

维药毛菊苣及其易混品菊苣的位点特异性 PCR 鉴别研究

程 波¹, 何 江¹, 郭文倩², 地力努尔·吐尔逊江¹, 杨伟俊¹

1. 新疆维吾尔自治区药物研究所 新疆维吾尔药重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830004

2. 新疆医科大学 药学院, 新疆 乌鲁木齐 830004

摘 要: **目的** 建立维吾尔药毛菊苣及其易混品菊苣的位点特异性 PCR 鉴别方法。**方法** 采集不同地理区域的毛菊苣及其易混品, 提取样品基因组总 DNA。通过对其叶绿体 *rbcl* 基因片段进行扩增、测序, 进行多重序列比对后根据其变异位点设计位点特异性鉴别引物, 对其反应条件进行优化, 确定检出限, 建立位点特异性 PCR 鉴别方法。**结果** 建立的位点特异性 PCR 鉴别体系优化结果为 30 μ L 反应体系包含 Taq 酶 0.25 U、10 $\times$ buffer 2.5 μ L、dNTP 2.0 μ L、正、反向引物各 0.5 μ L、总 DNA 2 μ L、ddH₂O 22.25 μ L。适宜的扩增条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 32 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。对 20 份毛菊苣与菊苣药材进行扩增, 其中毛菊苣能够扩增出约 230 bp 目的片段条带, 而菊苣样品则不能扩增出明显的目的条带。**结论** 建立并优化了毛菊苣及其易混品菊苣位点特异性 PCR 鉴别技术, 能够准确而可靠的达到 2 种药材的有效鉴别。

关键词: 毛菊苣; *rbcl* 基因; 位点特异性 PCR; 分子鉴定; 总 DNA

中图分类号: R286.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2018)18-4393-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.18.026

Identification of uighur medicine *Cichorium glandulosum* and its adulterants by Allele-Specific PCR

CHENG Bo¹, HE Jiang¹, GUO Wen-qian², Dilinuer-Tuerxun¹, YANG Wei-jun¹

1. Key Laboratory of Xinjiang Uighur Medicine, Xinjiang Institute of Materia Medica, Urumqi 830004, China

2. Xinjiang Medical University, Urumqi 830004, China

Abstract: Objective To establish molecular identification method of *Cichorium glandulosum* and its adulterants *Cichorium intybus* by Allele-Specific PCR. **Methods** The samples of *C. glandulosum* and *C. intybus* were collected in different geographical areas. The DNA was extracted, and *rbcl* gene segments were amplified and sequenced directionally. The multiple sequences were aligned by using Clustal W. Specific primers were designed and amplified according to its variable sites, and PCR reaction system was optimized to determine detection limits and establish Allele-Specific PCR identification method. **Results** According to Allele-Specific PCR system established in this study for *C. glandulosum*, the optimization results was a total of 30 μ L reaction system containing TaqDNA polymerase 0.25 μ L, 10 $\times$ buffer 2.5 μ L, dNTP 2.0 μ L, primer 0.5 μ L, template DNA 2 μ L, and ddH₂O 22.25 μ L. The most suitable PCR amplification procedure is one cycle of predegeneration at 94 $^{\circ}$ C for 3 min; 32 cycles of denaturing at 94 $^{\circ}$ C for 30 s, annealing at the primer temperature 55 $^{\circ}$ C for 30 s and extending at 72 $^{\circ}$ C for 1 min, and extending at 72 $^{\circ}$ C for 7min. Through the detection of 20 medicinal materials of *C. glandulosum* and *C. intybus*, the result showed that 230 bp amplified band of target fragment was identified for *C. glandulosum* but no amplified band was observed for its adulterants. **Conclusion** In this study, we established and optimized the Allele-Specific PCR identification technology of *C. glandulosum* and its adulterants *C. intybus*, which can accurately, reliably, and effectively identify these two medicinal materials.

Key words: *Cichorium glandulosum* Boiss. et Huet; *rbcl* gene; allele-specific PCR; molecular identification; total DNA

收稿日期: 2018-04-28

基金项目: 新疆维吾尔自治区卫生计生委青年医学科技人才项目 (WJWY-201842)

作者简介: 程 波, 硕士, 研究方向为植物功能基因组学及生药学。E-mail: chengbo0417@163.com

*通信作者 杨伟俊, 研究员, 博士, 研究方向为维吾尔药资源学研究。E-mail: wilfred3106@163.com

毛菊苣 *Cichorium glandulosum* Boiss. et Huet 为维吾尔族传统习用药材, 维吾尔语名称为卡斯纳 Ksina, 为菊科植物毛菊苣的干燥地上部分或根, 该品种被收录于《中国药典》2015 年版, 具有清肝利胆、健胃消食、利尿消肿的作用; 用于治疗湿热黄疸、胃痛食少、水肿尿少^[1]。在国内, 毛菊苣主要分布于新疆南疆的阿克苏, 和田、喀什等平原绿洲区域, 新疆各地均有栽培^[2]。国外, 高加索地区及土耳其均有分布^[3]。近年来发现, 维吾尔药毛菊苣具有非常好的保肝^[4-6]、调血脂^[7]、抗炎^[8]等作用。随着对毛菊苣的市场需求量不断地增加, 市场上毛菊苣与菊苣 *Cichorium intybus* L. 常常混淆使用, 在一定程度上影响了药用的安全有效性。由于两者在外观形态比较接近, 传统的物理化学方法很难将其准确地区分出来, 其检测方法也受到地理环境及人为因素的影响, 很难对其质量进行有效的控制。课题组前期采用三维红外光谱进行鉴别, 但方法较为繁琐费时^[9]。因此, 建立准确而可靠的鉴定方法显得尤为重要。位点特异性 PCR 技术可用于检测单个或多个位点的核苷酸变异, 主要是根据 Newton 等^[10]建立的扩增阻滞突变系统原理, 由于 DNA 聚合酶缺乏 3'-5' 外切酶活性, 引物与模板之间的碱基错配可以有效地抑制 PCR 反应, 因此不能有效地扩增目的基因。近年来, 该技术已成功用于石斛 *Dendrobium nobile* L.^[11]、浙贝母 *Fritillaria thunbergii* Miq.^[12]、黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge^[13]、白术 *Atractylodes macrocephala* Koidz^[14]等多种传统中药材的检测。在本研究中, 根据植物叶绿体 *rbcL* 基因序列, 设计一对位点特异性鉴定引物, 对毛菊苣及其易混品菊苣特异性位点进行 PCR 鉴别研究, 以期建立准确可靠的 DNA 分子检测方法, 为将来两者质量控制提供坚实的科研基础。

1 材料

新型植物基因组 DNA 提取试剂盒 (北京天根有限公司), Taq 酶 (2.5 U/μL)、dNTPs (2.5 mmol/L)、DL2000 DNA Marker 均购自 (北京天根有限公司), 琼脂糖 (GENE Biowest)、核酸染料 (Geneview)、液氮、无水乙醇均为分析纯。

DYY-6C 型电泳系统 (北京市六一仪器厂), Del DocTMXR+凝胶成像系统、C-1000TM 型 PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司), JM1000 型电子天平 (余姚纪铭称重校验设备有限公司), 5424 型低温冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司), UPC-I-10T 纯水仪

(优普公司), 微量移液器 (德国 Eppendorf 公司)。

选取样本分别于 2016—2017 年间在新疆乌鲁木齐、吉木萨尔、和田、喀什、昌吉等不同地理区域所采集, 其中毛菊苣 *C. glandulosum* Boiss. et Huet 19 份, 菊苣 *C. intybus* L. 19 份。样本鉴定由新疆药物研究所何江副研究员所鉴定, 凭证标本保存于新疆药物研究所维吾尔药重点实验室标本室, 见表 1。

表 1 样品信息

Table 1 Plant samples and medicinal materials

物种	编号	产地	数量
毛菊苣植物	MJJ-1	新疆乌鲁木齐	3
毛菊苣植物	MJJ-2	新疆和田	3
毛菊苣植物	MJJ-3	新疆喀什	3
菊苣植物	JJ-1	新疆乌鲁木齐	3
菊苣植物	JJ-2	新疆吉木萨尔	3
菊苣植物	JJ-3	新疆昌吉	3
毛菊苣药材	MJJ-4~7	新疆乌鲁木齐	4
毛菊苣药材	MJJ-8~10	新疆和田	3
毛菊苣药材	MJJ-11~13	新疆喀什	3
菊苣药材	JJ-4~7	新疆乌鲁木齐	4
菊苣药材	JJ-8~10	新疆吉木萨尔	3
菊苣药材	JJ-11~13	新疆昌吉	3

2 方法

2.1 样品基因组总 DNA 的提取

取适量的菊苣药材在液氮中迅速研磨成细粉, 使用植物基因组 DNA 提取试剂盒提取样品总 DNA, 具体步骤依据试剂盒提供的说明书进行, DNA 于 -20 °C 保存备用。

2.2 *rbcL* 基因核苷酸序列的扩增与测序

rbcL 基因核苷酸序列的扩增采用通用引物^[15]进行扩增, 正向引物 *rbcL*-1f: 5'-ATGTCACCACAA-ACAGAAAC-3', 反向引物 *rbcL*-724r: 5'-TCGCATGTACCTGCAGTAGC-3'。PCR 反应体积为 30 μL, 体系内含 Taq 酶 0.25 μL、10×buffer 2.5 μL、dNTP 2.0 μL、正反向引物各 0.5 μL、总 DNA 3 μL, ddH₂O 21.25 μL。PCR 反应条件为 95 °C、2 min; 94 °C、1 min, 55 °C、30 s, 72 °C、1 min, 34 个循环; 72 °C、7 min; 12 °C 结束。取 5 μL PCR 扩增产物, 通过 1% 的琼脂糖凝胶电泳, Geneview 核酸染料染色, 紫外凝胶成像系统进行观察, 成像。将有明显清晰的目的条带扩增产物送至深圳华大基因公司测序部进行测序, 采用正、反双向测序。

2.3 位点特异性 PCR 鉴别引物的设计

根据 *rbcL* 基因核苷酸序列测序结果将毛菊苣 (4 条) 与菊苣 (14 条, 源于 NCBI 12 条) 的核苷酸碱基序列进行多重序列同源对齐并辅以人工校对, 对差异变异位点进行分析, 找出具有稳定差异的变异位点进行筛选, 根据该变异位点采用 primer premier 5.0 设计位点特异性鉴别引物 F-*rbcL* 与 R-*rbcL*。

2.4 PCR 扩增及其反应体系优化

用设计的特异性鉴别引物 F-*rbcL* 和 R-*rbcL* 进行位点特异性 PCR 扩增, 反应体系为 30 μ L, 体系内含 Taq 酶 0.25 μ L、10 $\times$ buffer 2.5 μ L、dNTP 2.0 μ L、正反向引物各 0.5 μ L、总 DNA 2 μ L, ddH₂O 补足至 30 μ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C、4 min; 94 $^{\circ}$ C、30 s, 55 $^{\circ}$ C、30 s, 72 $^{\circ}$ C、1 min, 34 个循环; 72 $^{\circ}$ C、7 min; 12 $^{\circ}$ C 结束。取 5 μ L PCR 扩增产物, 通过 1% 的琼脂凝胶糖电泳, 染色, 凝胶紫外成像系统进行观察, 成像。PCR 反应体系及程序同上, 对其进行不同循环数 (26、29、32、35); 不同退火温度 (49、52、55、58 $^{\circ}$ C); 不同体积 dNTP (0.5、1.0、2.0 μ L); 不同 Taq DNA 聚合酶 (0.05、0.10、0.25 U), 不同引物体积 (0.10、0.25、0.50 μ L) 进行了考察, 以确定特异性引物在扩增目的基因片段的最优化条件。

2.5 检出限分析

将毛菊苣基因组总 DNA 进行 10 倍逐级梯度稀释, 依次分别为至 25、2.5 ng/ μ L, 250、25、2.5 pg/ μ L 等 6 个梯度质量浓度。以稀释的 DNA 为模板进行毛菊苣位点特异性 PCR 扩增, 以能扩出条带的最低浓度确定检出限。

2.6 毛菊苣和菊苣药材检测

利用以上得出的位点特异性鉴别引物最优化体系, 分别对来自于新疆不同地理区域的 20 份毛菊苣和菊苣药材进行检测, 验证该体系鉴别的准确性及其可靠性。

3 结果与分析

3.1 *rbcL* 基因核苷酸序列扩增

采用通用引物 *rbcL*-1f 和 *rbcL*-724r 对 *rbcL* 基因进行扩增, 结果见图 1。可以发现维吾尔药毛菊苣及其易混品菊苣 *rbcL* 基因得到了有效的扩增, 目的条带也较为清晰明亮, 其片段大小约 750 bp。

3.2 位点特异性鉴别引物设计

将获得的毛菊苣及其菊苣 *rbcL* 基因核苷酸序列, 用 DNAMAN 软件进行多重序列比对辅以人工

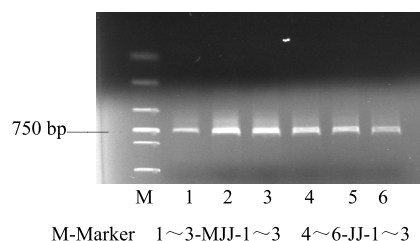


图 1 毛菊苣及其易混品凝胶电泳

Fig. 1 Amplification of *C. glandulosum* and its adulterants

校对, 筛选出维吾尔药毛菊苣及菊苣的特异性位点 (图 2)。从中可以发现在 *rbcL* 基因序列中, 有 2 个较为稳定的特异性 SNP 位点。毛菊苣 (MJJ-5) 所示序列的 5'端起第 460 位为 G, 而菊苣此位点所对应的基本上都为 A, 除了菊苣 (JQ230997.1) 为 G; 菊苣 (JQ230997.1) 在位点 636 为 T, 而其余毛菊苣与菊苣相应位点都为 C。因此, 根据毛菊苣 MJJ-5 位点 460 与菊苣 (JQ230997.1) 位点 636 采用 primer premier 5.0 软件设计位点特异性鉴别引物 F-*rbcL* 和 R-*rbcL*。引物序列为 F-*rbcL*: 5'-CACGGCATCCA-AGTTGAG-3'; R-*rbcL*: 5'-TAGCTTCGGCACA-AAATAAGAAACTG-3' (增加 PCR 反应特异性, 3' 端倒数第 2 位为人为引进的错配碱基), 引物由北京华大基因生物公司合成。

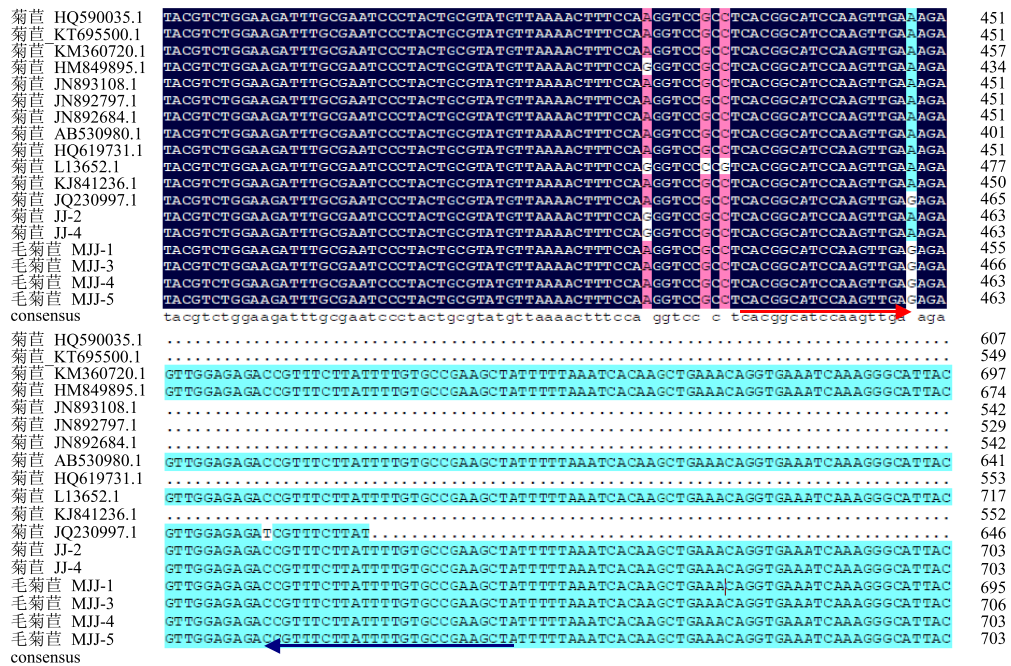
3.3 位点特异性 PCR 鉴别

采用通用引物 *rbcL*-1f、*rbcL*-724r 和鉴别引物 F-*rbcL* 和 R-*rbcL* 对药材叶绿体 *rbcL* 基因进行扩增 (图 3), 通用引物均能扩增出毛菊苣 MJJ-1~3 和菊苣 JJ-1~3 的目的片段, 条带也较为明亮、清晰。而鉴别引物只有毛菊苣 MJJ-1~3 能扩增出 230 bp 目的条带, 说明其具有一定的特异性, 可以用于毛菊苣及其混淆品菊苣的鉴别。

3.4 PCR 体系的优化

为建立准确可靠的维吾尔药毛菊苣及其易混品菊苣分子鉴别方法, 本研究对特异性位点鉴别引物 F-*rbcL* 和 R-*rbcL* 在 PCR 反应体系中进行了进一步的优化。对反应体系的循环数进行了优化分析, 从图 4 中可以看出, 循环数在 26、29、32、35 个循环时都可以有效地扩增出目的约 230 bp 条带, 而循环数在 32 个循环时, 扩增出的目的条带最为明亮, 所以选择 32 个循环为 PCR 体系的循环数。

对反应体系的退火温度 (T_m) 进行了优化分析, 从图中可以看出, T_m 在 49、52、55、58 $^{\circ}$ C 都可以有效地扩增出约 230 bp 目的条带, 通过对目的条带的质量进行分析, 退火温度在 55 $^{\circ}$ C 时, 目的条带

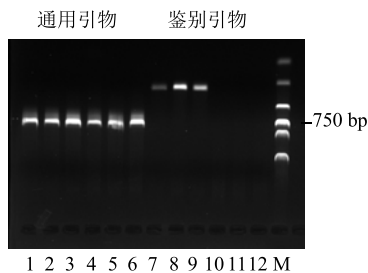


红色剪头为 F-rbcL, 蓝色箭头为 R-rbcL

The red head is F-rbcL and the blue arrow is R-rbcL

图 2 毛菊苣与菊苣基于 rbcL 多重序列比对

Fig. 2 Multiple sequence alignment of rbcL of *C. glandulosum* and *C. intybus*



M-Marker 1~3, 7~9-MJJ-1~3 4~6, 10~12-JJ-1~3

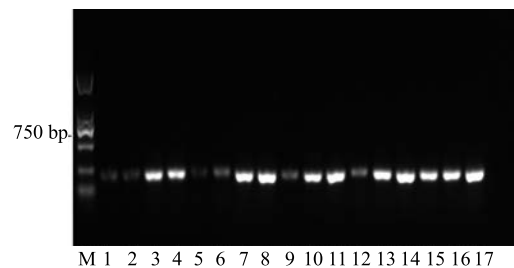
图 3 位点特异性 PCR 鉴别毛菊苣及其易混品凝胶电泳
Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of specific PCR amplification products amplified from *C. glandulosum* and its adulterants

质量最好, 所以选择退火温度 55 °C 为 PCR 体系的退火温度。

对反应体系的所加引物体积进行了优化分析, 从图中可以看出, 所加引物体积在 0.10、0.25、0.50 μL 时都可以有效地扩增出约 300 bp 目的条带, 而引物体积在 0.50 μL 时, 目的条带最为明亮, 所以选择引物体积为 0.50 μL 作为 PCR 体系的引物参数。

对反应体系的 dNTP 进行了优化分析, 从图 4 中可以看出, dNTP 在 0.5、1.0、2.0 μL 时都可以有效的扩增出约 230 bp 目的条带, 而 dNTP 为 2.0 μL

时, 目的条带最为明亮, 所以选择 dNTP 体积为 2.0 μL 时对反应体系的 Taq DNA 聚合酶优化分析, 从图 4 中可以看出, Taq 酶在 0.05、0.10、0.25 U 时都可以有效地扩增出约 230 bp 目的条带, 而 Taq DNA 聚合酶在 0.25 U 时, 目的条带最为明亮, 所以选择 Taq DNA 聚合酶为 0.25 U 作为 PCR 体系的



M-Marker 1~4 为不同循环数 26、29、32、35 5~8 为不同退火温度 49、52、55、58 °C 9~11 为不同体积 dNTP 0.5、1.0、2.0 μL 12~14-不同 Taq DNA 聚合酶 0.05、0.1、0.25 U 15~17-不同引物体积 0.1、0.25、0.5 μL

M-Marker 1—4 for different cycles 26, 29, 32, 35 5—8 for different annealing temperatures 49, 52, 55, 58 °C 9—11 for different volumes of dNTP 0.5, 1.0, 2.0 μL 12—14 for different Taq DNA polymerases 0.05, 0.1, 0.25 U 15—17 for different primer volumes 0.1, 0.25, 0.5 μL

图 4 PCR 体系的优化

Fig. 4 Optimization of PCR system

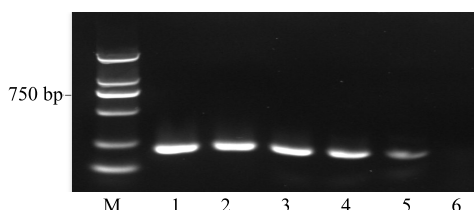
优化参数。最终,PCR 体系优化后,反应体系为 30 μL ,包含体系内含 Taq 酶 0.25 U、 $10\times$ buffer 2.5 μL 、dNTP 2.0 μL 、正反向引物各 0.5 μL 、总 DNA 2 μL 、ddH₂O 22.25 μL 。反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 、3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 32 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 、7 min; 12 $^{\circ}\text{C}$ 结束。

3.5 毛菊苣检出限分析

对不同质量浓度梯度稀释的毛菊苣模板 DNA 进行特异性 PCR 扩增,其扩增出的条带亮度随 DNA 模板浓度降低而减弱变暗,当 DNA 模板质量浓度在 2.5 pg/ μL 以下时,不能有效地扩增出特异性鉴别条带,说明毛菊苣位点特异性 PCR 鉴别最低检出限为 2.5 pg/ μL ,见图 5。

3.6 菊苣药材检测分析

根据最终得出 PCR 最优化体系,分别对 10 份维吾尔药材毛菊苣和易混品菊苣进行 PCR 鉴定,不加模板 DNA 的作为阴性对照。取 5 μL PCR 扩增产物,通过 1% 的琼脂糖凝胶电泳,染色,紫外凝胶成



M-Marker 1~6 分别 DNA 模板质量浓度为 25、2.5 ng/ μL 、250、25、2.5 pg/ μL 、空白对照 (ddH₂O)
M-Marker 1—6-DNA concentration 25, 2.5 ng/ μL , 250, 25, 2.5 pg/ μL , control (ddH₂O)

图 5 不同模板 DNA 浓度位点特异性 PCR 扩增

Fig. 5 Allele-specific PCR amplification of different DNA concentration

像系统进行观察,成像,结果见图 6。可以发现,位点特异性鉴别引物 F-rbcL 和 R-rbcL 可以准确地将毛菊苣药材进行有效的扩增,扩增目的条带约为 230 bp,而易混品菊苣及其对照则无明显条带出现。表明设计的特异性引物可以作为维吾尔药毛菊苣及其易混品菊苣的鉴别引物。

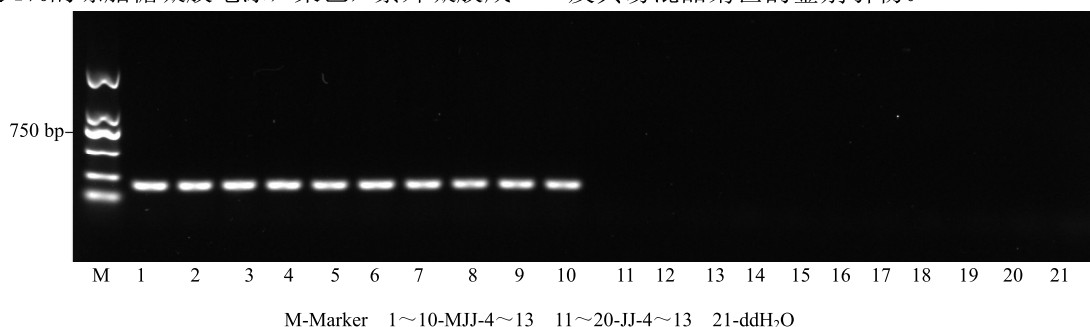


图 6 位点特异性 PCR 鉴别毛菊苣及其易混品凝胶电泳

Fig. 6 Agarose gel electrophoresis of specific PCR amplification products amplified from *C. glandulosum* and its adulterants

4 讨论

4.1 基于 rbcL 基因鉴定药材的原因

rbcL 是植物叶绿体基因,编码核酮糖-1,5-二磷酸羧化/加氧酶 (Rubisco, Rbc) 的大亚基。由于叶绿体是绿色植物体内特异的细胞器,在其植物进化及分子鉴定方面有独特的优势。近年来被广泛地应用于植物分子进化及系统发育分析,常作为植物候选 DNA 条形码之一^[16-17]。在前期研究中也发现,rbcL 基因相比 matk、ITS2、psbA 等相关条形码候选基因,更容易扩增出目的条带,而且无论是新鲜的植物个体,还是加工后的成品药材,成功率都非常高。这可能和菊苣药材中含有相关 rbcL 基因非常丰富有关。在前期研究中,课题组最早选取了 ITS 和 psbA-trnH 基因序列进行分析鉴定,但是通过实验以及 GenBank 中下载所有相关的序列,进行多重

序列比对之后,发现没有稳定的特异性位点进行进一步的研究,所以最终选择采用 rbcL 基因进行相关药材的鉴定。

4.2 特异性鉴定引物设计及其体系优化

经过对维吾尔药毛菊苣及菊苣进行了前期大量实验,结果表明,两者 rbcL 基因的变异位点相对稳定,从测序所获得基因序列中可以发现,在 rbcL 基因序列中,有 2 个较为稳定的特异性 SNP 位点。实验前期对 2 个特异性位点均进行了特异性引物设计,结果均成功的扩增出目的条带。对其进行不同循环数,不同退火温度,不同体积 dNTP,不同 taq DNA 聚合酶,不同引物体积进行了优化考察,以确定鉴定引物在扩增目的基因片段的最优化条件。PCR 体系优化后最终确定为,反应体系 30 μL ,包含 Taq 酶 0.25 U, $10\times$ buffer 2.5 μL 、dNTP 2.0 μL 、

正、反向引物各 0.5 μL 、总 DNA 2 μL ，ddH₂O 22.25 μL 。反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 、3 min；94 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s，55 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s，72 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min，31 个循环；72 $^{\circ}\text{C}$ 、7 min；12 $^{\circ}\text{C}$ 结束。而本实验选择以特异性鉴别引物 F-rbcL 和 R-rbcL 为 PCR 体系引物，来进一步进行分析说明，鉴定结果也较为理想。

4.3 药材准确性检测

利用优化后的 PCR 反应体系，使用位点特异性引物 F-rbcL 和 R-rbcL 进行专属性鉴别研究，分别对来自于新疆不同地理区域的 20 份菊苣药材进行鉴定，结果表明，维吾尔药材毛菊苣均能成功扩增出 230 bp 的特异性目的条带，而菊苣及其对照则不能成功扩增出目的条带，说明该检测方法具有良好的准确适用性，可以用于维吾尔药材毛菊苣真伪鉴别。

4.4 位点特异 PCR 在实践检测中的应用

中药分子生物学鉴别技术，已经在实践中得到了越来越多的应用，位点特异性 PCR 技术方法的建立，使得毛菊苣与菊苣药材真实性鉴别变得快捷，方便，省时省力，可作为现代中药材传统形态，理化性质鉴别的进一步补充，为毛菊苣药材的质量控制及其标准制定奠定基础。虽然实践中已经证明在 3' 末端引入人为错配碱基可以提高引物的特异性，但是与模板碱基错配的引物仍有较低的延伸效率，往往会有假阳性的出现，所以，在实际检测过程中，一定需要注意模板 DNA 的浓度对体系检测结果的影响。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 刘勇民. 维吾尔药志 (上册) [M]. 乌鲁木齐: 新疆科技卫生出版社, 1986.
- [3] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 (第 80 卷第 1 分册) [M]. 北京: 科学出版社, 1995.
- [4] 哈木拉提·哈斯木, 徐磊, 帕依曼·亥米提, 等. 毛菊苣根一种子不同配伍的乙醇提取物对小鼠肝损伤的保护作用 [J]. 西北药学杂志, 2015, 30(6): 705-709.
- [5] Xin X, Yang W, Yasen M, *et al.* The mechanism of hepatoprotective effect of sesquiterpene rich fraction from *Cichorium glandulosum* Boiss. et Huet on immune reaction-induced liver injury in mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 155(2): 1068-1075.
- [6] 杨建华, 李渊, 闫冬, 等. 维药毛菊苣对四氯化碳致小鼠肝损伤的保护作用 [J]. 时珍国医国药, 2012, 23(10): 2383-2386.
- [7] 王小芬, 张艳红, 黄燕娟, 等. 毛菊苣醇提取物对高脂血症性脂肪肝大鼠作用机制初探 [J]. 现代生物医学进展, 2014, 14(19): 3642-3645.
- [8] 杨巧丽, 王雪, 马雪萍, 等. 维药毛菊苣水提取物抗炎作用的实验研究 [J]. 中国医药导报, 2016, 13(24): 27-30.
- [9] 杨伟俊, 罗玉琴, 再娜布, 等. 毛菊苣与菊苣的红外光谱三级宏观指纹鉴定 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(11): 131-135.
- [10] Newton C R, Graham A, Heptinstall L E, *et al.* Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS) [J]. *Nucl Acids Res*, 1989, 17(7): 2503-2516.
- [11] 刘石泉, 李小军, 余庆波, 等. 霍山石斛及相似种的位点特异性 PCR 鉴别 [J]. 中草药, 2006, 37(1): 111-115.
- [12] 李敏, 黄龙妹, 赵欣, 等. 浙贝母特异性 PCR 鉴定方法研究 [J]. 中草药, 2014, 45(12): 1754-1757.
- [13] 龙平, 崔占虎, 李虔全, 等. 基于位点特异性 PCR 的黄芪与红芪鉴别方法研究 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(16): 2581-2585.
- [14] 曹亮, 蒋超, 彭华胜, 等. 白术、苍术种子位点特异性 PCR 鉴别方法研究 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(16): 2567-2570.
- [15] Chen S, Yao H, Han J, *et al.* Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species [J]. *PLoS One*, 2010, 5(1): e8613.
- [16] Schindel D E, Miller S E. DNA barcoding a useful tool for taxonomists [J]. *Nature*, 2005, 435(7038): 17.
- [17] Kress W J, Erickson D L. A two-locus global DNA barcode for land plants: The coding rbcL gene complements the non-coding trnH-psbA spacer region [J]. *PLoS One*, 2007, 2(6): e508.