

• 药材与资源 •

基于 ITS2 条形码鉴别市售柴胡药材及其混伪品

王亚丹¹, 韩晓妮², 赵玉丹¹, 雷天莉¹, 韩 凌², 张跃飞², 路金才^{1*}

1. 沈阳药科大学中药学院, 辽宁 沈阳 110016

2. 国家中成药工程技术研究中心, 辽宁 本溪 117004

摘要: 目的 采用 DNA 条形码分子鉴定技术鉴别市售柴胡药材及其混伪品, 以确保柴胡药材质量及临床用药安全。方法 共收集 85 份柴胡药材, 对其 ITS2 序列进行 PCR 扩增并双向测序, 所得序列经 CodonCode Aligner 校对拼接后, 利用 MEGA 6.0 对序列进行分析比对, 计算种内、种间遗传距离, 利用邻接法 (NJ) 构建系统聚类树, 并应用 ITS2 数据库网站预测其 ITS2 二级结构。结果 柴胡种内遗传距离明显小于柴胡与其近缘物种种间遗传距离, 基于 ITS2 建立的 NJ 树和网站预测的 ITS2 二级结构, 均能将柴胡药材及其混伪品区分开。85 份样品中, 55 份符合《中国药典》2015 年版规定的柴胡正品来源, 正品率为 64.7%。结论 基于 ITS2 序列可以准确可靠地鉴别柴胡药材及其混伪品, 为确保临床用药安全提供新的技术手段。

关键词: 柴胡; ITS2; 混伪品; 物种鉴定; DNA 条形码

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)17-3590-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.17.022

Identification of commercial *Bupleuri Radix* and its adulterants based on ITS2 barcodeWANG Ya-dan¹, HAN Xiao-ni², ZHAO Yu-dan¹, LEI Tian-li¹, HAN Ling², ZHANG Yue-fei², LU Jin-cai¹

1. School of Traditional Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

2. National Engineering Research Center for the Pharmaceutics of Traditional Chinese Medicines, Benxi 117004, China

Abstract: Objective DNA barcoding technology, a molecular identification method, is applied to distinguishing *Bupleuri Radix* from its adulterants in order to ensure the quality and clinical curative effect. **Methods** In this study, the internal transcribed spacer 2 (ITS2) regions of 85 samples were amplified by PCR and sequenced bi-directionally. Obtained sequences were assembled using CodonCode Aligner. The genetic distances were computed by MEGA 6.0 in accordance with the kimura 2-parameter (K2P) model and the phylogenetic tree was constructed by Neighbor-joining (NJ) method. Moreover, the secondary structure of ITS2 was predicted using ITS2 database websites. **Results** The intra-specific genetic distances were smaller than inter-specific ones in ITS2 regions of *Bupleuri Radix*. NJ tree and secondary structure results could distinctly differentiate quality product and adulterants. Only 64.7% of the 85 samples were in accordance with the requirements of *Chinese Pharmacopoeia*. **Conclusion** ITS2 sequence can accurately and reliably identify the authenticity of *Bupleuri Radix* and could provide a new technique to ensure clinical safety of this traditional Chinese medicine.

Key words: *Bupleuri Radix*; ITS2; adulterants; species identification; DNA barcoding

柴胡原名茈胡, 始载于《神农本草经》, 列为上品^[1], 具有良好的药用价值和经济价值, 是我国传统中药材之一。《中国药典》2015 年版规定, 柴胡为伞形科植物柴胡 *Bupleurum chinense* DC. 或狭叶柴胡 *B. scorzonifolium* Willd. 的干燥根。按性状不

同, 分别习称“北柴胡”和“南柴胡”。柴胡有疏散退热、疏肝解郁、升举阳气之功效^[2]。现代药理研究证明, 柴胡具有抗炎、抗病毒、保肝利胆、防治癌症等作用, 以柴胡为主要原料的药品以多种剂型在临床应用^[3]。据统计, 柴胡属植物在我国共有 42

收稿日期: 2017-03-31

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81673548); 辽宁省重大科技攻关计划 (2013226050); 国家中医药管理局项目 (201407002)

作者简介: 王亚丹 (1992—), 女, 在读硕士, 研究方向为中药资源和中药分子鉴定。Tel: 18309873394 E-mail: wangyadan1005@126.com

*通信作者 路金才 (1971—), 男, 博士生导师, 教授, 研究方向为药用植物资源开发及创新药物研究。

Tel: (024)23986500 E-mail: jincailu@126.com

种、17 变种、7 变型，其中有 25 种、8 变种、3 变型在我国不同地区作为柴胡入药，有的地区甚至把 5、6 种柴胡属植物混在一起用，导致药材市场严重混乱^[4-5]。近年来柴胡市场需求量不断增大，而药用资源却逐年减少，利益驱使以假乱真、以次充好的现象不断出现，药材质量参差不齐，严重影响用药安全^[6]。市场上已出现苦参 *Sophora flavescens* Ait.、龙牙草 *Agrimonia pilosa* Ldb.、石竹 *Dianthus chinensis* L. 等伪品冒充柴胡药材^[7]，鉴别市场药材迫在眉睫。传统的鉴别方法主要从基原、性状、显微、理化等方面进行区分，对操作人员的专业知识要求较高，同时对准确鉴别药材饮片来源有一定局限性，因此选择一种科学的鉴定方法来快速准确地鉴别柴胡市场药材，对于安全合理用药具有重要意义。

DNA 条形码是利用基因组中一段公认标准的、相对较短的 DNA 片段来进行物种鉴定的分子诊断新技术，是传统形态鉴别方法的辅助手段和有效补充^[8]，可以实现对生物物种的准确、快速鉴别。Chen 等^[9-11]提出以 ITS2 作为鉴别植物的通用序列，并在多个科属中验证了其稳定性^[12-17]，2010 年国家药典委员会将中药材 DNA 条形码分

子鉴定指导原则纳入《中国药典》增补本。已有文献报道称 ITS 和 ITS2 片段适合于柴胡物种的鉴定，于俊林等^[18]应用 ITS2 条形码准确鉴定柴胡及大叶柴胡；Chao 等^[19]应用 ITS2、psbA-trnH、matK 和 rbcL 4 个条形码对柴胡属 19 个物种 51 个样品进行鉴定并验证条形码的适用性，结果表明以 ITS2 为核心、psbA-trnH 为补充序列具有较高的鉴别准确率，但 4 个片段均不能成功鉴别北柴胡和银州柴胡；袁伯川等^[20]利用 ITS 序列可快速准确地鉴定柴胡和银州柴胡。本实验选用 ITS2 片段，对从全国 19 个省市收集的 85 份市售柴胡药材进行真伪鉴别，为规范中药材市场以及保障柴胡的安全合理用药提供依据。

1 材料

本研究 85 份柴胡及其混伪品的样品分别购自全国 19 个省市中药材市场，全部为药材干根，于 20 ℃ 保存备用。样品经沈阳药科大学中药学院路金才教授鉴定，从外观性状上看，有部分样品不属于《中国药典》2015 年版规定的柴胡药材正品来源，遂用 DNA 条形码进行鉴定。标本凭证保存在沈阳药科大学中药学院，样品信息见表 1。

表 1 样品信息

Table 1 Information of samples

编号	来源	中文名	拉丁学名	GenBank 登录号	编号	来源	中文名	拉丁学名	GenBank 登录号
1	山东	柴胡	<i>Bupleurum chinense</i>	KY688379	19	山西	柴胡	<i>B. chinense</i>	KY688397
2	山东	柴胡	<i>B. chinense</i>	KY688380	20	福建	柴胡	<i>B. chinense</i>	KY688398
3	内蒙	柴胡	<i>B. chinense</i>	KY688381	21	河北	柴胡	<i>B. chinense</i>	KY688399
4	甘肃	柴胡	<i>B. chinense</i>	KY688382	22	河南	柴胡	<i>B. chinense</i>	KY688400
5	安徽	柴胡	<i>B. chinense</i>	KY688383	23	江苏	柴胡	<i>B. chinense</i>	KY688401
6	北京	柴胡	<i>B. chinense</i>	KY688384	24	江苏	柴胡	<i>B. chinense</i>	KY688402
7	山西	柴胡	<i>B. chinense</i>	KY688385	25	辽宁	柴胡	<i>B. chinense</i>	KY688403
8	山西	柴胡	<i>B. chinense</i>	KY688386	26	辽宁	柴胡	<i>B. chinense</i>	KY688404
9	山西	柴胡	<i>B. chinense</i>	KY688387	27	辽宁	柴胡	<i>B. chinense</i>	KY688405
10	陕西	柴胡	<i>B. chinense</i>	KY688388	28	上海	柴胡	<i>B. chinense</i>	KY688406
11	山西	柴胡	<i>B. chinense</i>	KY688389	29	陕西	柴胡	<i>B. chinense</i>	KY688407
12	甘肃	柴胡	<i>B. chinense</i>	KY688390	30	山西	柴胡	<i>B. chinense</i>	KY688408
13	陕西	柴胡	<i>B. chinense</i>	KY688391	31	山西	柴胡	<i>B. chinense</i>	KY688409
14	陕西	柴胡	<i>B. chinense</i>	KY688392	32	安徽	柴胡	<i>B. chinense</i>	KY688410
15	甘肃	柴胡	<i>B. chinense</i>	KY688393	33	陕西	柴胡	<i>B. chinense</i>	KY688411
16	陕西	柴胡	<i>B. chinense</i>	KY688394	34	山西	柴胡	<i>B. chinense</i>	KY688412
17	内蒙	柴胡	<i>B. chinense</i>	KY688395	35	河北	柴胡	<i>B. chinense</i>	KY688413
18	陕西	柴胡	<i>B. chinense</i>	KY688396	36	陕西	柴胡	<i>B. chinense</i>	KY688414

续表 1

编号	来源	中文名	拉丁学名	GenBank 登录号	编号	来源	中文名	拉丁学名	GenBank 登录号
37	甘肃	柴胡	<i>B. chinense</i>	KY688415	62	甘肃	柴首	<i>B. chaishou</i>	KY694428
38	河南	柴胡	<i>B. chinense</i>	KY688416	63	内蒙古	锥叶柴胡	<i>B. bicaule</i>	KY694429
39	江西	柴胡	<i>B. chinense</i>	KY688417	64	内蒙古	锥叶柴胡	<i>B. bicaule</i>	KY694430
40	辽宁	柴胡	<i>B. chinense</i>	KY688418	65	内蒙古	锥叶柴胡	<i>B. bicaule</i>	KY694431
41	山东	柴胡	<i>B. chinense</i>	KY688419	66	内蒙古	锥叶柴胡	<i>B. bicaule</i>	KY694432
42	陕西	柴胡	<i>B. chinense</i>	KY688420	67	吉林	锥叶柴胡	<i>B. bicaule</i>	KY694433
43	云南	柴胡	<i>B. chinense</i>	KY688421	68	黑龙江	锥叶柴胡	<i>B. bicaule</i>	KY694434
44	北京	柴胡	<i>B. chinense</i>	KY688422	69	内蒙古	狭叶柴胡	<i>B. scorzonrifolium</i>	KY694435
45	山西	柴胡	<i>B. chinense</i>	KY688423	70	陕西	当归	<i>Angelica sinensis</i>	KY694401
46	河北	柴胡	<i>B. chinense</i>	KY688424	71	甘肃	当归	<i>A. sinensis</i>	KY694402
47	天津	柴胡	<i>B. chinense</i>	KY688425	72	河南	当归	<i>A. sinensis</i>	KY694403
48	河北	柴胡	<i>B. chinense</i>	KY688426	73	河北	当归	<i>A. sinensis</i>	KY694404
49	河北	柴胡	<i>B. chinense</i>	KY688427	74	山西	当归	<i>A. sinensis</i>	KY694405
50	云南	柴胡	<i>B. chinense</i>	KY688428	75	山西	当归	<i>A. sinensis</i>	KY694406
51	河北	柴胡	<i>B. chinense</i>	KY688429	76	山西	当归	<i>A. sinensis</i>	KY694407
52	上海	柴胡	<i>B. chinense</i>	KY688430	77	安徽	田葛缕子	<i>Carum buriaticum</i>	KY694437
53	山西	柴胡	<i>B. chinense</i>	KY688431	78	安徽	田葛缕子	<i>C. buriaticum</i>	KY694438
54	天津	柴胡	<i>B. chinense</i>	KY688432	79	安徽	田葛缕子	<i>C. buriaticum</i>	KY694439
55	甘肃	黑柴胡	<i>B. smithii</i>	KY694421	80	河北	田葛缕子	<i>C. buriaticum</i>	KY694440
56	山西	黑柴胡	<i>B. smithii</i>	KY694422	81	黑龙江	田葛缕子	<i>C. buriaticum</i>	KY694441
57	陕西	黑柴胡	<i>B. smithii</i>	KY694423	82	吉林	田葛缕子	<i>C. buriaticum</i>	KY694442
58	广东	紫花鸭跖柴胡	<i>B. commelynoideum</i>	KY694424	83	吉林	田葛缕子	<i>C. buriaticum</i>	KY694443
59	山东	三岛柴胡	<i>B. falcatum</i>	KY694425	84	江苏	田葛缕子	<i>C. buriaticum</i>	KY694444
60	甘肃	柴首	<i>B. chaishou</i>	KY694426	85	内蒙古	田葛缕子	<i>C. buriaticum</i>	KY694445
61	河北	柴首	<i>B. chaishou</i>	KY694427					

2 方法

2.1 DNA 提取

用 75%乙醇擦拭药材表面,自然晾干。刮去外表皮,取药材约 40 mg,用 DNA 提取研磨仪(Retsch MM400,德国)研磨 2 min (1 800 r/min),利用植物基因组 DNA 提取试剂盒 plant genomic DNA kit (北京天根生化科技有限公司)提取样品总 DNA。

2.2 PCR 扩增和测序

PCR 扩增选用通用引物,ITS2F (5'-ATGCGATACTTGGTGAAT-3')、ITS3R (5'-GACCCTTCTCCAGACTACAAT-3')。PCR 扩增体系为 25 μ L,包含 2 $\times$ Taq PCR Master Mix (上海生工生物工程股份有限公司) 12.5 μ L, ddH₂O 8.5 μ L,正、反向引物各 1 μ L (2.5 μ mol/L,上海生工生物工程股份有限公司),基因组 DNA 2 μ L。PCR

扩增程序为 94 $^{\circ}$ C、5 min; 94 $^{\circ}$ C、30 s, 56 $^{\circ}$ C、30 s, 72 $^{\circ}$ C、45 s, 40 个循环; 72 $^{\circ}$ C、10 min。PCR 产物用 1%琼脂糖凝胶电泳检测结果,送往美吉生物医药科技有限公司进行双向测序。

2.3 数据处理

应用 CodonCode Aligner 对测序峰图进行校对拼接,去除引物及低质量区。基于隐马尔可夫模型的 HMMer 注释方法^[21],去除两端 5.8 S 和 28 S 区段即可获得 ITS2 间隔区序列。利用 MEGA (molecular evolutionary genetics analysis) 6.0 进行序列比对,计算 GC 量和种内、种间 Kimura 2-parameter (K2P) 遗传距离,利用邻接法 (neighbour-joining, NJ) 构建系统聚类树,同时以 bootstrap (自展支持率 1 000 次) 重复检验各分支的支持率。根据 ITS2 数据库网站预测其 ITS2 二级结构。

3 结果与分析

3.1 基于 ITS2 序列的物种鉴定结果

将注释得到的 85 条 ITS2 序列在中药材 DNA 条形码鉴别系统和 GenBank 数据库中进行相似性搜索 (BLAST) 鉴定, 结果表明 ITS2 序列能够准确鉴定柴胡及其混伪品, 54 条为柴胡, 1 条为狭叶柴胡, 6 条为锥叶柴胡, 3 条为黑柴胡, 3 条为柴首, 1 条为三岛柴胡, 1 条为紫花鸭跖柴胡; 16 条序列不属于柴胡属, 其中 7 条为当归, 9 条为田葛缕子。85 份样品中, 55 份药材符合《中国药典》2015 年版规定的柴胡正品来源, 正品率为 64.7%。将获得的 85 条 ITS2 序列提交至 GenBank 数据库并获得登录号, 见表 1。

3.2 柴胡及其混伪品的 ITS2 序列长度及变异位点分析

柴胡及其混伪品的 ITS2 序列特征见表 2, 其中柴胡的 54 条 ITS2 序列有 4 个变异位点, 共有 5 个 ($A_1 \sim A_5$) 单倍型 (表 3), 单倍型 A_1 包括 30 条序列, 单倍型 A_2 包括 1 条序列, 单倍型 A_3 包括 4 条序列, 单倍型 A_4 包括 18 条序列, 单倍型 A_5 包括 1 条序列。本研究得到的柴胡主要单倍型 A_1 及狭叶柴胡的一个单倍型均与陈士林主编的《中国药典中药材 DNA 条形码标准序列》^[22] 介绍的主导单倍型

表 2 柴胡及其混伪品的 ITS2 序列特征

Table 2 ITS2 sequence characteristics of *Bupleuri Radix* and its adulterants

基原物种	ITS2 长度/bp	平均 GC 量/%	种内变异位点
柴胡	233	58.2	4
狭叶柴胡	233	60.5	0
锥叶柴胡	233	59.0	0
黑柴胡	233	59.2	0
三岛柴胡	233	59.7	0
紫花鸭跖柴胡	233	58.4	0
柴首	229	60.0	0
当归	229	55.5	0
田葛缕子	223	58.4	2

表 3 柴胡 ITS2 序列种内变异位点信息

Table 3 Intraspecific variable sites in ITS2 sequences of *B. chinense*

变异位点/bp	A_1	A_2	A_3	A_4	A_5
33	A	*	*	*	G
63	A	T	*	*	*
183	C	*	G	*	*
228	G	*	*	A	A

*表示与单倍型 A_1 碱基相同

*represents the same base as haplotype A_1

完全一致。柴胡与其同属混伪品间的变异位点主要集中在第 9、108、141、143、162、193、195 位点, 与柴首的变异位点较多, 与田葛缕子、当归的序列几乎完全不同, 见图 1。

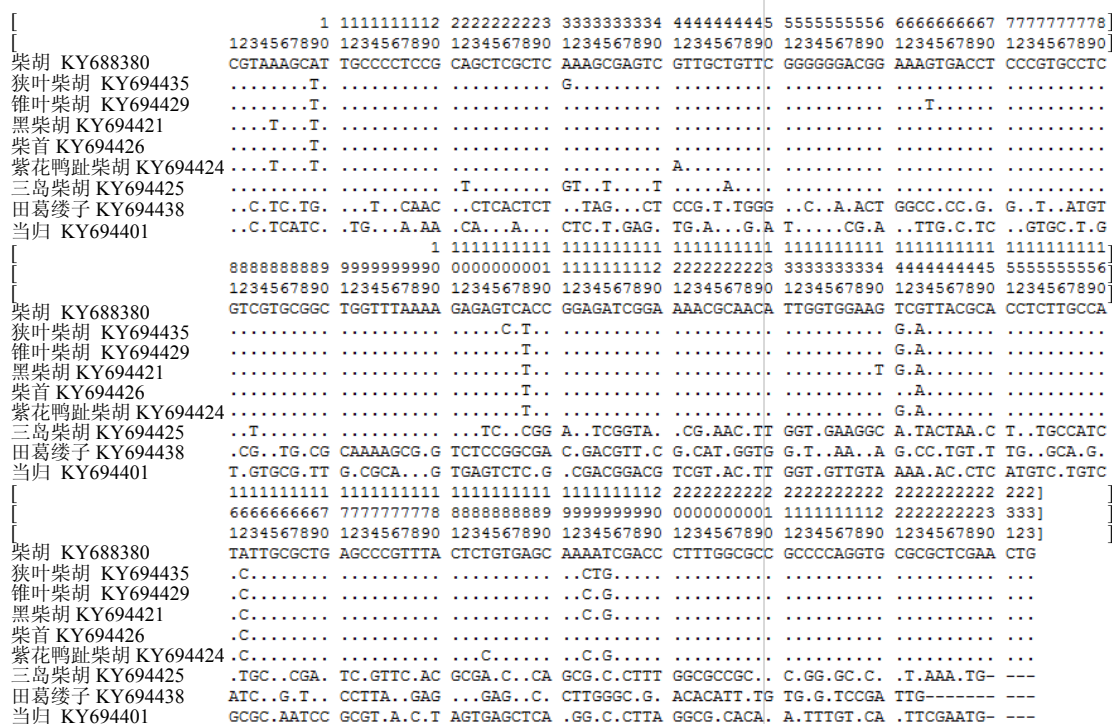


图 1 柴胡与其混伪品间 ITS2 序列比对

Fig. 1 Interspecific alignment of ITS2 sequences in *Bupleuri Radix* and its adulterants

3.3 柴胡药材种内、种间遗传距离及 NJ 树

柴胡种内平均 K2P 遗传距离为 0.001, 种内最大 K2P 遗传距离为 0.008 7; 柴胡属内种间平均 K2P 遗传距离为 0.018 7, 种间最小 K2P 遗传距离 0.018 2。柴胡种间最小遗传距离明显大于种内最大遗传距离。基于 ITS2 序列构建柴胡及其混伪品间的 NJ 系统聚类树 (图 2)。从聚类树上可以明显看出, 伪品田葛缕子、当归和柴胡属分别单独聚类, 说明它们与柴胡亲缘关系较远较易区分。柴胡属内 7 个物种又单独聚为 7 小支, 且各支支持率较高, 具有良好的单系性, 说明该方法同样适用于亲缘关系较近的柴胡属内各物种的鉴别。

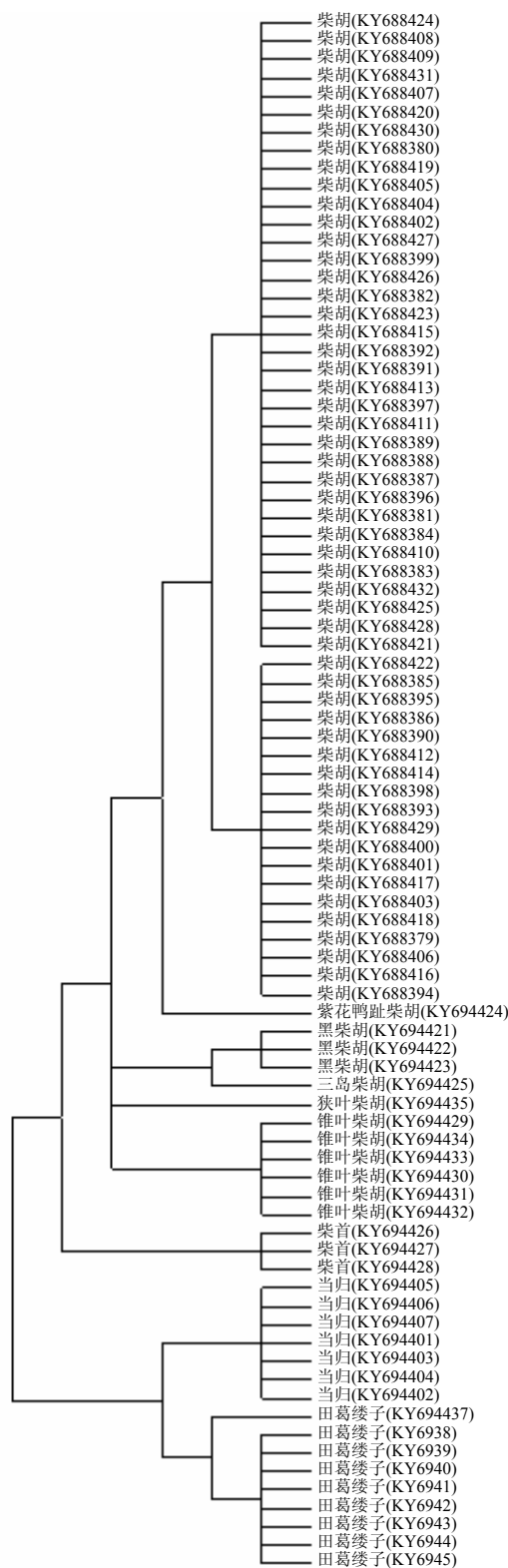
3.4 柴胡及其混伪品的 ITS2 二级结构比较

柴胡及其混伪品的 ITS2 序列二级结构 (图 3) 均由 1 个中心环 4 个螺旋区组成, 每个螺旋上又有大小不等、数目各异的茎环结构。其中柴胡中心环较大, 螺旋 II 区有 1 个环, IV 区有 2 个环, 能够区别于其他混伪品; 三岛柴胡的中心环比较复杂也容易区分。狭叶柴胡、锥叶柴胡、黑柴胡、柴首、紫花鸭趾柴胡的二级结构在螺旋 II、IV 区较为保守, 螺旋 I、III 区有差异。狭叶柴胡在 I 区有 4 个环, III 区有 7 个环; 锥叶柴胡在 I 区有 5 个环, III 区有 7 个环; 黑柴胡在 I 区有 3 个环, III 区有 8 个环; 柴首在 I 区有 5 个环, III 区有 7 个环; 紫花鸭趾柴胡在 I 区有 4 个环, III 区有 9 个环。锥叶柴胡和柴首在螺旋 I、III 区的茎环数目虽然相等, 但环的大小、环与环之间的距离都有差异。伪品田葛缕子、当归与柴胡的最大区别在于螺旋 II 区, 柴胡只有 1 个环, 田葛缕子、柴胡都有 2 个环。田葛缕子、当归和柴胡属其他物种的最大区别在于 III 区, 田葛缕子有 5 个环, 当归有 4 个环, 少于柴胡属其他物种在 III 区的茎环个数。可见, 通过 ITS2 序列的二级结构也能够准确地鉴别柴胡药材与其混伪品。

4 讨论

4.1 柴胡药材基因组 DNA 的提取

在整个实验过程中, 获得高质量的 DNA 是进行 DNA 条形码鉴定的必要前提, 柴胡药材为根部入药, 与土壤中真菌接触较多, 为避免污染、提高鉴别的准确性和稳定性, 实验前用 75%乙醇擦拭药材表面, 自然晾干, 去除外表皮。提取 DNA 时, 基原植物样本用量较少, 为 20 mg, 鉴于本研究选用的实验材料为市售药材, 一般为干根或经过简单加工处理的药材饮片, 为提高提取的 DNA 浓度,



Bootstrap 1 000 次重复, 支上数值仅显示自展支持率 $I > 50\%$
Bootstrap scores 1 000 replicates are shown ($> 50\%$) for each branch

图 2 基于 ITS2 序列构建的柴胡 NJ 树

Fig. 2 Phylogenetic tree of *Bupleuri Radix* and its adulterants constructed with ITS2 sequences using NJ method

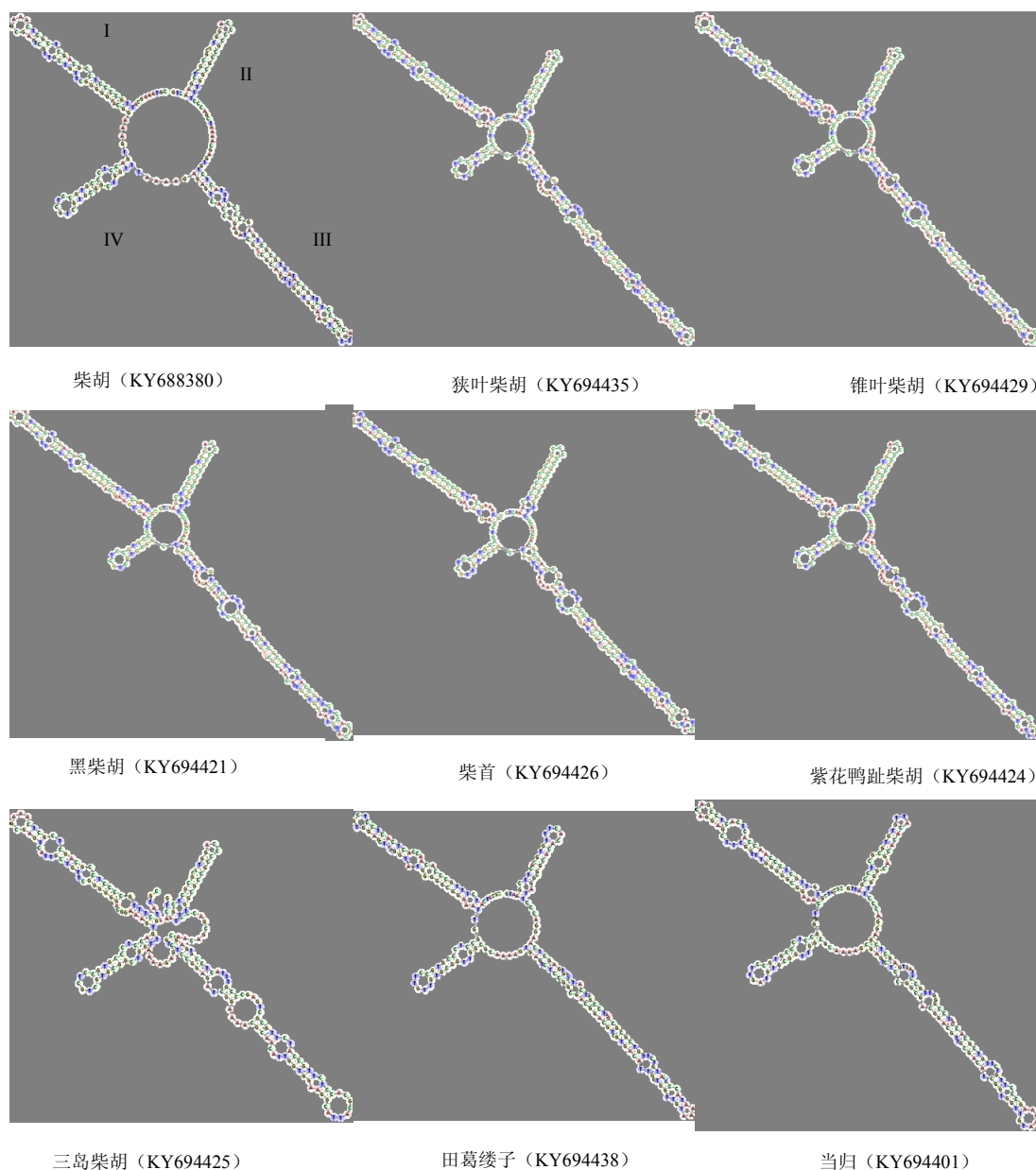


图 3 柴胡及其混伪品的 ITS2 二级结构

Fig. 3 Secondary structure of ITS2 in *Bupleuri Radix* and its adulterants

样品量增加至 40 mg。另外在 DNA 提取过程中，通过适当增加水浴时间，使细胞充分裂解，也可使提取的 DNA 达到较高浓度。

4.2 ITS2 序列鉴定柴胡药材及其混伪品的可行性

作为 DNA 条形码鉴别序列，首要标准就是要有足够的种间变异，可将不同物种区分开来，同时又要要有较小的种内差异，可将同一物种聚为同一类。本研究中，通过 ITS2 序列计算的柴胡与其混伪品间的种间最小遗传距离明显大于柴胡种内最大遗传距离，说明利用 ITS2 序列可以准确鉴别柴胡药材及其

混伪品。基于 ITS2 序列构建的 NJ 树，不同物种表现出良好的单系性，各支支持率较高，以及根据 ITS2 序列预测的二级结构，不同物种均有很大差别，而且本实验中收集的 85 份药材，均成功获得高质量 ITS2 序列，说明 ITS2 序列片段用于鉴别柴胡药材及其混伪品拥有良好的稳定性。

4.3 利用 DNA 条形码鉴别市售药材的意义

本研究 85 份样品中，55 份药材符合《中国药典》2015 年版规定的柴胡正品来源，正品率仅为 64.7%。鉴定的样品中除柴胡和狭叶柴胡外，还包

括柴胡属其他 5 个品种,说明柴胡中药材市场来源混乱,药材质量参差不齐,存在极大的用药安全隐患,鉴别市售药材具有非常显著的意义。药材中还掺杂了当归、田葛缕子等伪品,这些药材原植物与柴胡外观性状上虽有很大差别,但以根入药后就很难区分,药性也大不相同,在药材市场里混作柴胡,误用后将产生不良反应或者毒副作用,严重者可能危及生命安全。DNA 条形码技术具有快速、准确、微量、通用性强的特点,不受发育阶段、供试部位、环境条件的影响,可以鉴别药材外部形态不完整或已被加工成粉末、饮片的样品,弥补了传统鉴别方法在这方面的不足,在中药鉴定中展示了更加广阔的应用前景。随着中药现代化研究的不断发展,DNA 条形码分子鉴定技术将在中药材流通、市场监管方面得到推广应用,帮助临床安全合理用药。

参考文献

- [1] 孙启时. 辽宁道地药材 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2009.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [3] 张义玲, 冯成强, 孟繁蕴, 等. 药用柴胡属植物产地与化学成分相关性研究 [J]. 生命科学研究, 2006, 10(4): 86-89.
- [4] 梁镇标, 刘 力, 晁 志. 柴胡属植物资源及生产状况调查 [J]. 时珍国医国药, 2012, 23(8): 2011-2013.
- [5] 周 琳, 迟 营, 张丽华, 等. 柴胡与 4 种伪品的 DNA 指纹研究 [J]. 北华大学学报: 自然科学版, 2013, 14(1): 46-49.
- [6] Han J P, Pang X H, Liao B S, *et al.* An authenticity survey of herbal medicines from markets in China using DNA barcoding [J]. *Sci Rep*, 2015, doi:10.1038/srep18723.
- [7] 韩晓伟, 严玉平, 吴兰芳, 等. 柴胡及其伪品的 DNA 条形码鉴定研究 [J]. 中草药, 2016, 47(9): 1583-1588.
- [8] 陈士林. 中药 DNA 条形码分子鉴定 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012.
- [9] Chen S L, Yao H, Han J P, *et al.* Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species [J]. *PLoS One*, 2010, 5(1): e8613.
- [10] Chen S L, Pang X H, Song J Y, *et al.* A renaissance in herbal medicine identification from morphology to DNA [J]. *Biotechnol Adv*, 2014, 32: 1237-1244.
- [11] Yao H, Song J Y, Liu C, *et al.* Use of ITS2 region as the universal DNA barcode for plants and animals [J]. *PLoS One*, 2010, 5(10): e13102.
- [12] Feng S G, Jiang Y, Wang S, *et al.* Molecular identification of dendrobium species (Orchidaceae) based on the DNA barcode ITS2 region and its application for phylogenetic study [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, doi:10.3390/ijms160921975.
- [13] 陈贝贝, 宋经元, 姚 辉, 等. 基于 ITS2 条形码的两面针药材及其混伪品的鉴别 [J]. 中草药, 2013, 44(15): 2150-2153.
- [14] 李 栋, 徐腊红, 唐立波. ITS2 条形码序列对海南大戟科植物的鉴定 [J]. 中草药, 2016, 47(9): 1572-1576.
- [15] 辛天怡, 姚 辉, 罗 焜, 等. 羌活药材 ITS/ITS2 条形码鉴定及其稳定性与准确性研究 [J]. 药学学报, 2012, 47(8): 1098-1105.
- [16] 汤 欢, 向 丽, 赵 莎, 等. 应用 DNA 条形码 ITS2 序列对市售药材黄柏的鉴定研究 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2016, 18(2): 184-190.
- [17] 林 好, 钱洁颖, 李斯璐, 等. 基于 DNA 条形码 (ITS2) 的中药材防风与其混伪品的鉴定 [J]. 中国当代医药, 2016, 23(15): 4-7.
- [18] 于俊林, 赵 莎, 任明波, 等. 基于 ITS2 条形码鉴定柴胡与大叶柴胡 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(12): 2160-2163.
- [19] Chao Z, Zeng W P, Liao J, *et al.* DNA barcoding Chinese medicinal *Bupleurum* [J]. *Phytomedicine*, 2014, 18: 1767-1773.
- [20] 袁伯川, 马永生, 杨 瑞, 等. 北柴胡与银州柴胡的 ITS 条形码鉴定研究 [J]. 生物技术通讯, 2016, 27(1): 101-105.
- [21] Keller A, Schleicher T, Schultz J, *et al.* 5S-28S rRNA interaction and HMM-based ITS2 annotation [J]. *Gene*, 2009, 430(1/2): 50-57.
- [22] 陈士林. 中国药典中药材 DNA 条形码标准序列 [M]. 北京: 科学出版社, 2015.