

地骨皮的多重位点特异性PCR鉴别

石旸, 胡力, 赵玉洋, 蒋超, 金艳, 穆婧*, 袁媛*

(中国中医科学院 中药资源中心, 北京 100700)

[摘要] 目的:使用多重位点特异性聚合酶链式反应(PCR)的方法,简单高效地鉴定地骨皮(*Lycii Cortex*)的2种基原植物枸杞(*Lycium chinense*)和宁夏枸杞(*L. barbarum*)。方法:在使用植物叶绿体基因组数据库(CGIR)获取枸杞和宁夏枸杞叶绿体基因组序列的基础上,利用IdenDSS软件筛选出两基原间特定的单核苷酸多态性(SNP)位点,并利用Primer 5.0软件设计获得特异性鉴别引物,包括鉴别枸杞的引物GQ-F/R、鉴别宁夏枸杞的引物NX-F/R。对引物浓度比、退火温度、循环次数、*Taq*酶进行优化,形成最适的PCR鉴别体系和条件,并对采集自不同地区的地骨皮进行适用性考察。结果:对影响PCR结果的各个条件进行考察优化后,最终确定枸杞和宁夏枸杞的引物浓度比为2:1、退火温度为59℃、循环次数为30次时,来自不同产区地骨皮的2个基原枸杞和宁夏枸杞分别在183、295 bp的位置出现特异性鉴别条带。结论:通过一次PCR即可方便、快捷、高效地鉴定地骨皮的基原,为枸杞和宁夏枸杞的专属性鉴别提供新方法,同时对含有地骨皮成分的经典名方的研发提供一定的技术支持。

[关键词] 地骨皮; 枸杞; 宁夏枸杞; 分子鉴定; 聚合酶链式反应

[中图分类号] R284.2;R289;R287;R22;R2-031;R33;R24 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2024)04-0035-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20230816

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20230711.1041.001>

[网络出版日期] 2023-07-11 13:07:12

Identification of Original Plants of *Lycii Cortex* by Multiplex Allele-specific PCR

SHI Yang, HU Li, ZHAO Yuyang, JIANG Chao, JIN Yan, MU Jing*, YUAN Yuan*

(National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To identify *Lycium chinense* and *L. barbarum* as the original plants of *Lycii Cortex* simply and efficiently by multiple allele-specific polymerase chain reaction (PCR). **Method:** The chloroplast genome sequences of *L. chinense* and *L. barbarum* were downloaded from the Chloroplast Genome Information Resource (CGIR), and then IdenDSS was employed to screen out the specific single nucleotide polymorphism (SNP) sites between the two plants. Primer 5.0 was used to design the specific primers, including primers GQ-F/R for identifying *L. chinense* and primers NX-F/R for identifying *L. barbarum*. Furthermore, the primer concentration ratio, annealing temperature, cycles, and *Taq* enzyme were optimized to establish the optimal PCR system and conditions for plant identification. Finally, the applicability of the established method was examined with the plant samples collected from different regions. **Result:** The PCR with GQ-F/R: NX-F/R concentration ratio of 2: 1 at the annealing temperature at 59 °C and for 30 cycles showed specific bands at

[收稿日期] 2023-04-27

[基金项目] 国家科技部科技基础资源调查专项(2018FY100800);中国中医科学院科技创新工程项目(C12021A041,C12021B014);国家中医药管理局青年岐黄学者项目

[第一作者] 石旸, 实习研究员, 从事中药分子鉴定研究, E-mail: anna9605@126.com

[通信作者] *穆婧, 副研究员, 从事中药学研究, E-mail: nrc_cmm@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

183 bp and 295 bp, respectively, for *L. chinense* and *L. barbarum* samples from different regions. **Conclusion:** The established PCR approach can simply, rapidly, and efficiently identify the original plants of Lycii Cortex, serving as a new method for the discrimination between *L. chinense* and *L. barbarum*. Moreover, the method provides technical support for the research and development of classic famous prescriptions containing Lycii Cortex.

[Keywords] Lycii Cortex; *Lycium chinense*; *Lycium barbarum*; molecular identification; polymerase chain reaction

2020年版《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)收录的地骨皮(Lycii Cortex)为中医常用药材,具备清肺降火、凉血去热的功能。地骨皮作为一种多基原药材,为茄科下栒杞(*Lycium chinense*)或者宁夏栒杞(*L. barbarum*)的干燥根皮^[1]。1963年及以前出版的《中国药典》中地骨皮只收录栒杞的根皮,现今主要分布在山西、安徽、江苏、宁夏等地。1977年版《中国药典》开始,地骨皮的基原增加了宁夏栒杞,其现今主要生长在宁夏、河北、内蒙古等地^[2-4]。还有部分地方采用了云南栒杞(*L. yunnanense*)、黑果栒杞(*L. ruthenicum*)等种类的根皮作为民族药材应用^[5]。

经典名方是中医药经过临床实践证明、疗效明确且被后世推广的方剂。对于药材基原的研究是经典名方研发的基础。《古代经典名方目录(第一批)》^[6]中共有5首方剂涉及地骨皮,进行本草考证后认为其基原主要为栒杞的干燥根皮^[4-5]。随着宁夏栒杞的大规模种植,使得市售地骨皮的基原容易发生混淆,且因栒杞和宁夏栒杞的根皮外观相似,从性状鉴定和显微鉴定上并不能很好地进行区分^[7]。在理化鉴定上,采用超高效液相色谱法(UPLC),发现两者的化学轮廓相似,化学组成基本一致^[8]。此前一项发明专利利用甲醇-乙酸混合溶液对地骨皮进行提取,并注入填充剂十八烷基硅烷键合硅胶,进行梯度洗脱后建立地骨皮药材的UPLC特征图谱;同时采用超高效液相色谱-质谱串联法(UPLC-MS/MS)标定了2个特征峰,可以区分地骨皮的2个基原^[9],但该方法需要大型仪器,检测成本较高。因此,仍需要开发一个更加方便、快捷、高效的技术手段进行补充。

特异性聚合酶链式反应(PCR)技术是基于单核苷酸多态性(SNP)位点的基因分型方法,已广泛应用于中药种子种苗、中药材和饮片、提取物、配方颗粒的鉴别,具有准确、高效的优势。本研究拟在获取栒杞和宁夏栒杞DNA特征性片段(DSS)的基础上,建立地骨皮多重位点特异性PCR的鉴别方法,

为其基原鉴定和产品质量规范提供检测手段。

1 材料

1.1 样品来源 收集来自27个地区共计30批次的地骨皮样品中,栒杞和宁夏栒杞各15批,样品于中国中医科学院中药资源中心保存,见表1和表2,由蒋超副研究员进行鉴定。以鉴定准确的7批栒杞和6批宁夏栒杞原植物进行方法学研究,另从市场上购买来自不同地区的地骨皮用于适用性考察。

表1 地骨皮原植物样品信息

Table 1 Information of Lycii Cortex

No.	物种名	拉丁学名	产地	批次	样品编号
1	栒杞	<i>Lycium chinense</i>	山东青岛	1	GQ-1
2	栒杞	<i>L. chinense</i>	安徽来安	1	GQ-2
3	栒杞	<i>L. chinense</i>	安徽	3	GQ-3/4/5
4	栒杞	<i>L. chinense</i>	河北	1	GQ-6
5	栒杞	<i>L. chinense</i>	湖南	1	GQ-7
6	宁夏栒杞	<i>L. barbarum</i>	内蒙古	1	NX-1
7	宁夏栒杞	<i>L. barbarum</i>	河北	1	NX-2
8	宁夏栒杞	<i>L. barbarum</i>	甘肃平凉	1	NX-3
9	宁夏栒杞	<i>L. barbarum</i>	宁夏银川	3	NX-4/5/6

1.2 试剂 Plant Genomic DNA Kit 植物基因组DNA提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司,批号DP305]; 2×M5 Super Fast Taq PCR Master Mix (2×M5,北京聚合美生物技术有限公司,批号MF164-01); TaKaRa TaqTM[rTaq,宝日医生物技术(北京)有限公司,批号P019-01]; 2×Taq Plus Master Mix II (2×Taq)、2×Rapid Taq Master Mix (2×rTaq)(诺唯赞生物科技股份有限公司,批号分别为P222-01、P213-01); 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)。

1.3 仪器 VeritiTM型PCR仪、GeneAmp[®]9700型PCR仪(美国Applied Biosystem公司); PTC-100型PCR仪(美国Gene公司); TC-512型PCR仪(上海

表2 市场购买的地骨皮样品信息

Table 2 Information of commercial materials of Lycii Cortex

No.	物种名	拉丁学名	采集地	批次	样品编号
1	枸杞	<i>L. chinense</i>	广东清远	1	GQ-8
2	枸杞	<i>L. chinense</i>	重庆开州	1	GQ-9
3	枸杞	<i>L. chinense</i>	广东惠州	1	GQ-10
4	枸杞	<i>L. chinense</i>	上海青浦	1	GQ-11
5	枸杞	<i>L. chinense</i>	广西柳州	1	GQ-12
6	枸杞	<i>L. chinense</i>	广东梅州	1	GQ-13
7	枸杞	<i>L. chinense</i>	福建漳州	1	GQ-14
8	枸杞	<i>L. chinense</i>	江苏南通	1	GQ-15
9	宁夏枸杞	<i>L. barbarum</i>	甘肃定西	1	NX-7
10	宁夏枸杞	<i>L. barbarum</i>	甘肃兰州	1	NX-8
11	宁夏枸杞	<i>L. barbarum</i>	安徽亳州	1	NX-9
12	宁夏枸杞	<i>L. barbarum</i>	安徽霍山	1	NX-10
13	宁夏枸杞	<i>L. barbarum</i>	四川成都	1	NX-11
14	宁夏枸杞	<i>L. barbarum</i>	云南大理	1	NX-12
15	宁夏枸杞	<i>L. barbarum</i>	安徽亳州	1	NX-13
16	宁夏枸杞	<i>L. barbarum</i>	宁夏	2	NX-14/15

Techne公司); Universal Hood III型凝胶成像仪、核酸电泳仪(美国Bio-Rad公司)。

2 方法

2.1 引物设计 利用CGIR数据库中收录的枸杞和宁夏枸杞的叶绿体基因组数据,结合IdenDSS软件获得枸杞和宁夏枸杞特有的DSS序列,引物相关信息见表3。

表3 DSS及引物信息

Table 3 DSS and primers information

物种	DSS序列	引物	序列(5'-3')	叶绿体基因组序列编号
枸杞	ATCCATACCGGCCAAACTTGGATTCTGACCCA ATCCAA	GQ-dss	上游 CCTCTCGATGATCTTGAATCGG 下游 AGGCCCAATCGACGAAAGAA	NC_042204.1
宁夏枸杞	CACGTGGAACGCTCTTTAATGGAACCTTAACC TTAGCTG	NX-dss	上游 TGGAGTAGTCGGTCTAGCCC 下游 CTGGTACGAAATGGGCCACT	NC_041110.1

表4 枸杞、宁夏枸杞特异性鉴别引物

Table 4 Specific primer of *L. chinense* and *L. barbarum*

物种	引物	序列(5'-3')	长度 /bp
枸杞	GQ	上游 AGTTCCTTTATCCATACCCG 下游 TGTAACCTATGTGACCACTGGA	183
宁夏枸杞	NX	上游 GCGATAACTCGGTATATGC 下游 TCTTAGAAACCAATCGCG	295

注: C、G为引入的错配碱基

2.2 基因组DNA提取 取样品100 mg经液氮速冻后研磨成粉,使用植物基因组DNA提取试剂盒进行

息见表3。将DSS序列与两基原扩增产物序列进行比对得到SNP位点^[10]。利用Primer 5.0软件分别设计鉴别枸杞的引物GQ-上游/下游、鉴别宁夏枸杞的引物NX-上游/下游,2个物种的特异性鉴别引物,见表4。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

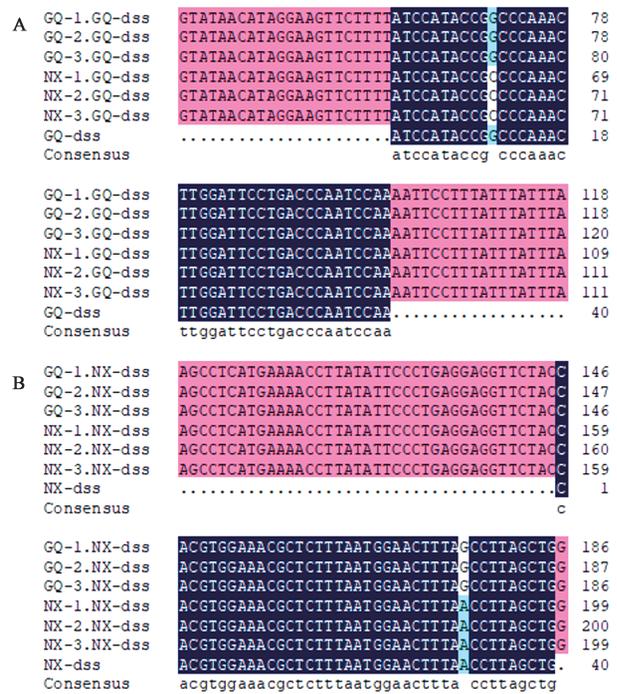
枸杞和宁夏枸杞的基因组DNA提取,后放入-20℃冰箱中备存使用。

2.3 多重位点特异性PCR扩增条件的确定 使用特异性鉴别引物对枸杞和宁夏枸杞的基因组DNA进行扩增,考察条件如下:①枸杞和宁夏枸杞的特异性鉴别引物浓度比(宁夏枸杞的上下游引物用量固定为0.2 μL)为1:1、2:1、3:1、4:1;②退火温度为57、59、61、63℃;③PCR循环次数为28、30、32、34个循环;④Taq酶种类为2×M5 Super Fast Taq PCR Master Mix; 2×Taq Plus Master Mix II;

2×Rapid Taq Master Mix; TaKaRa Taq™; ⑤PCR仪型号分别为 GeneAmp®9700 型、TC-512 型、Verti Pro 型、Verti 96 型。

3 结果与分析

3.1 枸杞和宁夏枸杞 DSS 分子标记的验证 使用枸杞和宁夏枸杞的 DSS 分子标记扩增引物 GQ-dss-F/R、NX-dss-F/R 分别对来自表 1 的 6 批样品(GQ-1/2/3, NX-1/2/3)进行 PCR 扩增后送生物公司测序。使用 DNAMAN 软件将 DSS 标记分别与两基原扩增产物的测序结果进行比对,见图 1。结果显示,枸杞的扩增产物序列信息中均存在枸杞的 DSS 标记,但与宁夏枸杞扩增产物的测序结果比对发现与 DSS 存在 SNP 位点;宁夏枸杞的的扩增产物序列信息中均存在宁夏枸杞的 DSS 标记,但与枸杞扩增产物的测序结果比对发现与 DSS 存在 SNP 位点。结果表明 2 个基原的 DSS 标记可用于枸杞和宁夏枸杞的基原鉴定。



注:A. 枸杞;B. 宁夏枸杞

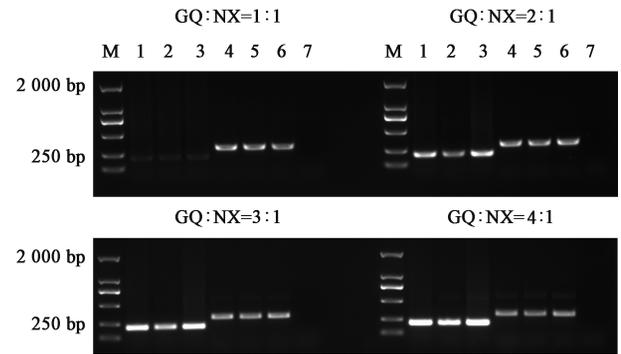
图1 枸杞和宁夏枸杞 DSS 与扩增产物序列比对

Fig. 1 Comparison of DSS and amplified product sequences

3.2 PCR 鉴别条件的确定

3.2.1 引物浓度比 枸杞 GQ 和宁夏枸杞 NX 特异性引物浓度比为 1:1、2:1、3:1、4:1 时,枸杞和宁夏枸杞可分别获得 183、295 bp 的特异性条带,见图 2。加大枸杞鉴别引物用量可以增加条带亮度,但在引物浓度比为 3:1 和 4:1 时出现非特异性条带。因此,PCR 反应体系中枸杞和宁夏枸杞的引物比确定

为 2:1。



注: M. Trans 2K DNA Marker; 1~3. 枸杞; 4~6. 宁夏枸杞; 7. H₂O (无菌双蒸水)(图 3-图 7 同)

图2 引物比对地骨皮多重位点特异性 PCR 鉴别的影响

Fig. 2 Influence of primers ratio on Lycii Cortex of specific identification

3.2.2 退火温度 考察退火温度分别为 57、59、61、63 °C 时对 PCR 反应的影响,结果发现,退火温度在 57 °C 时,可见非特异性条带,在 61、63 °C 时温度越高条带越暗,直至 63 °C 时特异性条带未出现。在退火温度为 59 °C 时,枸杞和宁夏枸杞样本可获得 183、295 bp 的特异性条带,见图 3,因此确定最适 PCR 退火温度为 59 °C。

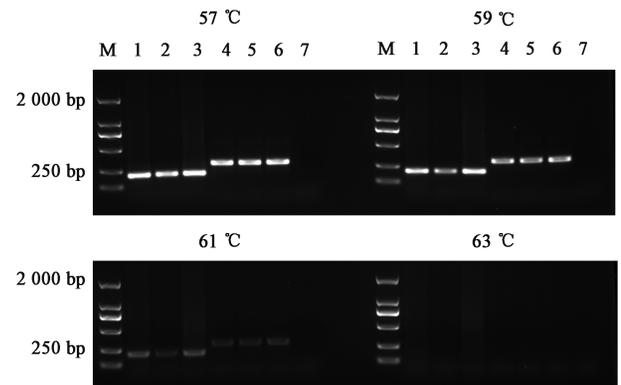


图3 退火温度对地骨皮多重位点特异性 PCR 鉴别的影响

Fig. 3 Influence of annealing temperature on Lycii Cortex of specific identification

3.2.3 循环次数 考察 PCR 反应循环为 28、30、32、34 个循环时对 PCR 反应的影响,结果发现,当循环数为 28、30 个时,枸杞和宁夏枸杞样本可分别获得 183、295 bp 的特异性条带,但 28 个循环时条带显示较暗。32、34 个循环以上时,样本出现非特异性条带,见图 4,因此确定最适 PCR 循环次数为 30 个循环。

3.2.4 Taq 酶种类考察 为了筛选最适的 DNA 聚合酶,分别使用 2×M5、2×Taq、2×rTaq、rTaq 进行 PCR 扩增,结果表明上述 DNA 聚合酶可获得相应条

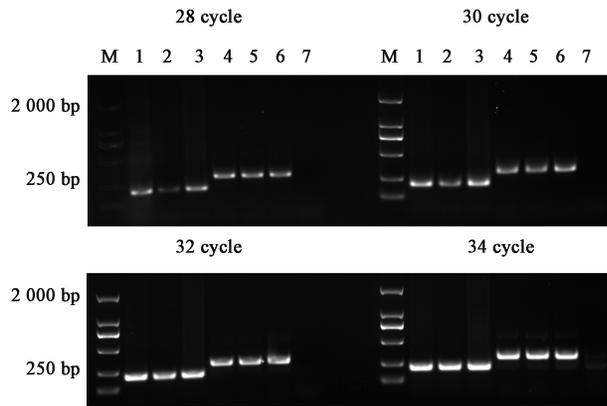


图4 循环次数对地骨皮多重位点特异性PCR鉴别的影响
Fig. 4 Influence of thermo cycles number on Lycii Cortex of specific identification

带,且使用2×M5时特异性条带最亮,见图5。使用2×Taq Plus Master Mix II、2×Rapid Taq Master Mix进行地骨皮鉴别时可适当增加模板量来提高特异性条带亮度。

3.2.5 PCR仪考察 分别使用Verti Pro型、Verti 96型、GeneAmp®9700型、TC-512型PCR仪进行PCR扩增,除了GeneAmp®9700型出现非特异性条带外,其余PCR仪均可获得相应所需条带。表明以Verti Pro型、Verti 96型、TC-512型PCR仪均能进行鉴别, GeneAmp®9700型鉴别时应调整扩增温度,并重新进行PCR扩增条件的确定,见图6。

3.2.6 地骨皮两基原特异性PCR鉴别方法的确定
本实验最终确定25 μL的PCR反应体系及条件,

表5 PCR扩增的反应体系及条件

Table 5 Reaction system and conditions of PCR amplification

体系	条件
PCR反应体系(25 μL)	2×M5 Super Fast Taq PCR MasterMix加12.5 μL,枸杞特异性鉴别引物上下游各0.4 μL,宁夏枸杞特异性引物上下游各0.2 μL, DNA模板1.5 μL,双蒸灭菌水9.8 μL
PCR扩增条件	95 °C预变性3 min;94 °C变性20 s,59 °C退火20 s,72 °C延伸30 s,共30个循环;最终72 °C延伸5 min
电泳条件	取PCR产物6 μL点样在已加入GelRed核酸染料染色的1.5%琼脂糖凝胶上,200 V电压条件下电泳25 min

3.3 适用性考察 按照表5所示PCR反应条件和体系,对30份枸杞和宁夏枸杞样品进行扩增,利用1.5%琼脂糖凝胶通过电泳观察条带位置。结果枸杞均出现183 bp的特异性条带,宁夏枸杞均出现约295 bp的特异性条带,表明上述条件和体系能够正确鉴定枸杞和宁夏枸杞,见图7。

4 讨论

精准鉴定中药材基原一直是中药鉴定的难点问题,其中DNA分子鉴定不受植物组织器官和发育阶段的限制而被众多学者广泛使用。2010年版《中

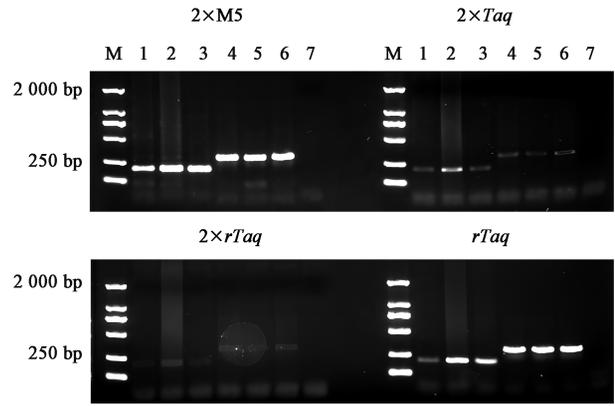


图5 Taq酶种类对地骨皮多重位点特异性PCR鉴别的影响
Fig. 5 Influence of different kinds of Taq polymerases on Lycii Cortex of specific identification

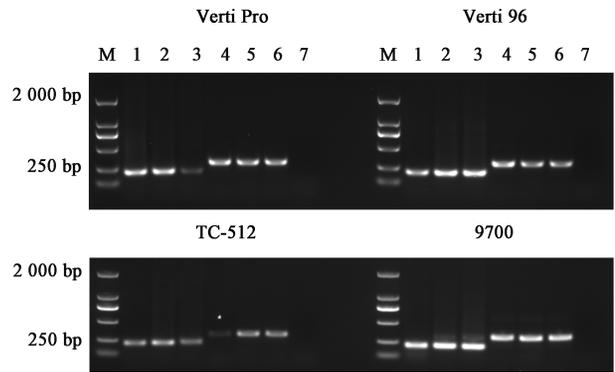


图6 不同PCR仪对地骨皮多重位点特异性PCR鉴别的影响
Fig. 6 Influence of different PCR instruments on Lycii Cortex of specific identification

见表5。

国药典》已将特异性PCR技术鉴定蕲蛇和乌梢蛇的方法进行收录,该方法与传统的分子鉴定方法相比操作简单、重复性好;采用特异性引物可以避免假阳性结果;鉴定需要的DNA量不多且对质量要求不高;电泳后的条带单一,无需后续鉴定实验^[1]。因叶绿体基因组序列具有相对较高的保守性而常被用于药材正伪品鉴别方法的研究。在此基础上发展的多重位点特异性PCR,可以使多个引物在一个反应体系中同时进行,通过电泳检测,即可完成多个鉴别位点的检测。目前,海龙、地龙、鹿茸等动物

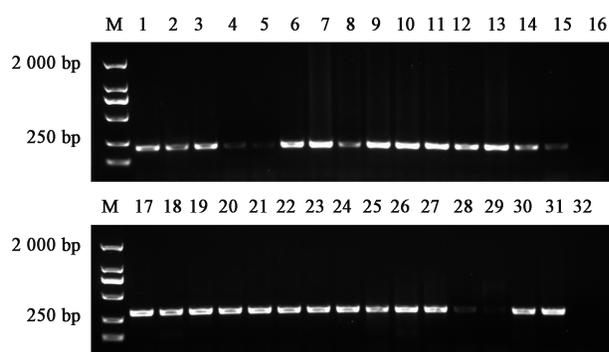


图7 地骨皮的多重位点特异性PCR鉴别

Fig. 7 Multiplex allele-specific PCR identification results of Lycii Cortex

类药材^[12-14]、石斛、人参、三七、西洋参、当归等植物类药材^[15-16,20]、金银花、牛膝及川牛膝、参环毛蚓等配方颗粒^[17-19]均可使用位点特异性PCR鉴定其基原或真伪。

CGIR基于人工审编整合的已公开发表的数据和自测数据,共11 946个物种(涉及573科,3 285属),保证了叶绿体基因组数据的数量和质量,使其成为最大的综合性叶绿体资料库^[26]。通过CGIR数据库开发的IdenDSS软件可快速得到正品基原物种的DSS分子标记。DSS作为一种DNA分子标记,通过判断存在/不存在多态性(PAV),可鉴定被检测样本是否有特定分类单元。作为一种新的DNA标记方法,DSS不依赖序列相似度,不仅兼具通用性和专属性,因其仅有40 bp大小,可有效应对因中药类型复杂、加工易导致DNA降解等导致难以鉴别的问题^[10]。截至目前,该技术在多基原药材(如九里香)^[21]、冷背药材(如木槿皮)^[22]、外来药材(如中亚苦蒿)^[23]、配方颗粒(如五倍子)^[24]、干浸膏粉(如紫河车)^[25]基原鉴定中应用,具有广泛前景和发展空间。

本文利用Idendss软件分析CGIR数据库中枸杞和宁夏枸杞的叶绿体基因组数据,通过对枸杞和宁夏枸杞的叶绿体基因组进行比对分析,筛选出SNP位点后进行PCR条件考察,结果显示枸杞和宁夏枸杞样本可获得183、295 bp的特异性条带。本文建立的地骨皮多重位点特异性PCR的鉴别方法,为枸杞和宁夏枸杞的基原鉴定提供新的技术手段,以保证用药安全。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] 国家卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:128.

[2] 李玉丽,蒋屏,杨恬,等. 地骨皮的本草考证[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(5):192-201.

[3] 徐国钧,徐珞珊,王峥涛. 常用中药材品种整理和质量研究[M]. 福州:福建科学技术出版社,1999:656-676.

[4] 赵佳琛,金艳,闫亚美,等. 经典名方中枸杞及地骨皮的本草考证[J]. 中国现代中药,2020,22(8):1269-1286.

[5] 李新蕊,司明东,温子帅,等. 地骨皮的基原产地变迁及采收加工的本草考证[J]. 中国现代中药,2020,22(6):948-954.

[6] 国家中医药管理局. 关于发布《古代经典名方目录(第一批)》的通知[EB/OL]. (2018-04-16)[2021-03-08]. <http://kjs.satcm.gov.cn/zhengcewenjian/2018-04-16/7107.html>.

[7] 陈倩倩,邹丽琴,郝丽霞,等. 47批次地骨皮药材的真伪鉴别及质量分析[J]. 北方药学,2019,16(8):11-12.

[8] 李宝鑫,郝丽霞,代云桃,等. 基于含量测定和指纹图谱的不同基原地骨皮药材异同点考察[J]. 中国实验方剂学杂志,2022,28(24):179-185.

[9] 陈万发,陈康梅,彭致铨,等. 地骨皮UPLC特征图谱的构建方法及地骨皮的检测方法:中国,CN111413423A[P]. 2020-07-14.

[10] HUA Z, JIANG C, SONG S, et al. Accurate identification of taxon-specific molecular markers in plants based on DNA signature sequence[J]. Mol Ecol Resour,2023,23(1):106-117.

[11] 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,2014:25.

[12] 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.

[13] 田娜,魏艺聪,袁媛,等. 地龙的多重位点特异性PCR鉴别[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(17):124-129.

[14] 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.

[15] 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]. 药学报,2017,52(6):998-1006.

[16] 蒋超,罗宇琴,袁媛,等. 多重位点特异性PCR鉴别人参、三七、西洋参参杂[J]. 中国中药杂志,2017,42(7):1319-1323.

[17] 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.

- [18] 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.
- [19] 胡力,赵玉洋,袁媛,等. 地龙(参环毛蚓)配方颗粒的位点特异性PCR鉴别[J]. 中国实验方剂学杂志,2022,28(17):119-126.
- [20] 史中飞,滕宝霞,倪琳,等. 位点特异性PCR鉴别当归药材及饮片中掺伪欧当归的方法研究[J]. 中药材,2021,44(7):1597-1602.
- [21] 陈梓媛,赵玉洋,谢旭桃,等. 多基原九里香药材的多重位点特异性PCR鉴别[J]. 中国实验方剂学杂志,2022,28(17):106-112.
- [22] 刘亚男,华中一,赵玉洋,等. 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[J]. 中国实验方剂学杂志,2022,28(17):133-139.
- [23] 刘志浩,陈梓媛,李晓琳,等. 蒿属外来药用资源中亚苦蒿的特异性PCR鉴别[J]. 中国实验方剂学杂志,2022,28(17):127-132.
- [24] 胡力,陈梓媛,赵玉洋,等. 五倍子配方颗粒的位点特异性PCR鉴别[J]. 中国现代中药,2023,doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20221116002.
- [25] 赵玉洋,秦雯,李源森芋,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.
- [26] HUA Z, TIAN D, JIANG C, et al. Towards comprehensive integration and curation of chloroplast genomes[J]. Plant Biotechnol J,2022,20(12):2239-2241.

[责任编辑 顾雪竹]