction(PCR)

作为不常用或用量小的药材品种,冷背药材在中医临床中发挥独特的作用,也是中药材市场中最复杂的一部分。木槿皮是一种冷背药材,来源于锦葵科木槿 *Hibiscus syriacus* 的干燥茎皮或根皮,具有清热利湿、解毒止痒的功效,临床上常用于治疗肠风下血、痢疾、脱肛、白带、疥癣、痔疮等^[1]。木槿的花、叶、皮和果实均可入药,分别习称木槿花、木槿叶、木槿皮和木槿子,其中木槿花和木槿皮在临床上更为常用。

冷背药材的鉴别一直是中药质量控制中的难点问题,主要体现在以下几个方面:①冷背药材品种繁多,现在市场流通在售的有1 500~2 000种,是大宗药材的3~4倍,甚至更多,同名异物或同物异名情况更甚。②来源复杂,正品及其混伪品性状特征类似,多不容易分辨,需要传统经验鉴定人员具有较高的专业技术水平。③研究基础薄弱,鉴别资料十分匮乏,严重影响了冷背药材的使用。如木槿皮原植物木槿 *H. syriacus* 属锦葵科木槿属植物,该属全世界约200多种,我国有24种^[2],常见的混伪品包括朱槿 *H. rosasinensis*、大麻槿 *H. cannabinus* 等。木槿及其近缘物种的外观形态比较相似,性状和显微方法难以准确鉴别,因此建立一种简便、快速、准确鉴别木槿皮基原物种的分子鉴定方法至关重要。

DNA作为遗传信息的直接载体,不受外界因素、组织器官差异等的影响,可从基因水平上提供鉴别依据^[3]。刘义梅等^[4]利用核糖体 rRNA 基因内转录间隔区(ITS)2序列对木槿及其混伪品进行鉴别,为木槿中药材的分子鉴定提供了依据,但常规

的测序技术在一般实验室无法开展,需依靠一些生物公司来完成。特异性聚合酶链式反应(PCR)鉴别方法通过设计物种的特异性鉴别引物,对目标物种进行扩增,根据电泳条带的有无而实现物种鉴别,具有操作简单、分析速度快、结果准确等特点^[5],近年来被广泛应用到中药材的分子鉴定中,然而目前有关木槿特异性PCR鉴别的研究较少。叶绿体基因组因其序列具有相对较高的保守性,基因进化率普遍较低^[6],常被用于药材正伪品鉴别方法的研究。本课题组前期基于叶绿体基因组数据库(CGIR)^[7]开发了DNA序列特征性片段鉴定软件IdenDSS^[8],借此可得到待鉴定物种的DNA特征序列(DSS)。DSS是与来源于其他分类单元相比,只出现在某个特定分类单元中的DNA序列,其长度约为40 bp。利用DSS建立的药材分子鉴定方法不依赖DNA序列相似度,准确度可达100%。因此本文拟基于CGIR,开发能有效鉴别木槿及其混伪品的DSS标记,根据正混伪品与DSS标记的序列比对结果设计特异性鉴别引物,并对影响PCR鉴别准确性的关键因素进行优化,以期建立准确、简便鉴别木槿正混伪品的DNA分子鉴定方法,为解决冷背药材名实混乱现象、近缘种间难鉴定等难题提供一定的参考,从而保证冷背药材的临床用药安全。

1 材料

本研究所用正伪品基原植物样品,取自第四次全国中药资源普查标本库,其中木槿10批,朱槿、木芙蓉、玫瑰茄、大麻槿各3批,凭证标本保存于中国中医科学院中药资源中心,见表1。木槿皮药材样

品6批(编号HSL1~6),由安徽省食品药品检验研究院提供,经金艳副研究员、蒋超副研究员鉴定。

表1 木槿及其伪品信息

Table 1 Information of *Hibiscus syriacus* and fakes

No.	植物名	拉丁名	标本号	采集地	编号
1	木槿	<i>Hibiscus syriacus</i>	451423LY0857	广西龙州县	HSL-1
2	木槿	<i>H. syriacus</i>	340721LY0805	安徽铜陵县	HSL-2
3	木槿	<i>H. syriacus</i>	341525LY0558	安徽霍山县	HSL-3
4	木槿	<i>H. syriacus</i>	341723LY0897	安徽青阳县	-
5	木槿	<i>H. syriacus</i>	620825LY0148	甘肃庄浪县	-
6	木槿	<i>H. syriacus</i>	350782LY1024	福建武夷山市	-
7	木槿	<i>H. syriacus</i>	350182LY0465	福建长乐市	-
8	木槿	<i>H. syriacus</i>	621223LY0124	甘肃宕昌县	-
9	木槿	<i>H. syriacus</i>	350722LY0278	福建浦城县	-
10	木槿	<i>H. syriacus</i>	130631LY0237	湖北望都县	-
11	朱槿	<i>H. rosasinensis</i>	441521LY0082	广东海丰县	HSL-4
12	朱槿	<i>H. rosasinensis</i>	522301LY0660	贵州兴义市	HSL-5
13	朱槿	<i>H. rosasinensis</i>	510322LY0302	四川富顺县	HSL-6
14	木芙蓉	<i>H. mutabilis</i>	341822LY0513	安徽广德县	HSL-7
15	木芙蓉	<i>H. mutabilis</i>	511921LY0256	四川通江县	HSL-8
16	木芙蓉	<i>H. mutabilis</i>	520325LY0785	贵州遵义市	HSL-9
17	玫瑰茄	<i>H. sabdariffa</i>	530827LY1136	云南孟连县	HSL-10
18	玫瑰茄	<i>H. sabdariffa</i>	431027LY0933	湖南桂东县	HSL-11
19	玫瑰茄	<i>H. sabdariffa</i>	431028LY0210	湖南安仁县	HSL-12
20	大麻槿	<i>H. cannabinus</i>	341503LY0584	安徽六安市	HSL-13
21	大麻槿	<i>H. cannabinus</i>	451424LY0483	广西大新县	HSL-14
22	大麻槿	<i>H. cannabinus</i>	411525LY0161	河南信阳市	HSL-15

Wonbio-48P型高通量植物组织研磨仪(上海万柏生物科技有限公司),VORTEX-2 GENIE型漩涡振荡仪(美国Scientific Industries公司),Eppendorf 5424型离心机(德国Eppendorf公司),Nanodrop 2000型微量核酸定量分析仪(美国Thermo Scientific公司),Veriti™型PCR仪、GeneAmp 9700型PCR仪(美国Applied Biosystem公司);TC-512型PCR仪(上海Techne公司);PTC-100型PCR仪(美国Gene公司);PowerPac™型电泳仪、凝胶成像仪(美国Bio-Rad公司)。

Hi-DNAsecure Plant Kit[天根生化科技(北京)有限公司,批号DP350];2×M5 PCR Mix(北京聚合美生物科技有限公司,批号MF164);2×Taq PCR Mix(金百特生物公司,批号P0195);SpeedSTAR HS Taq DNA聚合酶、LA Taq HS DNA聚合酶、6×loading buffer(日本Takara公司,批号分别为RR070A、RR042A、9156);Trans2K DNA Marker(北京全式金

生物技术有限公司,批号BM101);CelRed核酸染料(北京兰博利德公司,批号CR001)。

2 方法

2.1 基因组DNA提取 使用经70%乙醇擦拭的镊子取表1中植物样本适量,用高通量组织研磨仪打成粉末,取粉末约30 mg按照天根高效植物基因组DNA提取试剂盒进行DNA提取。用Nanodrop 2000型微量核酸定量分析仪测定其DNA浓度,并根据吸光度 $A_{260\text{ nm}/280\text{ nm}}$ 、 $A_{260\text{ nm}/230\text{ nm}}$ 判断DNA质量,用于后续PCR反应或-20℃保存备用。

2.2 引物设计 使用IdenDSS软件对木槿及其混伪品叶绿体基因组进行序列分析,获得木槿特有DSS标记。将鉴定得到的所有DSS按“position”列进行排序,筛选5个DSS标记进行验证;基于筛选的DSS设计引物,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,见表2。

2.3 PCR扩增及产物检测 分别使用上述5对引

表2 DSS及引物信息

Table 2 DSS and Primers in this experiment

编号	DSS序列信息	引物(5'-3')	长度/bp
DSS-1	ATTTAATCATCAGGGACTCCCAAGCGCACAAATTCTCTAC	上游 CCATAGGCTTTTCGCTTTTCGC 下游 CGACTAGTTCCGGGTTCGAG	372
DSS-2	TTCTACCCCCCTTTTTTTTTTTTATTTTTTTCCTAATCATT	上游 ACAAGAGCTGTCTTATAGCCA 下游 TCCCATTTTCAGCCGATTCA	311
DSS-3	ATAGTGAACCTCGATGGGAGCTTCTCTTGAAGCAATAACA	上游 GGGTCAGGAACTAGGGTCCT 下游 CCGGTGGCGACTAGATCAAT	318
DSS-4	TTGGAGCATAGTTGACGTTGAGTCTAAAGGATCTACCGCA	上游 TTTTTCGCGCTCTTGCTACG 下游 GGTAGAATGCCTTCCGCTGT	412
DSS-5	TGTGTACAAGCTCGTAATGAGGGACGTGACCTTGCAGCCA	上游 GCATATGCCTGCTTTGACCG 下游 AGGGTCGGCTCAATCCTTTT	415

物对5个物种的总DNA模板进行PCR扩增,PCR反应体系25 μL,包含2×M5 PCR Mix 12.5 μL,正、反向引物(10 μmol·L⁻¹)各0.4 μL,DNA模板2 μL,用无菌双蒸水补足剩余体积。PCR反应程序为95℃预变性3 min,40个循环(94℃变性15 s,55℃退火30 s,72℃延伸30 s),72℃终延伸5 min。PCR反应结束后,取反应产物5 μL点样于CelRed染色的1.5%琼脂糖凝胶上,以Trans2K DNA Marker作为DNA分子量标准,在200 V电压条件下进行凝胶电泳检测,取凝胶片置凝胶成像仪中观察。

2.4 PCR扩增产物测序 取阳性扩增产物送睿博兴科生物技术有限公司进行测序,将扩增产物的测序结果与DSS进行比对,判断筛选的5个DSS标记是否可用于木槿正混伪品的鉴定。

2.5 木槿特异性PCR鉴别条件的确立 PCR初始反应体系同2.3项下的反应体系,初始反应程序为95℃预变性3 min,35个循环(94℃变性15 s,63℃退火30 s,72℃延伸30 s),72℃终延伸5 min。对退火温度、循环数、Taq酶种类、PCR仪型号等影响鉴别特异性的核心因素进行考察,确定最佳反应体系和反应参数,并使用最佳条件对所有样品进行PCR鉴别,验证最佳反应体系和反应参数能否稳定、准确地鉴别木槿及其4种混伪品。

3 结果与分析

3.1 木槿及其混伪品DSS标记的验证 使用设计的DSS标记扩增引物对木槿及其混伪品共15批样本进行PCR扩增,5个候选DSS标记对应的正混伪品扩增产物均获得单一明亮的条带,PCR扩增成功率为100%。使用Chromas 2.6.6软件对测序峰图进行校对后获得对应测序结果,使用BioEdit 7.0.9软

件将筛选的5个DSS分别与正伪品扩增产物的测序结果进行比对,见图1。结果显示只有第3个DSS标记(DSS-3)在9批正品样品扩增产物的序列信息中均存在DSS;后将DSS与混伪品扩增产物的测序结果比对后发现,木槿混伪品与DSS存在SNP位点即不具有DSS,结果表明此标记可用于木槿及其混伪品的鉴定。基于DSS-3标记设计木槿特异性鉴别引物对,上游引物HSL31上游序列为5'-GAGCTTCTCTTGAAGCAATAAGA-3',下游引物HSL31下游序列为5'-TTCCGTACCGACTCAAGACA-3',引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

3.2 PCR鉴别条件考察

3.2.1 退火温度考察 使用特异性鉴别引物HSL31上游、HSL31下游对木槿正伪品进行PCR扩增,分别设置退火温度59、61、63、65℃,结果表明当退火温度为61~63℃时,木槿正品均能获得约270 bp的特异性鉴别条带,而4种混伪品和空白在此范围内均未扩增,但63℃时的条带较暗;59℃时部分混伪品也出现了扩增,产生假阳性条带;65℃时,所有样品均无扩增,因此选择61℃为适宜退火温度。见图2。

3.2.2 循环数考察 分别选用33、35和37、39个循环进行考察,结果表明在33~39个循环时正品均能扩增得到约270 bp的亮带,混伪品和空白在此范围内均未扩增。为保证结果的稳定性和准确性,选择中间的35个循环进行PCR反应。见图2。

3.2.3 Taq酶种类考察 为测试不同种类的Taq酶对木槿及其混伪品鉴别结果的影响,分别使用2×M5 PCR Mix、2×Taq PCR Mix、SpeedSTAR HS Taq

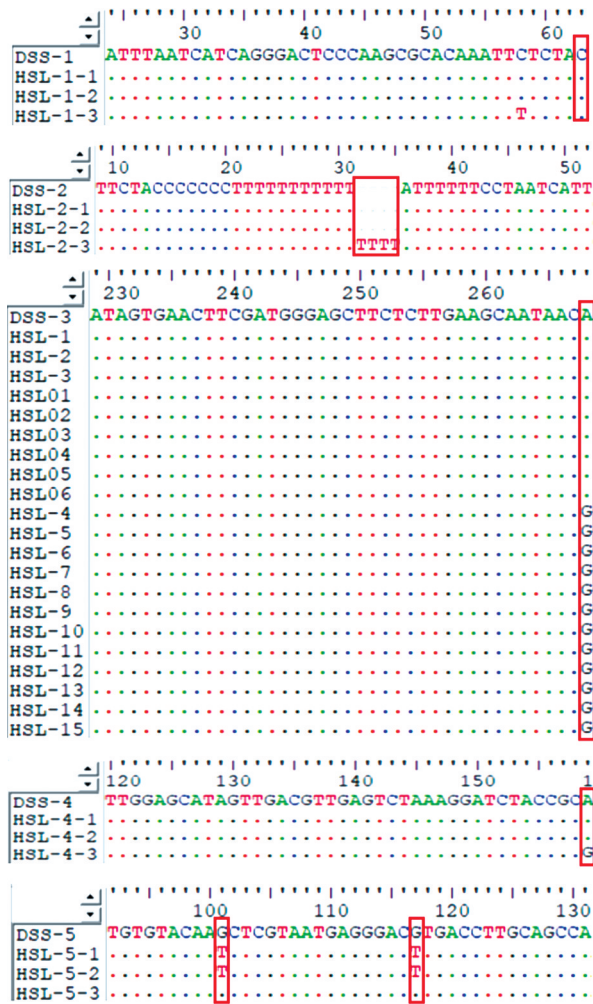


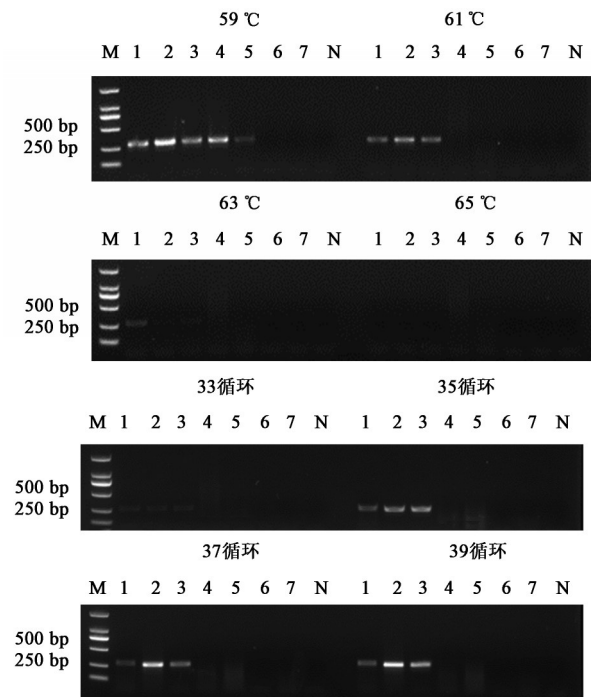
图1 DSS与扩增产物序列比对

Fig. 1 Comparison of DSS and amplified product sequences

DNA聚合酶、LA Taq HS DNA聚合酶4种酶进行试验,结果显示不同公司的酶由于活力不同其扩增条带的亮度有差异,且在SpeedSTAR HS Taq DNA聚合酶条件下部分伪品产生了假阳性条带。使用其他3种DNA聚合酶进行扩增对条带强弱具有区别,但不影响结果判读,其中2×M5 PCR Mix可获得更明亮条带,故本文选择2×M5 PCR Mix作为最优的Taq酶。见图3。

3.2.4 PCR仪考察 为测试不同PCR仪对木槿及其混伪品鉴别结果的影响,分别使用4种PCR仪进行扩增,结果表明Veriti™型、TC-512型、PTC-100型3种PCR仪均可获得正确的鉴定结果,而GeneAmp 9700型PCR仪部分伪品出现弱扩增条带而导致假阳性结果。见图3。

3.3 适用性考察 根据3.2项下确定的最佳PCR鉴别体系和PCR鉴别条件(95℃预变性3 min; 94℃变性15 s, 61℃退火30 s, 72℃延伸30 s, 35个循



注:A.退火温度;B.循环数;1~3.木槿;4~7.混伪品(4.朱槿,5.木芙蓉,6.玫瑰茄,7.大麻槿);N.空白(以ddH₂O为模板);M.Trans2K DNA Marker(图3同)

图2 不同条件对木槿正伪品特异性PCR鉴别结果的影响

Fig. 2 Effects of different conditions on identification of *Hibiscus syriacus* by specific PCR

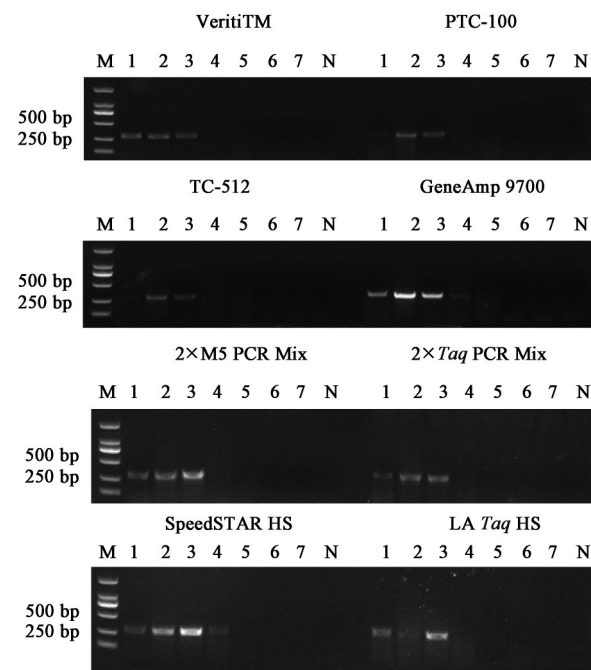
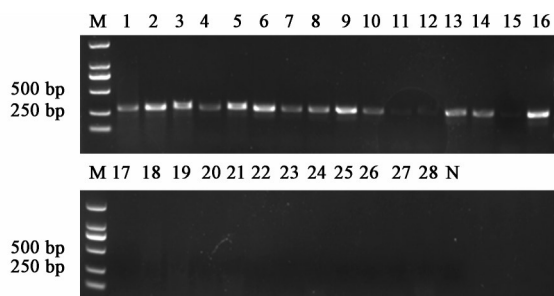


图3 木槿特异性PCR鉴别耐受性考察

Fig. 3 Identification and tolerance of *Hibiscus syriacus* by specific PCR

环;72℃终延伸5 min)对木槿药材正伪品的DNA模板进行PCR扩增,产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳检

测,结果显示仅木槿样本的凝胶电泳图谱出现约270 bp的单一鉴别条带,而其混伪品及空白均无条带,表明建立的鉴别方法可专属性鉴别木槿。见图4。



注:1~10.木槿;11~16.木槿皮;17~19.朱槿;20~22.木芙蓉;23~25.玫瑰茄;26~28.大麻槿;N.空白(以 ddH₂O 为模板);M.Trans2K DNA Marker

图4 特异性PCR鉴别木槿正混伪品

Fig. 4 Specific PCR to identification of *Hibiscus syriacus*

4 讨论

近年来,DNA分子鉴定方法逐渐应用到中药鉴定领域,大宗药材如人参^[9-11]、西洋参^[10-11]、三七^[11-12]、当归^[13]、桔梗^[14]、天麻^[15]、山药^[16]等已有报道采用DNA分子鉴定方法进行真伪鉴别。多数大宗药材的品种都是栽培品种,而冷背药材多来源于一些野生品种^[17]。冷背药材多是地方习用品,被一些地方性中药材标准所收录,因各地的药材标准收录的药材来源及饮片合格标准不同,导致冷背药材的鉴定成为中药鉴定中的一个难题。

虽然众多中药材已经建立了相应的DNA分子鉴定方法,但冷背药材、近缘物种等的鉴定方法仍有不足:①大多数分子鉴定方法难以准确区分近缘物种;②DNA条形码、高通量测序鉴定等依赖相似性指标导致结果判定方法存在争议;③聚合酶链反应-限制性内切酶片断长度多态性(PCR-RFLP)等分子标记的开发因物种的差异,难以流程性开发;④叶绿体基因组素有超级条形码之称^[18-19],因而被广泛地应用于物种鉴定,但目前基于叶绿体基因组进行物种鉴定,多是利用叶绿体的 *rbcL*、*matK*、*trnH-psbA* 等序列,在近源种鉴别中常出现物种分辨率低的问题。本课题组前期开发的DSS标记,准确度较高、不依赖相似性度,技术难度较低且可以流程性开发,后期可以与RFLP等其他分子标记技术结合。

目前基于叶绿体基因组对木槿进行真伪鉴定的研究较少,为了建立木槿皮基原植物及其混伪品的一种新的DNA分子鉴定方法,本文首先基于叶绿

体基因组鉴定得到了5个木槿的DSS标记,并通过PCR扩增及测序对5个DSS标记的可靠性进行验证,获得1个可用于鉴定木槿正混伪品的DSS标记。在此基础上,基于此DSS标记获得的正混伪品的SNP位点,设计了鉴定木槿正混伪品的特异性鉴别引物,通过考察影响鉴别特异性PCR的退火温度、循环次数、*Taq*酶种类等最终确定了最优的PCR鉴别条件,并基于最优鉴别条件进行了适用性考察,结果显示木槿及其药材木槿皮均能得到约270 bp的鉴别条带,而4种混伪品无此条带。以上结果表明基于叶绿体基因组得到的DSS标记可以进行中药材基原物种及其混伪品的特异性鉴别,从而为中药材正混伪品的分子鉴定提供了参考,同时也为冷背药材的分子鉴定奠定了基础。另有研究指出,木槿皮与川槿皮在部分地区存在混用现象^[20],但本文未对川槿皮进行研究,后期可对两者的分子鉴定方法进行深入研究,以解决两者的混用问题。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 安徽省食品药品监督管理局. 安徽省中药饮片炮制规范(2019年版)[M]. 合肥:安徽科学技术出版社, 2019.
- [2] 彭毅,谭金桃. 木槿的生药学研究[J]. 中医药导报, 2006,12(8):98-101.
- [3] 袁伯川. 柴胡属药用植物的分子鉴定及柴胡药材的质量考察[D]. 北京:北京中医药大学,2017.
- [4] 刘义梅,靳李娜,熊永兴,等. 基于ITS2序列鉴别木槿及其混伪品基原植物[J]. 中药材,2014,37(3):408-410.
- [5] 蒲婧哲,张亚中,朱夜琳,等. 基于物种特异性PCR方法的鸡内金真伪鉴别[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019,25(17):142-147.
- [6] 杨萌. 野葛、甘葛藤叶绿体基因组比较分析及分子标记开发[D]. 北京:北京协和医学院,2020.
- [7] Database Resources of the National Genomics Data Center. China national center for bioinformatics in 2021[J]. Nucleic Acids Res,2021,49(D1):D18-D28.
- [8] 袁媛,华中一,蒋超,等. 一种使用DNA特征序列鉴定植物的方法:北京,CN113322340A[P]. 2021-08-31.
- [9] 孙涛,滕少娜,孔德英,等. DNA条形码技术应用于人参鉴定[J]. 中国生物工程杂志,2013,33(4):143-148.
- [10] 宋晓娜,顾选,刘春生,等. 基于 *trnL-trnF* 序列的人参和西洋参DNA条形码鉴定研究[J]. 中国中药杂志,

- 2015, 40(10): 1914-1918.
- [11] 蒋超, 罗宇琴, 袁媛, 等. 多重位点特异性PCR鉴别人参、三七、西洋参掺杂[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(7): 1319-1323.
- [12] 廖保生, 王丽丽, 王晓玥, 等. 基于分子身份证的三七药材快速鉴定方法[J]. 中国药学杂志, 2015, 50(22): 1954-1959.
- [13] 罗沛宜, 罗茂, 朱焯, 等. 基于叶绿体 *trnL-F* 和 *rpoC1* 序列对当归及其混伪品的分子鉴定研究[J]. 中国药学杂志, 2015, 50(10): 840-845.
- [14] 赵新悦, 刘蕊, 冯红, 等. 中药材桔梗及其易混品的DNA条形码分子鉴定[J]. 河北大学学报: 自然科学版, 2021, 41(1): 60-67.
- [15] 李慧, 钱润, 田娜, 等. 红天麻、乌天麻及其杂交天麻的PCR鉴别[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(15): 3666-3671.
- [16] 杨晶凡, 蒋超, 袁媛, 等. 快速PCR方法在山药真伪鉴别中的应用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(22): 45-49.
- [17] 彭华胜, 王德群, 郝近大, 等. 冷背药材的沿革及发展对策[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(9): 1635-1638.
- [18] KANE N C, CRONK Q. Botany without borders: Barcoding in focus[J]. Mol Ecol, 2008, 17(24): 5175-5176.
- [19] 李冉郡, 武立伟, 辛天怡, 等. 大黄药材基原物种叶绿体基因组分析与特异DNA条形码开发[J]. 药学学报, 2022, 57(5): 1495-1505.
- [20] 肖耀军. 木槿皮、川槿皮、紫荆皮和土荆皮的鉴别使用[J]. 北京中医药, 2012, 31(9): 710-712.
- [责任编辑 顾雪竹]