

· 特异性PCR的应用专题 ·

[编者按] 聚合酶链式反应(PCR)是2020年版《中华人民共和国药典》收录的第一个分子生物学检查法通则,因其对检测样品要求低、操作简便、具有高特异性、高灵敏度、高效率等优点,广泛应用于中药的真实性鉴别。针对多基原药材、冷背药材、外来药材、配方颗粒、种质纯度等鉴别难点,该专题通过不同案例分别展示了此方法的应用状况。为了加快PCR方法的建立,设计了新型DNA分子标记-DNA序列特征性片段(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建立的药材正伪品鉴别方法不依赖DNA序列相似度,准确度可达100%;利用DNA序列特征性片段可快速获取用于建立特异性PCR的位点及其引物。利用PCR还可准确评估中药种质材料的纯度,与基因组重测序技术相比,实验操作简便、检测效率高,且可有效降低90%的检测成本,解决了高纯度药用植物大规模筛选的技术瓶颈,为中药材纯系育种和杂交育种奠定了基础。

多基原九里香药材的多重位点特异性PCR鉴别

陈梓媛¹, 赵玉洋¹, 谢旭桃¹, 谢文波², 金艳¹, 蒋超^{1*}, 袁媛^{1*}

(1. 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;
2. 华润三九医药股份有限公司, 广东 深圳 518029)

[摘要] 目的:建立一种同时鉴别九里香药材两基原九里香 *Murraya exotica* 和千里香 *M. paniculata* 的DNA分子鉴别方法。方法:通过比较九里香、千里香的叶绿体基因组序列差异,根据叶绿体基因组上的单核苷酸多态性(SNP)变异位点分别设计九里香和千里香的特异性鉴别引物P03和P04,对影响聚合酶链式反应(PCR)结果的退火温度、循环次数、引物浓度比进行优化,建立了九里香和千里香的多重位点特异性PCR鉴别方法,并对影响该方法重复性的Taq酶种类、PCR仪型号进行耐受性考察和适用性考察。结果:在该多重位点特异性PCR鉴别方法中,当PCR反应循环数为31次,退火温度为60℃,九里香P03和千里香P04引物比为1:2时,九里香可获得约330 bp的特异性条带,千里香可得到约230 bp的特异性条带,不同来源的九里香和千里香样品使用建立的多重位点特异性PCR鉴别方法均可获得一致结果。结论:该文建立一种快速、准确鉴别九里香药材基原的多重位点特异性PCR鉴别方法,可在单次鉴定操作中根据条带位置同时鉴别九里香和千里香。

[关键词] 九里香; 千里香; 多重位点特异性聚合酶链式反应(PCR); 分子鉴别

[中图分类号] R284.2;R289;R22;R2-031;R33 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2022)17-0106-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221012

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220616.1858.007.html>

[网络出版日期] 2022-06-17 13:27

Identification of *Murrayae Folium et Cacumen* by Multiplex Allele-Specific PCR

CHEN Ziyuan¹, ZHAO Yuyang¹, XIE Xutao¹, XIE Wenbo², JIN Yan¹, JIANG Chao^{1*}, YUAN Yuan^{1*}

(1. 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;
2. China Resources Sanjiu Medical & Pharmaceutical Co. Ltd., Shenzhen 518029, China)

[Abstract] Objective: To establish a polymerase chain reaction (PCR) method to accurately

[收稿日期] 2022-01-22

[基金项目] 中国中医科学院科技创新工程重大攻关项目(CI2021A041); 国家科技部科技基础资源调查专项(2018FY100800); 中央本级重大增减支项目(2060302); 青年岐黄学者项目; 东城区优秀人才培养项目(2021-dchrepyzz-7)

[第一作者] 陈梓媛,在读硕士,从事中药鉴定与分子生药学研究, E-mail: c_ziyuan@163.com

[通信作者] * 蒋超,副研究员,从事中药分子鉴定研究, Tel: 010-64087649, E-mail: iangchao0411@163.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

discriminate the crude materials of *Murrayae Folium et Cacumen*, *Murraya exotica* and *M. paniculata*. **Method:** Based on the difference in chloroplast genome sequences of *M. exotica* and *M. paniculata*, species-specific identification primers P03 and P04 of *M. exotica* and *M. paniculata* were designed according to single nucleotide polymorphism (SNP) on the chloroplast genome. A multiplex allele-specific PCR identification method was established for the identification of *M. exotica* and *M. paniculata* following the optimization of annealing temperature, number of cycles, and primer concentration ratio. The established PCR method for identification was explored and verified in terms of tolerance and feasibility by investigating the type of *Taq* polymerases and PCR system model. **Result:** In this multiplex allele-specific PCR identification method, about 330 and 230 bp of specific fragments were amplified from DNA templates of *M. exotica* and *M. paniculata*, respectively, under the following conditions: cycle number of 31, annealing temperature of 60 °C, and primer concentration ratio of P03 and P04 of 1:2. Consistent results were obtained for samples from different sources. **Conclusion:** The multiplex allele-specific PCR identification method established in this study can accurately identify the origin of *Murrayae Folium et Cacumen*, which can be used for the simultaneous identification of *M. exotica* and *M. paniculata* by the length of fragments in a single identification assay.

[Keywords] *Murraya exotica*; *Murraya paniculata*; multiplex allele-specific polymerase chain reaction (PCR); molecular identification

中药九里香具有行气止痛、活血散瘀的功效，常用于治疗胃痛、风湿痹痛、牙痛，也是中成药“三九胃泰”的主要原料之一。2020年版《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)记载其来源为芸香科九里香属植物九里香 *Murraya exotica* 或千里香 *M. paniculata* 的干燥叶和带叶嫩枝^[1]。九里香主要成分为香豆素类^[2]，而千里香为多甲氧基黄酮类^[3-4]，九里香与千里香植物的化学成分组成和含量差异较大^[5-6]，目前市场中九里香药材的主要来源为千里香的干燥叶和带叶嫩枝。对九里香基原进行鉴定，有助于保障含九里香药材的中成药批间稳定性，确保用药的安全性和有效性。

分子鉴别标记不受生物体发育阶段、器官组织差异的影响，具有操作简便、稳定性强的特点，已广泛用于鉴定药用动植物^[7-11]、中药种子种苗^[12-13]、中药饮片^[14-16]，甚至可鉴别中成药^[17]、中药配方颗粒^[18-21]原料的真伪。邢建永等^[22]基于内转录间隔区 (ITS)2 序列开发了可用于九里香及其同属近缘种鉴别的 DNA 条形码，通过该 DNA 条形码可对九里香和千里香进行鉴别。但为实现对九里香药材的所有基原进行快速鉴别，还需建立一种通过一次聚合酶链式反应 (PCR) 即可同时鉴别九里香和千里香的方法。

多重位点特异性 PCR 可同时扩增和检测多个目的片段，可以节省检验时间、提高实验效率。该方法已成功用于地龙^[23]、海龙^[24]、石斛^[25]等多基原中药的鉴别，以及人参、三七和西洋参的掺杂鉴

别^[26]。本文基于多重位点特异性 PCR 技术，建立了一种快速、准确的九里香药材基原鉴别方法。

1 材料

收集来自广东、广西、四川、云南不同地区的九里香植物样本 12 批、千里香植物样本 15 批，共 27 批，标本保存于中国中医科学院中药资源中心标本馆。九里香、千里香药材来自华润三九医药股份有限公司，各 10 批。药材样品经中国中医科学院中药资源中心金艳副研究员鉴定，见表 1。基因组数据来自本课题组前期测序组装的不同产地九里香、千里香样本的叶绿体基因组。

DNeasy® Plant Mini Kit(上海凯杰企业管理有限公司，批号 69106)；2×M5 Super FastTaq PCR MasterMix(北京聚合美生物技术有限公司，批号 MF164-01)；2×Taq PCR Master Mix(北京艾德莱生物科技有限公司，批号 PC0902)；LA Taq HS、SpeedSTAR HS Taq DNA 聚合酶(日本 Takara 公司，批号分别为 RR042A、RR070A)；10 000×CelRed in water 核酸染料(北京兰博利德生物技术有限公司，批号 CR001)；Trans2K DNA Marker(北京全式金生物技术有限公司，批号 BM101)。

Verti 96 型、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)，NanoDrop® ND-1000 型微量紫外-可见分光光度计(美国 Thermo Scientific 公司)，PowerPac Basic 型电泳仪、Bio-Rad 凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

表1 九里香、千里香样本信息

Table 1 Information of *Murraya exotica* and *M. paniculata*

No.	物种	类型	拉丁学名	产地	数量/批
1	九里香	植物	<i>Murraya exotica</i>	广东省惠州市	1
2	九里香	植物	<i>M. exotica</i>	广东省江门市	1
3	九里香	植物	<i>M. exotica</i>	广东省肇庆市	1
4	九里香	植物	<i>M. exotica</i>	广西壮族自治区百色市	1
5	九里香	植物	<i>M. exotica</i>	广西壮族自治区崇左市	1
6	九里香	植物	<i>M. exotica</i>	广西壮族自治区贵港市	1
7	九里香	植物	<i>M. exotica</i>	广西壮族自治区桂林市	1
8	九里香	植物	<i>M. exotica</i>	四川省宜宾市	2
9	九里香	植物	<i>M. exotica</i>	云南省普洱市	1
10	九里香	植物	<i>M. exotica</i>	云南省西双版纳傣族自治州	2
11	九里香	药材	<i>M. exotica</i>	广东省广州市	1
12	九里香	药材	<i>M. exotica</i>	广东省河源市	1
13	九里香	药材	<i>M. exotica</i>	广东省揭阳市	2
14	九里香	药材	<i>M. exotica</i>	广东省茂名市	1
15	九里香	药材	<i>M. exotica</i>	广东省清远市	1
16	九里香	药材	<i>M. exotica</i>	广东省云浮市	2
17	九里香	药材	<i>M. exotica</i>	广东省湛江市	1
18	九里香	药材	<i>M. exotica</i>	广东省肇庆市	1
19	千里香	植物	<i>M. paniculata</i>	广东省云浮市	3
20	千里香	植物	<i>M. paniculata</i>	广西壮族自治区百色市	2
21	千里香	植物	<i>M. paniculata</i>	广西壮族自治区崇左市	2
22	千里香	植物	<i>M. paniculata</i>	广西壮族自治区桂林市	3
23	千里香	植物	<i>M. paniculata</i>	广西壮族自治区河池市	2
24	千里香	植物	<i>M. paniculata</i>	广西壮族自治区贺州市	1
25	千里香	植物	<i>M. paniculata</i>	广西壮族自治区柳州市	1
26	千里香	植物	<i>M. paniculata</i>	广西壮族自治区玉林市	1
27	千里香	药材	<i>M. paniculata</i>	广东省河源市	1
28	千里香	药材	<i>M. paniculata</i>	广东省茂名市	1
29	千里香	药材	<i>M. paniculata</i>	广东省清远市	1
30	千里香	药材	<i>M. paniculata</i>	广东省韶关市	1
31	千里香	药材	<i>M. paniculata</i>	广东省云浮市	1
32	千里香	药材	<i>M. paniculata</i>	广东省肇庆市	1
33	千里香	药材	<i>M. paniculata</i>	广西壮族自治区河池市	2
34	千里香	药材	<i>M. paniculata</i>	广西壮族自治区贺州市	1
35	千里香	药材	<i>M. paniculata</i>	贵州省黔南布依族苗族自治州	1

2 方法

2.1 引物设计 本课题组前期基于九里香、千里香叶绿体基因组和 IdenDSS 软件,筛选出九里香、千里香的单核苷酸多态性(SNP)位点,使用 Primer Premier 5.0 软件^[27]设计特异性鉴别引物,得到能特异性鉴别九里香的鉴别引物对 P03-EF/P03-R、千里

香的鉴别引物对 P04-PF/P04-R,见表2。引物由生物工程(上海)股份有限公司合成。

2.2 基因组 DNA 提取 将样品研磨成粉末,取粉末约 20 mg 放入 2 mL 离心管,按照 DNeasy® Plant Mini Kit 说明书提取总 DNA,并使用 NanoDrop® ND-1000 型微量紫外-可见分光光度计测定浓度,判

表2 九里香、千里香特异性鉴别引物

Table 2 Specific primer of *Murraya exotica* and *M. paniculata*

靶向物种	引物名称	序列(5'-3')	长度/bp
九里香	P03-EF	上游 ATTCTCCCGTTGCAATCGTC	330
	P03-R	下游 CTGGTACCAAGATCGAGCCC	
千里香	P04-PF	上游 CCGGGTCGGCAAATTA	230
	P04-R	下游 CGGGTTTTGGTTCACACGAC	

注: T 为人为引入的错配碱基

断DNA质量。DNA放入-20℃冰箱保存备用。

2.3 多重PCR扩增条件的确定 使用上述2对鉴别引物对九里香、千里香总DNA模板进行扩增,初始PCR反应体系25 μL,包含2×M5 Super FastTaq PCR MasterMix 13 μL,九里香特异性鉴别引物上、下游各0.2 μL,千里香特异性引物上下游各0.4 μL, DNA模板1.5 μL,双蒸灭菌水9.3 μL。PCR反应结束后,取反应产物5 μL点样于CelRed核酸染料染色的2.0%琼脂糖凝胶上,200 V电压条件下电泳30 min,置BIORAD凝胶成像系统观测。

使用九里香、千里香鉴别引物对九里香和千里香样品DNA进行扩增,分别考察了①退火温度58、60、62、64℃;②PCR循环次数31、33、35、37个循环;③九里香P03与千里香P04鉴别引物比(引物总量为上下游各0.6 μL),2:1、1:1、1:2、1:3;④Taq酶种类,2×M5 Super FastTaq PCR MasterMix、2×Taq PCR Master Mix、TAKARA LA Taq HS、SpeedSTAR HS Taq DNA聚合酶;⑤PCR仪型号GeneAmp® 9700型、TC-512型、PTC-100™型、Verti 96型。

最终确定的25 μL PCR反应体系为2×M5 Super FastTaq PCR MasterMix 13 μL,九里香特异性引物上下游各0.2 μL,千里香特异性引物上下游各0.4 μL, DNA模板1.5 μL,双蒸灭菌水9.3 μL。PCR扩增条件为95℃预变性3 min;94℃变性15 s,60℃退火30 s,72℃延伸30 s,31个循环;产物末端72℃延伸5 min。

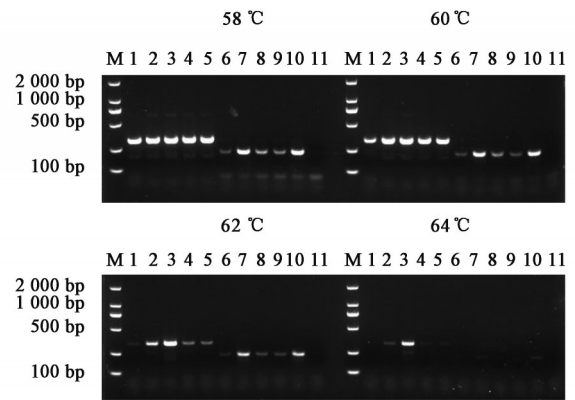
2.4 方法适用性考察 采用上述条件考察后所确定的最佳反应体系和反应条件参数,进行九里香、千里香多重特异性PCR鉴别的适用性实验考察,对收集的12批九里香和15批千里香植物样本,及各10批九里香、千里香来源药材样品进行检测鉴别,考察该体系的适用性。

3 结果与分析

3.1 PCR鉴别条件的确定

3.1.1 退火温度 设置PCR反应退火温度分别为58、60、62、64℃进行考察,结果表明,退火温度在

58~60℃时,九里香和千里香样本均可分别获得330、230 bp的特异性条带,空白对照均无条带,见图1。确定九里香药材多重特异性PCR鉴别退火温度为60℃。



注: M. Trans2K DNA Marker; 1~5. 九里香; 6~10 千里香; 11. 空白(双蒸灭菌水)(图2-图5同)

图1 退火温度对九里香药材多重特异性PCR鉴别的影响

Fig. 1 Influence of annealing temperature on *Murrayae Folium* et *Cacumen* of specific identification

3.1.2 循环次数 当PCR反应循环为31~37个时,所有样本均可见对应条带,空白对照均无条带。但35~37个循环时,部分九里香样本出现230 bp假阳性条带,见图2。为保证结果的准确性,确定PCR循环次数为31个循环。

3.1.3 引物浓度比 九里香P03和千里香P04引物比为2:1、1:1、1:2、1:3时,九里香和千里香均可分别获得330、230 bp的特异性条带,空白对照均无条带,见图3。增加千里香鉴别引物比例可在一定程度上提高千里香特异性条带亮度,而对九里香的特异性鉴别结果影响较小,综合两者特异性条带的亮度,确定PCR反应体系中两者引物比为1:2。

3.2 方法耐受性实验考察

3.2.1 Taq酶种类考察 使用2×M5 Super FastTaq PCR MasterMix, 2×Taq PCR Master Mix进行扩增均可获得特异性鉴别结果,不同酶表现出的扩增条带亮度有差异。使用高保真的LA Taq HS DNA聚合

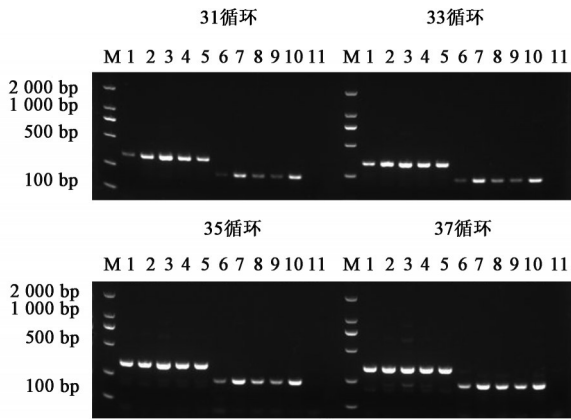


图2 循环次数对九里香药材多重特异性PCR鉴别的影响
Fig. 2 Influence of thermo cycles number on *Murrayae Folium et Cacumen* of specific identification

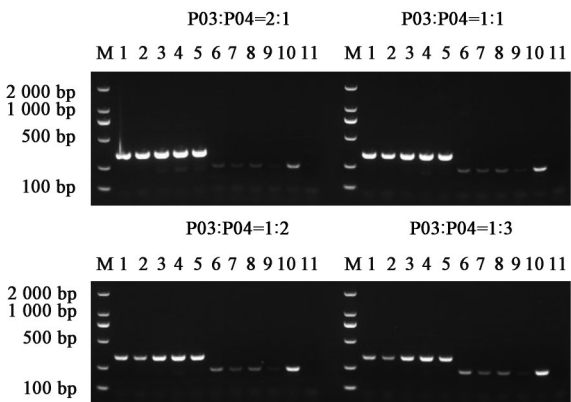


图3 引物比对九里香药材多重特异性PCR鉴别的影响
Fig. 3 Influence of primers ratio on *Murrayae Folium et Cacumen* of specific identification

酶可特异性鉴别九里香,而无法鉴别千里香。使用高保真的 SpeedSTAR HS *Taq* DNA 聚合酶时所有样本除出现对应特异条带外均出现另一假阳性条带,见图4。

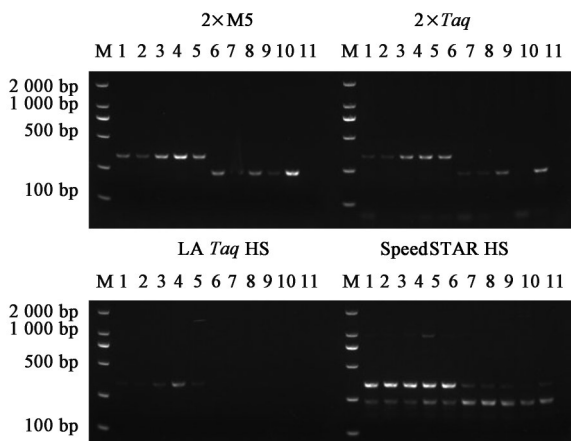


图4 *Taq* 酶种类对九里香药材多重特异性PCR鉴别的影响
Fig. 4 Influence of different kinds of *Taq* polymerases on *Murrayae Folium et Cacumen* of specific identification

3.2.2 PCR 仪考察 分别用 GeneAmp® 9700 型, TC-512 型, PTC-100™ 型, Verti 96 型 PCR 仪进行扩增,所有样品均可得到特异性鉴别条带,空白对照无条带,表明以上4种PCR仪均能进行鉴别,见图5。

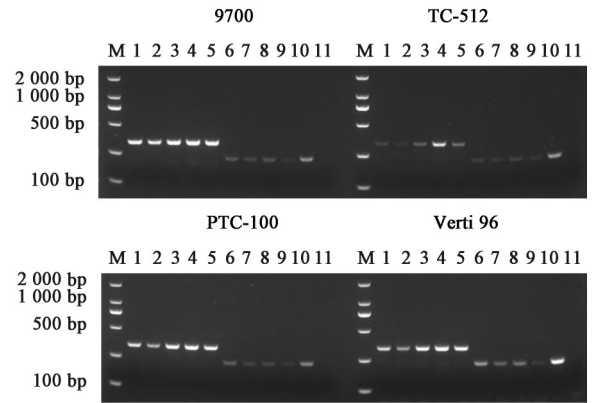
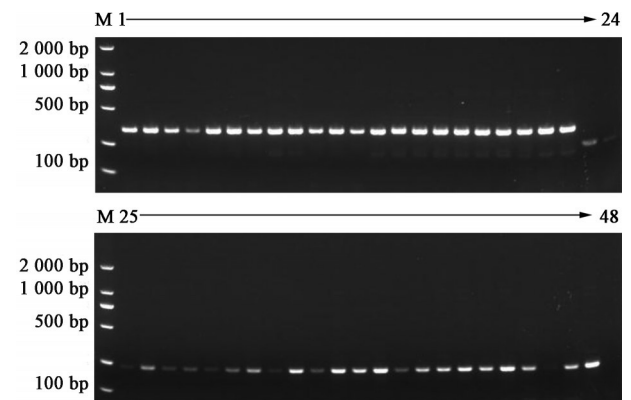


图5 不同PCR仪对九里香药材多重特异性PCR鉴别的影响
Fig. 5 Influence of thermocyclers on *Murrayae Folium et Cacumen* of specific identification

3.3 适用性考察 使用确定的最优PCR体系和条件对不同地区的九里香、千里香植物样本和药材样本进行扩增,产物经琼脂糖凝胶电泳检测,发现九里香样本均出现约330 bp的特异性鉴别条带,千里香均出现约230 bp的特异性鉴别条带,不同地区来源的样品结果一致,表明该体系能准确鉴别九里香和千里香,见图6。



注:M.Trans2k DNA Marker;1~12.九里香样品;13~22.九里香药材样品;23~37.千里香样品;38~47.千里香药材样品;48.空白(灭菌双蒸水)

图6 九里香药材的多重位点特异性PCR鉴别
Fig. 6 Multiplex allele-specific PCR identification results of *Murrayae Folium et Cacumen*

4 讨论

本文对九里香、千里香叶绿体基因组进行比对分析,筛选SNP位点设计特异性PCR鉴别引物,并

分别对影响PCR扩增的体系及条件进行优化和考察,确定最佳PCR体系和条件,建立九里香药材的多重位点特异PCR鉴别方法。DNA模板量及其质量也是影响多重PCR扩增的重要因素之一。经测定,本文提取的九里香样品DNA浓度为 $3.5\sim 29.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,千里香样品DNA浓度为 $2.6\sim 19.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。在本文的 $25\ \mu\text{L}$ PCR反应体系中,九里香DNA样本使用 $5\sim 44\text{ ng}$ 均可获得特异性扩增条带,千里香DNA样本使用 $4\sim 29\text{ ng}$ 均扩增获得特异性结果。此外,由于部分九里香样本易在 $180\sim 200\text{ bp}$ 处出现模糊暗条带,在琼脂糖凝胶浓度较低及电泳时间较短时,与 230 bp 千里香特异性鉴别条带分离度不好,容易对千里香的鉴别结果产生误判,因此选择 2.0% 琼脂糖凝胶,电泳 30 min 对PCR产物进行检测。

使用本文建立的多重特异性PCR鉴别方法进行检测,九里香样品凝胶电泳图谱均可见约 330 bp 的特异性鉴别条带,千里香样品则可见约 230 bp 的特异性鉴别条带,样品的特异性PCR鉴别结果与形态学鉴别结果一致,表明方法具有可靠性和稳定性。该多重位点特异性PCR鉴别方法操作简便、准确性好、特异性高,通过一次PCR反应即可鉴别九里香、千里香。

多基原现象在中药中十分常见,但药材的多基原鉴别仍然是中药鉴定的一大挑战。建立合适的多基原药材鉴别方法,有助于科学、客观解决中药长期存在的同名异物问题,逐步实现“一药一名一标准”^[28]。当前2020年版《中国药典》收录了144种多基原药材,仅有75种记载了其多基原鉴别方法,其中70种收录了性状鉴别方法,30种收录有显微鉴别方法,6种有理化鉴别方法,1种有分子鉴别方法^[29]。与传统鉴别方法相比,分子鉴定准确性好、灵敏度高,在药材的多基原鉴别中具有广阔的应用前景,且已在砂仁^[30]、泽泻^[31]、老鹳草^[32]等药材的多基原鉴别中得到应用。本文建立的九里香药材不同基原鉴别方法也可为多基原药材的鉴别提供补充。

【利益冲突】 本文不存在任何利益冲突。

【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:中国医药科技出版社,2020:11.
[2] ITO C, FURUKAWA H. Constituents of *Murraya exotica* L. structure elucidation of new coumarins[J].

Chem Pharm Bull,1987,35(10):4277-4285.
[3] KINOSHITA T, FIRMAN K. Highly oxygenated flavonoids from *Murraya paniculata* [J]. Phytochemistry,1996,42(4):1207-1210.
[4] 谢旭桃,华中一,李晓琳,等. 千里香叶片性状的数量分类与内源激素含量分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2021,27(21):167-173.
[5] 鹿梦秋,梁海珍,屠鹏飞,等. 中药九里香两种不同基原植物的药效学比较研究[J]. 中国药学:英文版,2021,30(1):49-57.
[6] 梁海珍,刘冰语,屠鹏飞,等. 中药九里香的研究进展[J]. 中国医院用药评价与分析,2016,16(11):1441-1446.
[7] 钱润,田娜,张雪艳,等. 鹿茸、鹿角的位点特异性PCR鉴别[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(17):118-123.
[8] 田娜,袁媛,金艳,等. 特异性PCR鉴别蜈蚣及其混伪品[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(17):113-117.
[9] 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.
[10] 周荣荣,周骏辉,南铁贵,等. 葛根SSR特征及江西粉葛DNA身份证的构建[J]. 中国中药杂志,2019,44(17):3615-3621.
[11] 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.
[12] 赵晴,谢红波,央拉,等. 基于DNA条形码技术的北柴胡种子分子鉴定[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(14):182-189.
[13] 林凤越,曹辉,任欢欢,等. 基于ITS2序列的人参及同属易混品西洋参种子的分子鉴定[J]. 中草药,2019,50(9):2188-2193.
[14] 张雪艳,袁媛,胡启跳,等. 龟甲的特异性PCR及高分辨率熔解曲线技术鉴别方法研究[J]. 中国现代中药,2019,21(9):1215-1220.
[15] 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.
[16] 赵群,刘枫,宋向文,等. 光慈菇药材的特异性PCR鉴定[J]. 中药材,2017,40(7):1540-1546.
[17] 王丽,金艳,蒋超,等. 猪胆粉及其中成药的特异性PCR鉴别方法[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(17):136-141.
[18] 蒋超,屠李婵,袁媛,等. 金银花配方颗粒的位点特异性PCR鉴别研究[J]. 中国中药杂志,2017,42(13):2484-2491.
[19] 孟虎彪,袁媛,刘富艳,等. 牛膝及川牛膝配方颗粒位

- 点特异性PCR鉴别研究[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(5): 945-951.
- [20] 陈梓媛, 王丽, 蒋超, 等. 金银花配方颗粒质量快速检测体系研究[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(5): 1070-1075.
- [21] 赵玉洋, 秦雯, 李源森, 等. 紫河车饮片干浸膏粉及配方颗粒的位点特异性PCR鉴别[J]. 中国现代中药, 2022, 24(3): 493-499.
- [22] 邢建永, 周红, 吴正军, 等. 九里香药材及其近缘物种ITS2分子鉴定研究[J]. 世界中医药, 2020, 15(11): 1559-1564.
- [23] 田娜, 魏艺聪, 袁媛, 等. 地龙的多重点特异性PCR鉴别[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(17): 124-129.
- [24] 刘富艳, 金艳, 袁媛, 等. 多重位点特异性PCR鉴别海龙及其混伪品[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(15): 57-64.
- [25] 罗宇琴, 蒋超, 袁媛, 等. 多重位点特异性PCR鉴别霍山石斛、铁皮石斛与齿瓣石斛药材[J]. 药学学报, 2017, 52(6): 998-1006.
- [26] 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.
- [27] LALITHA S. Primer Premier 5 [J]. Biotech Software Int Rep, 2000, 1(6): 270-272.
- [28] 黄璐琦, 袁媛, 袁庆军, 等. 中药分子鉴定发展中的若干问题探讨[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(19): 3663-3667.
- [29] 王雨青, 刘金凤, 于佳禾, 等. 2020年版《中国药典》中收录的多基原中药材鉴别的研究现状、问题及对策[J]. 华西药学杂志, 2021, 36(2): 214-222.
- [30] 焦文静, 张鹏, 廖保生, 等. 基于SNP位点鉴定砂仁药材物种[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2014(2): 295-300.
- [31] 马晓冲, 姚辉, 辛天怡, 等. 基于DNA条形码SNP鉴别东方泽泻、泽泻及市售泽泻药材[J]. 中国药学杂志, 2015, 50(17): 1474-1478.
- [32] 贺海波, 熊超, 郭力城, 等. ITS2序列鉴定多基原药材老鹳草[J]. 中国药学杂志, 2015, 50(17): 1505-1511.
- [责任编辑 顾雪竹]