

基于重组酶介导扩增技术的水牛角快速现场鉴别方法

沈泓¹, 袁媛², 陈碧莲¹, 李超¹, 孙晗¹, 蒋超^{2*}

(1. 浙江省食品药品检验研究院, 杭州 310052;

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)

[摘要] **目的:** 以水牛角鉴别为例建立中药重组酶介导扩增(Recombination-aid amplification, RAA)快速鉴别方法,用于水牛角及其混伪品牦牛角的鉴别。**方法:** 通过比较水牛角及其混伪品牦牛角基原物种的线粒体基因组序列差异,寻找高变异区域,根据变异位点设计水牛角正品水牛的特异性 RAA 鉴别引物 SNJ-1. F 和 SNJ-1. R 及荧光探针 SNJ-1. probe,使用碱裂解法提取 DNA,优化 RAA 反应体系,在 37 °C 下恒温孵育 15 ~ 20 min,通过凝胶电泳及实时荧光监测反应结果,使用 DNA 测序方法验证 RAA 鉴别结果的准确性。**结果:** 在 37 °C 恒温孵育 20 min 后,水牛角 RAA 产物凝胶电泳图谱出现约 140 bp 特异性鉴别条带,使用实时荧光 RAA 鉴别时,水牛角正品均在 6.21 ~ 8.37 min 出现特异性扩增,牦牛角样品均在 10.08 min 后才出现扩增,COI 片段 DNA 测序鉴别结果与荧光 RAA 鉴别结果相吻合。**结论:** 特异性 RAA 技术可在 20 min 内快速鉴别水牛角,可用于水牛角药材、饮片及其制品的快速现场鉴定。该方法具有简单、快速、无需大型仪器等特点,在中药现场鉴定、药检抽查等方面有着广阔的应用前景。

[关键词] 水牛角; 牦牛角; 重组酶介导扩增; 混伪品; 现场鉴定

[中图分类号] R284.2; R285; R22; R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)17-0130-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20191715

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20190515.1736.014.html>

[网络出版时间] 2019-05-17 14:19

On-site Identification of Medicinal Bubali Cornu by Recombinase-mediated Amplification Technique

SHEN Hong¹, YUAN Yuan², CHEN Bi-lian¹, LI Chao¹, SUN Han¹, JIANG Chao^{2*}

(1. Zhejiang Institute of Food and Drug Control, Hangzhou 310052, China;

2. 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)

[Abstract] **Objective:** To establish a rapid on-site method for identifying Chinese medical material recombinase-mediated amplification (RAA) technology for the use of identifying medicinal Bubali Cornu from yak horn. **Method:** Based on the differences of mitochondrial genome sequences between Bubali Cornu and adulterants, the specific RAA primer (SNJ-1. F, SNJ-1. R) and fluorescence probe SNJ-1. probe were designed by variation sites. Alkaline lysis method was used to extract DNA from milled samples, and optimize RAA reaction system. The incubation was made at 37 °C for 15-20 min, the reaction results were monitored through gel electrophoresis and a mobile fluorescence amplification instrument. The RAA identification result was compared with COI DNA sequencing. **Result:** After incubation at 37 °C for 20 min, about 140 bp of bright and simple bands was amplified from DNA templates of *Bubalus bubalis*, whereas *Bos mutus* were negative. By the Real-time fluorescent RAA identify method, all reactions in DNAs from Bubali Cornu samples were amplified from 6.21 to

[收稿日期] 20190319(011)

[基金项目] 浙江省食药监局科研计划项目(2018012);中央本级重大增减支项目(2060302)

[第一作者] 沈泓,博士,从事微生物与分子生物学研究,E-mail:20015113@qq.com

[通信作者] *蒋超,博士,助理研究员,从事中药分子鉴定研究,Tel:010-64087649,E-mail:jiangchao0411@163.com

8.37 min, whereas DNAs from yak samples were amplified after 10.08 min, COI sequencing results conformed to the Real-time fluorescent RAA identification. **Conclusion:** Specific RAA could rapidly identify Bubali Cornu in 20 minutes, and thus be applied in medical material and its products. This method is simple, rapid and sophisticated instrument-free, with promises in on-site identification of traditional Chinese medicine.

[**Key words**] Bubali Cornu; yak horn; recombinase-mediated amplification; adulterants; on-site identification

快速、准确鉴定一直是中药鉴定追求的目标, DNA 分子鉴定因其准确度高、重复性好, 逐渐受到中药鉴定人员的重视。然而, 受限于方法和仪器设备的要求, DNA 分子鉴定多止步于实验室阶段, 难以实现在产地、药市药房等进行现场鉴别, 极大地限制了分子鉴定方法的应用和推广^[1]。近年来, 随着 DNA 快速提取和快速扩增新技术的不断发展^[2-3], 出现了一批以恒温扩增 (Isothermal amplification) 为代表 DNA 快速检测技术, 如环介导等温扩增 (Loop-mediated isothermal amplification, LAMP), 解旋酶依赖扩增 (Helicase-dependent isothermal DNA amplification, HDA), 重组酶介导扩增 (Recombination-aid amplification, RAA) 等^[4-6]。因其不需要控温仪器进行反复升降温, 且结果可以通过凝胶电泳, 荧光发光, DNA 试纸或便携式的实时荧光检测设备快速检测, 在中药快速、现场化鉴定方面具有良好的应用前景。目前, 基于等温扩增方法已逐步用于五指毛桃^[7]、何首乌^[8]、人参^[9]等植物药材的真伪鉴定。然而动物饮片和动物制品及细贵药材价格昂贵、常缺乏形态鉴别特征, 对现场快速鉴定具有更高的需求。

本研究以水牛角的鉴别为例, 示例中药材重组酶介导扩增现场、快速鉴别方法。水牛角为牛科动物水牛 *Bubalus bubalis* 的角^[10], 主要用于温病高热, 神昏谵语等热证, 是安宫牛黄丸、安脑丸等中成药的重要组成部分之一, 临床用量很大。然而, 常用于市售水牛角的主要商品形态为水牛角丝和水牛角粉, 缺乏完整性状鉴定特征, 易于混伪。近年来随着水牛饲养数量的减少, 药市中常有以牛科动物牦牛 *Bos mutus* 的角混作水牛角销售现象, 缺乏简便、有效的鉴定方法^[11]。本研究通过使用碱裂解法快速提取 DNA, 使用 RAA 快速扩增, 在 37 °C 恒温条件下, 15 min 内即可得出结果, 无需大型仪器, 为中药的田野、药市等环境快速鉴别提供了参考。

1 材料

牦牛角、水牛角样品购自北京东城区、广西、福建、云南、安徽的药店及安徽亳州、广东清平药材市

场。样品共计 22 批, 所有样品由蒋超博士使用形态学和 DNA 测序技术进行鉴定, 保存于中国中医科学院中药资源中心 (表 1)。

表 1 实验样品信息

Table 1 Material samples information

No.	材料名称	拉丁名称	采集地	编号
1	水牛角(丝)	<i>Bubalus bubalis</i>	北京东城	SNJ-1
2	牦牛角(丝)	<i>Bos mutus</i>	北京东城	SNJ-2
3	水牛角(丝)	<i>B. bubalis</i>	北京东城	SNJ-3
4	水牛角(块)	<i>B. bubalis</i>	北京东城	SNJ-4
5	水牛角(丝)	<i>B. bubalis</i>	北京东城	SNJ-5
6	水牛角(粉)	<i>B. bubalis</i>	北京东城	SNJ-6
7	水牛角(丝)	<i>B. bubalis</i>	广西	SNJ-7
8	牦牛角(丝)	<i>B. mutus</i>	福建	SNJ-8
9	水牛角(丝)	<i>B. mutus</i>	云南	SNJ-9
10	牦牛角(丝)	<i>B. mutus</i>	安徽怀远	SNJ-10
11	水牛角(丝)	<i>B. mutus</i>	广西	SNJ-11
12	水牛角(粉)	<i>B. bubalis</i>	广西	SNJ-12
13	牦牛角(丝)	<i>B. mutus</i>	广西	SNJ-13
14	水牛角(粉)	<i>B. bubalis</i>	安徽亳州	SNJ-14
15	牦牛角(丝)	<i>B. mutus</i>	安徽蚌埠	SNJ-15
16	牦牛角(丝)	<i>B. mutus</i>	安徽亳州	SNJ-16
17	水牛角(丝)	<i>B. bubalis</i>	安徽亳州	SNJ-17
18	牦牛角(丝)	<i>B. mutus</i>	安徽亳州	SNJ-18
19	牦牛角(丝)	<i>B. mutus</i>	安徽亳州	SNJ-19
20	牦牛角(丝)	<i>B. mutus</i>	广东广州	SNJ-20
21	牦牛角(丝)	<i>B. mutus</i>	广东广州	SNJ-21
22	牦牛角(丝)	<i>B. mutus</i>	广东广州	SNJ-22
23	水牛角对照药材	<i>B. bubalis</i>	中国食品药品检定研究院	121627-201001

聚乙烯吡咯烷酮-40[生工生物工程(上海)股份有限公司], 曲拉通 X-100(A110694), 水牛源性 RAA 快速检测干粉反应管 (委托杭州众测生物技术有限公司定制生产), SpeedSTAR HS *Taq* DNA 聚合酶 (批号 RR070A), 2 000 bp DNA Marker(北京全式金生物技术

有限公司,批号 BM101)。

Genie II 型便携式恒温荧光扩增仪(Optigene 公司),Veriti™ 型聚合酶链式反应(PCR)仪(美国 Applied Biosystem 公司),VORTEX-2 GENI 型漩涡震荡仪(美国 Scientific Industries 公司);SYNGENE SYNGENE 型凝胶成像系统(GENE 公司)。

2 方法

2.1 基因组 DNA 提取 样品使用 70% 乙醇擦拭表面,晾干,使用混合冷冻混合球磨仪(德国莱驰公司),粉碎成粉末。取待检粉末 0.05 g,置 2.0 mL 离心管中,加入提取缓冲液 200 μL(含氢氧化钠 0.5 mol·L⁻¹,1% 聚乙烯吡咯烷酮-40,1% 曲拉通

X-100),充分混匀;加入 0.1 mol·L⁻¹ tris-盐酸溶液(pH 8.0) 800 μL,混匀,静置 2 min;将上清液 100 μL 转移至另一离心管中,加入无菌双蒸水 500 μL,混匀,即获得供试品 DNA^[2]。

2.2 引物设计 使用 Clustal W 程序对其序列进行多重序列比对分析 Genbank 中水牛(*Bubalus bubalus*)和牦牛(*B. mutus*),分析水牛及牦牛全线粒体基因组序列(GenBank 登录号分别为 AY488491.1, AF547270.1, KX758402.1, KR106993.1, KM233417.1, KY829451.1),寻找差异大的区域设计 RAA 扩增引物及分子检测探针。由生工生物工程(上海)股份有限公司合成(表 2)。

表 2 水牛角 RAA 鉴别引物与探针序列

Table 2 RAA identification primers and oligo for Bubalus Cornu

名称	序列(5'-3')	类别
SNJ-1	上游 TATCGCAGCACTTGAATAGTCCACCTATT	正向引物
SNJ-1	下游 ATAGTAGGGCGCCTAGGATGCTCTTAATGGTG	反向引物
SNJ-1. Probe	CCACGAAACAGGATCCAACAACCCAACAGGAA[FAMdT][THF][BHQdT]CATCAGACACAGACA	荧光探针

注:探针修饰方式为 FAM-dT(thymidine nucleotide carrying fluorophore),BHQ1-dT(thymidine nucleotide carrying Black Hole Quencher-1)和 THF(tetrahydrofuran spacer)。

2.3 RAA 扩增条件 在 200 μL PCR 反应管中进行 RAA 反应,反应体系为水牛源性 RAA 快速检测干粉反应管[含 1 mmol·L⁻¹ 脱氧核糖核苷三磷酸(dNTP),90 mg·L⁻¹ 单链结合(SSB)蛋白,120 mg·L⁻¹ RecA 重组酶蛋白(SC-RecA/BS-RecA)或 30 mg·L⁻¹ RAD 51,30 mg·L⁻¹ Bsu DNA 聚合酶,100 mmol·L⁻¹ Tricine,20% PEG,5 mmol·L⁻¹ 二硫苏糖醇,100 mg·L⁻¹ 肌酸激酶,Exo 核酸外切酶]中依次加入,20% PEG 12.5 μL,正向引物、反向引物(10 μmol·L⁻¹)各 2.0 μL,模板 2.0 μL,最后加入 280 mmol·L⁻¹ 乙酸镁 2.5 μL,灭菌无核酸酶的水补足至 50 μL,混合均匀,瞬时离心 3~5 s。将上述反应管放入恒温水浴锅,37 °C 反应 25 min。RAA 反应结束后,取反应产物,加入 6 × Loading buffer 5 μL(Takara 公司),混匀后于溴化乙啶(EB)染色的 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,SYNGENE 凝胶成像系统观察、成像。

2.4 水牛角荧光 RAA 检测 在 200 μL PCR 管中进行荧光 RAA 反应,水牛源性 RAA 快速检测干粉反应管,荧光探针(10 μmol·L⁻¹)0.6 μL,模板 2.0 μL,最后加入 280 mmol·L⁻¹ 乙酸镁 2.5 μL,灭菌无核酸酶的水补足至 50 μL,混合均匀,瞬时离心 3~5 s。将上述反应管放入便携式恒温荧光扩增仪

中,37 °C 反应 15 min。另取无菌蒸馏水,同法 RAA 扩增操作,作为阴性对照。

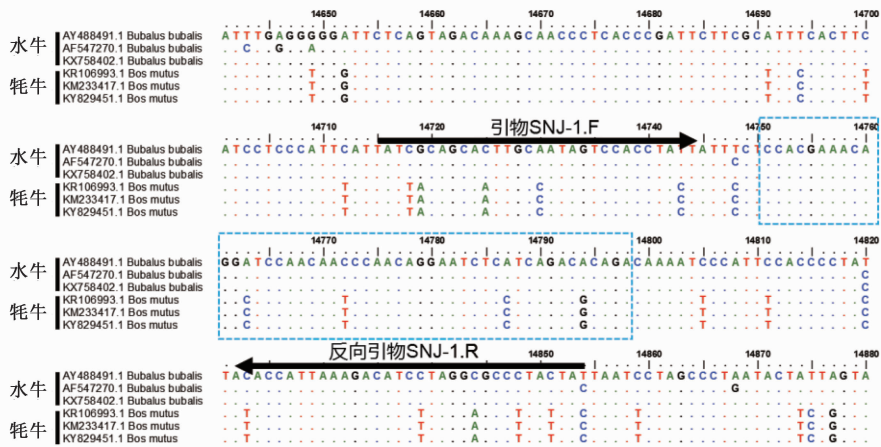
2.5 测序验证 使用通用引物对样品进行测序验证,对比与 RAA 鉴别结果的符合程度。CO I 序列扩增引物 HCO2198 5'-TAAACTTCAGGGTGA CCAAAAAATCA-3' 和 LCO1490 5'-GGTCAACAAA TCATAAAGATATTGG-3'。25 μL PCR 反应体系包含 10 × PCR buffer 2.5 μL,10 mmol·L⁻¹ dNTPs 1.5 μL,上游及下游引物 0.25 μL,speedSTAR HS Taq DNA 聚合酶 0.2 μL,DNA 模板 1 μL,加灭菌蒸馏水补足至 25 μL。PCR 扩增程序为 94 °C 预变性 3 min;5 循环(94 °C 30 s,45 °C 30 s,72 °C 30 s),然后 35 循环(94 °C 20 s,50 °C 20 s,72 °C 45 s);72 °C 终延伸 5 min。扩增产物使用 EB 染色的 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。取阳性扩增产物送由睿博兴科生物技术有限公司进行双向测序。使用 BioEdit 7.2.6 软件对测序峰图进行校对、去除引物序列并拼接,获得对应测序结果。测序结果与 NCBI nucleotide 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>)进行 BLAST 比对,确定比对结果。

3 结果与分析

3.1 引物设计 从 Genbank 数据库中下载水牛与牦牛全线粒体基因组序列,分析水牛特有的 SNP

位点,并从特异性 SNP 位点中筛选合适的鉴别位点,以序列 AY488491.1 为参照,选择线粒体上第 14 715 ~14 744 上的 5 个水牛特异性 SNP 位点设计上游正向鉴别引物 SNJ-1. F,选择线粒体上第 14 823 ~14 854 上的 6 个水牛特异性 SNP 位点设计下游反向鉴别引物 SNJ-1. R,引物均与水牛序列

完全匹配而与牦牛序列存在 11 个差异碱基,预期水牛角 DNA 通过 RAA 扩增获得 139 bp 的特异鉴别片段,牦牛角 DNA 因存在扩增阻滞而不产生扩增产物,为进一步增强 RAA 反应的特异性和灵敏度,在扩增区域内设计水牛序列完全匹配的荧光检测探针(图 1)。



蓝色方框为荧光探针设计区域

图 1 水牛角特异性 RAA 鉴别引物设计示意

Fig.1 Schematic of design RAA identify primers for Bubalus Cornu

3.2 水牛角 RAA 鉴别 使用 RAA 鉴别方法对收集的 9 批水牛角样品和 13 批牦牛角样品进行分子鉴定,使用碱裂解法快速提取 DNA 后,在 37 °C 恒温孵育 25 min 后进行琼脂糖凝胶电泳,结果 7 批水牛角 (SNJ-1, SNJ-3, SNJ-4, SNJ-5, SNJ-6, SNJ-14, SNJ-17) 扩增获得约 140 bp 的明亮鉴别条带,2 批水牛角样品 (SNJ-7, SNJ-12) 有较微弱扩增,2 批牦牛角样品 (SNJ-8, SNJ-11) 有极微弱扩增(图 2)。

产物制成质粒,提取质粒 DNA 作为阳性对照 (Positive)。另提取水牛角对照药材 DNA 作为对照药材对照 (DZYC),与待测样品同时进行 RAA 实时荧光鉴别。结果在 37 °C 恒温条件下,阳性对照在 4.05 min 出现特异性 RAA 扩增曲线,对照药材在 7.23 min 出现特异性扩增,9 批水牛角样品 (SNJ-1, SNJ-3, SNJ-4, SNJ-5, SNJ-6, SNJ-7, SNJ-12, SNJ-14, SNJ-17) 的 DNA 经 RAA 反应均在 6.21 ~ 8.37 min 内出现特异性扩增,牦牛角样品均在 10.08 min 后才出现扩增。通过扩增曲线开始的时间差异可以准确鉴别水牛角和牦牛角(图 3)。



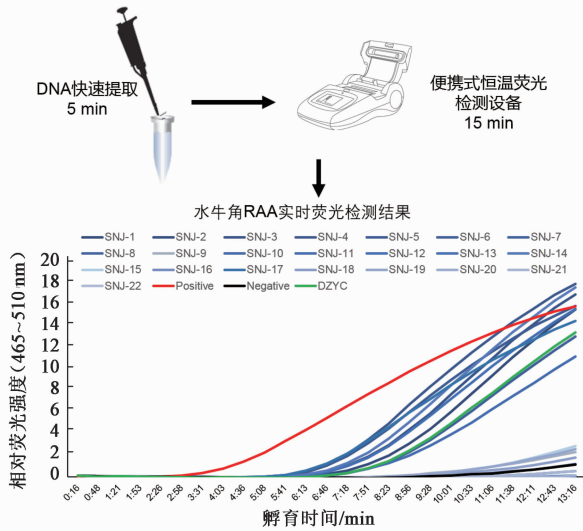
1 ~ 22. SNJ-1 ~ SNJ-22; M. DL2000 Marker; N. 阴性对照 (dd H₂O 为模板)

图 2 水牛角 RAA 鉴别凝胶电泳

Fig.2 Electrophoresis pattern of RAA identify Bubalus Cornu and yak horn

3.3 水牛角的 RAA 实时荧光鉴别 为进一步增加水牛角 RAA 鉴别的准确性和灵敏度,消除凝胶制备、电泳过程对仪器的依赖性,本研究使用便携式恒温荧光扩增仪进行水牛角与牦牛角的 RAA 荧光鉴别。通过 TA 克隆将含有水牛源性目的片段的 PCR

3.4 RAA 鉴别与 DNA 测序鉴别结果的比较 扩增样品的 CO I 并进行测序,BLAST 表明 9 批样品 (SNJ-1, SNJ-3, SNJ-4, SNJ-5, SNJ-6, SNJ-7, SNJ-12, SNJ-14, SNJ-17) CO I 序列比对最相似物种为水牛,10 批样品最相似物种为野牦牛 (*B. grunniens*) 或牦牛,另有 3 批样品比对结果为葡萄球菌属或假单胞菌属物种。RAA 荧光检测结果与 DNA 测序结果相一致,DNA 测序为水牛角正品的样品使用 RAA 荧光鉴别均为正品,而 RAA 凝胶电泳则有 4 批样品条带很暗,难以准确判定真伪(表 2)。相比 RAA 凝胶电泳鉴别,RAA 荧光鉴别结果与测序结果符合度更好,其原因可能是 RAA 荧光鉴别增加了荧光探针,



Positive. 阳性对照 (目的片段质粒); Negative. 阴性对照 (dd H₂O 为模板); DZYC. 水牛角对照药材

图 3 实时荧光 RAA 鉴别水牛角及牦牛角

Fig. 3 Fluorescent-RAA to real-time identify Bubalus Cornu and yak horn

表 2 水牛角 RAA 与 DNA 测序鉴别结果的比较

Table 2 Compare of DNA sequencing result with RAA detection in identify Bubalus Cornu

编号	BLAST 比对	序列一致性 /%	GenBank 登录号	RAA 凝胶电泳	荧光 RAA 出峰时间	荧光 RAA
SNJ-1	<i>Bubalus bubalis</i>	99	VKX758396.1	+	7.83	+
SNJ-2	<i>Bos grunniens</i>	99	MG837551.1	-	ND	-
SNJ-3	<i>B. bubalis</i>	99	VKX758396.1	+	7.42	+
SNJ-4	<i>B. bubalis</i>	99	MG837551.1	+	6.49	+
SNJ-5	<i>B. bubalis</i>	99	KX758396.1	+	6.50	+
SNJ-6	<i>B. bubalis</i>	99	MG837551.1	+	7.90	+
SNJ-7	<i>B. bubalis</i>	99	MG837551.1	Δ	8.37	+
SNJ-8	<i>Pseudomonas sp.</i>	92	KT767905.1	Δ	ND	-
SNJ-9	<i>Bos grunniens</i>	99	MG837551.1	-	11.5	-
SNJ-10	<i>B. mutus</i>	98	CP027082.1	-	11.5	-
SNJ-11	<i>B. grunniens</i>	99	MG837551.1	Δ	10.08	-
SNJ-12	<i>Bubalus bubalis</i>	99	KX758396.1	Δ	7.19	+
SNJ-13	<i>B. grunniens</i>	99	MG837551.1	-	ND	-
SNJ-14	<i>B. bubalis</i>	98	KX758396.1	+	7.05	+
SNJ-15	<i>B. grunniens</i>	99	MG837551.1	-	11.5	-
SNJ-16	<i>Staphylococcus simulans</i>	89	LS483313.1	-	11.5	-
SNJ-17	<i>Bubalus bubalis</i>	99	KX758352.1	+	6.21	+
SNJ-18	<i>B. mutus</i>	99	CP027082.1	-	11.5	-
SNJ-19	<i>B. grunniens</i>	99	MG837551.1	-	ND	-
SNJ-20	<i>B. grunniens</i>	99	MG837551.1	-	ND	-
SNJ-21	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	98	KT369585.1	-	ND	-
SNJ-22	<i>Bos mutus</i>	98	KR106993.1	-	ND	-

注: +. 阳性结果; -. 阴性结果; Δ. 模糊条带; ND. 未检出。

荧光探针也位于水牛角和牦牛角序列的差异区域, 相当于额外增加了用于鉴别的 SNP 位点(图 1)。

4 讨论

重组酶介导扩增技术是一种在恒温下快速扩增核酸的方法。在 37 °C 恒温下, 重组酶可与引物 DNA 紧密结合, 形成酶和引物的聚合体, 使用单链结合蛋白辅助模板 DNA 解链, 并在 DNA 聚合酶和辅酶的作用下, 形成新的 DNA 互补链, 使反应产物以指数级增长。该方法可在近人体温度甚至室温下启动 DNA 的快速扩增, 20 min 内即可达到供检出的扩增量, 尤其是 RAA 反应体系中加入核酸外切酶和携带有荧光基团的荧光探针情况下, 10 min 左右即可实现对起始模板的定性及定量分析。

本研究使用碱裂解法提取水牛角 DNA, 利用水牛与牦牛线粒体序列上的 11 个差异 SNP 位点设计出特异性鉴别引物进行 RAA 鉴别反应, 在 15 min 内即可准确鉴别水牛角及其混伪品牦牛角。本研究设计引物时发现, 正伪品差异 SNP 位点的数量和

分布对鉴别引物的设计有重要影响,为满足特异性的要求,RAA 鉴别引物一般需要有 2 ~ 5 个差异 SNP 位点存在,且其分布越集中,所设计引物的鉴别效果越好。而中药 DNA 分子鉴别上常用的特异性 PCR 技术最少仅需 1 个 SNP 位点即可鉴别正伪品^[12],这在一定程度上限制了 RAA 技术的推广。

即使存在对部分近缘物种难以设计鉴别引物的问题,RAA 仍是最有潜力的中药现场 DNA 分子鉴定候选方法,与 PCR 法相比,RAA 是在 37 ℃ 恒温下反应,操作简单,无需复杂仪器,结合碱裂解法快速提取 DNA,大大缩短了检测时间(10 ~ 15 min),可做大量样品的现场快速检测。与 LAMP 法相比,RAA 引物探针设计更简单,反应温度更低,扩增反应时间等短,具有更好的现场快检使用性。该方法快速、准确、方便,适于在食药监检验系统进一步推广应用,具有巨大的应用前景和重要意义。

[参考文献]

[1] 袁媛,蒋超,黄璐琦. 中药材分子鉴别现场运用的策略与实践[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(16): 2553-2555.
[2] 蒋超,黄璐琦,袁媛,等. 使用碱裂解法快速提取药材 DNA 方法的研究[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(7): 1081-1090.
[3] 杨璐,吴文如,付菲,等. 新型快速中药材 DNA 提取方

法的探索与应用[J]. 中草药, 2019, 50(2): 502-509.
[4] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(12): e63.
[5] Vincent M, XU Y, KONG H. Helicase-dependent isothermal DNA amplification [J]. EMBO Rep, 2004, 5(8): 795-800.
[6] Piepenburg O, Williams C H, Stemple D L, et al. DNA detection using recombination proteins [J]. PLoS Biol, 2006, 4(7): e204.
[7] TIAN E, LIU Q, YE H, et al. A DNA barcode-based RPA assay (BAR-RPA) for rapid identification of the dry root of *Ficus hirta* (Wuzhimaotao) [J]. Molecules, 2017, 22(12): 2261.
[8] 冯军. 环介导等温扩增对何首乌及其混伪品的快速鉴定[D]. 广州:华南理工大学, 2009.
[9] 赵源,宋云,李明福,等. 基于 LAMP 的人参物种鉴定技术的研究[J]. 植物检疫, 2015, 29(5): 30-34.
[10] 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, 2015: 83.
[11] 刘旭朝,周丽思,刘金欣,等. 基于 COI 序列的水牛角及其易混伪品 DNA 条形码鉴定研究[J]. 药学报, 2017, 52(3): 494-499.
[12] 黄璐琦,袁媛. 中药分子鉴定操作指南[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2014: 49.

[责任编辑 顾雪竹]