

虎掌南星超快速 Real-time VPCR 闭管检测方法的建立及应用

陈 蓉¹, 余佳文², 徐瑞超², 唐 卓^{3*}

1. 成都中医药大学 民族医药学院, 四川 成都 611137

2. 太极集团重庆涪陵制药厂有限公司, 重庆 408000

3. 中国科学院成都生物研究所 天然产物中心, 四川 成都 610041

摘 要: 目的 建立虎掌南星 *Pinellia pedatisecta* 特异性 DNA 的闭管式超快速检测方法, 实现对虎掌南星样本的快速鉴别。方法 针对虎掌南星特异性的 DNA 序列设计其特异性的引物和 TaqMan 探针, 通过对扩增体系进行优化, 建立虎掌南星的超快速实时荧光 VPCR 扩增体系, 实现对虎掌南星特异性 DNA 的快速扩增和闭管式实时检测。同时对该方法的特异性、灵敏度和实用性进行考察。结果 可以在 24 min 内完成对虎掌南星特异性 DNA 的闭管快速扩增检测; 检测限低至 pg 级 DNA; 在同科属常见近缘品种中无交叉反应; 对采集的 7 批 56 个“半夏”样本进行分析, 检测出 2 个批次共 16 个样本为虎掌南星, 且该结果与测序结果 100% 符合。结论 所建方法可以作为虎掌南星的特异性检测方法, 具有灵敏、快速和不易污染等优点, 可以为虎掌南星和半夏药材的质量控制提供参考。

关键词: 虎掌南星; 半夏; 聚合酶链式反应; 快速鉴别; 特异性 DNA

中图分类号: R286 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)18-5722-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.18.027

Development and application of an ultra-fast closed-tube Real-time VPCR detection system for *Pinellia pedatisecta*

CHEN Rong¹, YU Jia-wen², XU Rui-chao², TANG Zhuo³

1. School of Ethnic Medicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

2. Taiji Group Chongqing Fuling Pharmaceutical Co., Ltd., Chongqing 408000, China

3. Natural Products Research Center, Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China

Abstract: Objective To develop an ultra-fast closed-tube detection system for *Pinellia pedatisecta* specific DNA to realize fast identification of *P. pedatisecta*. **Methods** Species-specific primer pairs and probe were designed based on the *P. pedatisecta* unique sequence. The Real-time VPCR system was established by optimization of the concentrations of primers, probe, temperature, etc. Characters of a detection method including specificity, sensitivity and generality were systematically studied. **Results** The amplification and detection process for *P. pedatisecta* specific DNA could be finished within 24 min. The developed method was also proved to be with high specificity without any cross reaction in related species. The detection limit was as low as picogram of DNA. A total of 56 samples from seven batches of *Pinelliae Rhizoma* were evaluated by the developed method. It turned out that 16 samples from two batches were identified as rhizoma from *P. pedatisecta*. And all these results were 100% consistent with the sequencing results. **Conclusion** The proposed method which is sensitive, rapid and pollution-resistant can be used as a specific identification method for *Pinelliae Pedatisectae Rhizoma*. It could also provide a reference for quality control of *Pinelliae Pedatisectae Rhizoma* and *Pinelliae Rhizoma*.

Key words: *Pinellia pedatisecta* Schott; *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit; polymerase chain reaction; fast identification; specific DNA

虎掌南星又名掌叶半夏, 是天南星科半夏属植物掌叶半夏 *Pinellia pedatisecta* Schott 的干燥块茎, 具有燥湿化痰、祛风止痉、散结消肿等功效^[1]。

虎掌南星目前为非药典品种, 但是被部分省地方标准收载品种^[2-3]。半夏是一味常用中药材, 具有燥湿化痰、降逆止呕、消痞散结的功效。《中国药典》2020

收稿日期: 2021-02-03

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81973434); 成都中医药大学杏林学者学科提升计划 (QNXZ2018043, 18TD0017); 四川高校科研新团队建设计划 (18TD0017)

作者简介: 陈 蓉 (1987—), 女, 博士, 讲师, 硕士生导师, 从事中药分析, 质量评价研究。Tel: 13551869482 E-mail: chenrong@cducm.edu.cn

*通信作者: 唐 卓, 男, 博士, 研究员, 博士生导师, 从事化学生物学研究。E-mail: tangzhuo@cib.ac.cn

年版规定半夏为天南星科植物半夏 *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit. 的干燥块茎。由于半夏的市场需求量较大, 价格高, 市场上半夏药材的掺伪现象比较常见, 其中最常见的伪品为虎掌南星^[4]。个小的虎掌南星与半夏在形态上极为相似, 经过加工炮制之后更加难以区分。所以建立虎掌南星特异性的鉴别方法对虎掌南星药材和半夏药材的质量评价以及 2 种药材的临床使用都具有十分重要的意义。

利用 DNA 分子鉴定技术可以实现对中药材及其成药当中原料药的真伪鉴定^[5-9], 从 2010 年至今, 历版《中国药典》先后收录了包括乌梢蛇^[10]、蕲蛇^[10]、霍山石斛^[11]、金钱白花蛇^[11]在内的多个中药材的聚合酶链式反应鉴别法。《中国药典》2020 年版还新增了《聚合酶链式反应 (PCR) 法》^[12]和《DNA 测序技术指导原则》^[12], 为 DNA 分子鉴定技术应用于中药材真伪鉴定的推广应用奠定了基础。实时荧光 PCR (Real-time PCR) 技术是在 PCR 扩增过程当中, 通过荧光信号, 对 PCR 过程进行实时监测的一种技术。该技术的整个过程不需要开盖, 在最大程度上避免了 PCR 扩增产物的污染, 同时由于该技术是一种实时监测技术, 相比于传统琼脂糖凝胶电泳的终点检测可以节约大量的人力成本和时间成本, 非常适用于大量样本的快速检测, 目前已经广泛应用于临床病原微生物^[13]、转基因产品^[14]、肉类产品^[15]的真伪鉴定等多个领域, 2019 年底爆发至今的新型冠状病毒的核酸检测也大都采用此法。

目前常规的 RT-PCR 操作采用 PCR 传统的三步法或两步法, 整个扩增检测时间约为 1 h, 本课题组在前期的研究中发现, PCR 过程中的变性、退火、延伸 3 个步骤不是一定要在传统的 3 个温度点且保持一定时间才能完成, 而是可以在一个动态的变温过程中实现, 即体系的温度只需要在 2 个温度点之间来回变化, 就可以实现核酸的快速扩增^[16]。由于该快速核酸扩增方法省略掉了在 3 个温度点的停留时间, 整个核酸扩增的时间将大幅度缩短, 同时由于该体系中温度对时间的曲线图会呈现多个重复的“V”字型, 因此将上述快速核酸扩增方法取名为“VPCR”。前期研究还证明了 VPCR 技术可以应用于实时荧光监测的聚合酶链式反应, 取名为“Real-time VPCR”。使用 Real-time VPCR 技术同样可以将核酸扩增检测的时间从 1 h 以上缩短至 20 min 左右。所以, 本实验采用 Real-time VPCR 技术, 建立了虎掌南星特异性的快速鉴别方法, 可以在 24 min 内完成扩增检测, 以期虎

掌南星以及半夏药材的质量控制提供参考。

1 材料和仪器

1.1 材料

特异性研究使用的虎掌南星 *P. pedatisecta*、半夏 *P. ternata*、水半夏 *Typhonium flagelliforme* (Lodd.) Blume 和天南星 *Arisaema erubescens* (Wall.) Schott 由太极集团提供, 经太极集团余佳文总工程师鉴定以及 ITS 序列测序鉴定无误; 用于盲测的 7 批药材采集自甘肃西和 (编号 1)、甘肃清水 (编号 2、3)、河北安国 (编号 4)、四川成都 (编号 5、6)、江西赣州 (编号 7), 每批 8 个样本 (a~h)。Easy Taq DNA 聚合酶 (货号 AP111)、Trans2K DNA Marker (货号 BM111-01)、dNTPs (货号 AD101-12) 均购自北京全式金生物技术有限公司; GELVIEW (货号 EP1501) 购于北京百泰克公司; 琼脂糖粉 (货号 TSJ001) 购于北京擎科新业生物技术有限公司; 引物 (HAP 纯化)、荧光探针 (HPLC 纯化) 均订自生工生物 (上海) 技术有限公司; 植物基因组 DNA 提取试剂盒 (货号 DE-06113) 购自成都福际生物技术有限公司; 基于拓扑异构酶的超快速克隆试剂盒 (货号 C601-01) 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

1.2 仪器

Thermo Shaker 恒温仪 (杭州博日公司); Legend Micro 21R 离心机 (美国 Thermo 公司); 荧光定量 PCR 仪 (Thermo Scientific PikoReal Real-Time PCR System); 电泳系统 (北京六一仪器厂); Typhoon FLA 7000 IP 琼脂糖凝胶成像系统 (GE 公司), ND5000 超微量紫外可见分光光度计 (百泰克公司)。

2 方法

2.1 DNA 提取

采取商品化的植物 DNA 提取试剂盒 (柱式) 对样本的 DNA 进行提取: 取样时采用一次性刀片切去样品表面部分, 刮取中间部分 5~10 mg 置于 1.5 mL 离心管中, 按照植物 DNA 提取试剂盒说明书操作步骤进行 DNA 提取。所提取的 DNA 经超微量紫外可见分光光度计测量纯度和浓度, 除特殊说明外, DNA 模板均稀释至 10 ng/μL 进行使用。

2.2 Real-time VPCR 扩增

以“2.1”项下制备的 DNA 作为模板, 采用虎掌南星特异性引物 HP1 (5'-GGGAGAC-TCTGACGATCGGC-3'), HRP1 (5'-CCACGCAG-GCCATCACTTGAT-3'), 以及 TaqMan 探针 HP (5'-FAM-CGTGGGCCGGCGGGACGAC-3'-BHQ1)

进行扩增和检测。反应体系: 10×Taq buffer 2.5 μL; EasyTaq 酶 2 个单位; 正反向引物各 0.6 μmol/L; TaqMan 探针 0.3 μmol/L, dNTPs 0.2 mmol/L; MgCl₂ 2 mmol/L; DNA 提取液 1 μL; 加灭菌水补足 20 μL。扩增程序为 95 °C 解链 30 s; 94 °C 变性 0 s, 60 °C 0 s, FAM 通道荧光采集, 循环 40 次。

2.3 ITS 序列扩增与测序

以“2.1”项下制备的 DNA 作为模板, 采用 ITS 通用引物 ITS 5a fwd (5'-CCTTATCATTTAG-AGGAAGGAG-3'), ITS 4 rev (5'-TCCTCCG-CTTATTGATATGC-3') 进行扩增和检测。反应体系为: 10×Taq buffer 2.5 μL; EasyTaq 酶 2 个单位; 正反向引物各 0.1 mmol/L; dNTPs 0.2 mmol/L; DNA 提取液 1 μL; 加灭菌水补足 20 μL。扩增程序为 95 °C 解链 30 s; 94 °C 变性 5 s, 50 °C 5 s, 72 °C 30 s, 循环 35 次。扩增产物送至生物公司采用上述通用引物进行双向测序。

2.4 琼脂糖凝胶电泳

PCR 或者 Real-time VPCR 扩增结束后, 取扩增产物 5 μL 与 1 μL 上样缓冲液进行混合, 将混合液加至经 GELVIEW 染色的琼脂糖凝胶进行电泳分离, 分离电压 150 V, 电泳时间 10 min; 电泳结束后, 将该凝胶置于琼脂糖凝胶成像系统进行观察并拍照。

2.5 Real-time VPCR 扩增产物的测序和比对分析

利用“基于拓扑异构酶的超快速克隆试剂盒”, 按照试剂盒操作说明: 将 Real-time VPCR 扩增产物连接至载体, 并将该载体转化至感受态细胞, 再将感受态细胞进行放大培养后涂板, 待肉眼可见克隆长出时, 挑取单克隆交由生物公司采用 M13 通用引物 M13F (5'-TGTAACGACGGCCAGT-3') 进行测序。所测得序列在 Genbank BLAST ([https://blast.](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)

[ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)) 网站进行比对分析。

2.6 真实样本测序鉴定

真实样本检测中, 将在 Real-time VPCR 快速扩增体系中显示阳性结果的扩增产物送至生物公司, 利用虎掌南星特异性引物 HP1 (5'-GGGAGACT-CCTGACGATCGGC-3') 直接进行测序, 测序序列在 Genbank BLAST 网站进行比对分析, 测序结果与数据库中虎掌南星序列 (AF469040.1) 一致者判断为虎掌南星样本; 对于在 Real-time VPCR 快速扩增体系中显示阴性结果的样本, 取其 DNA 提取液, 按照已报道文献所述方法^[17]进行扩增, 扩增结束后将扩增产物送至生物公司, 利用文中所报道半夏特异性引物 BP3 (5'-GGGAGACTCCCGACGATCG-CA-3') 直接进行测序, 测序序列在 Genbank BLAST 网站进行比对分析, 测序结果与数据库中半夏序列 (AF469036.1) 一致者判断为半夏样本。

3 结果与分析

3.1 序列分析以及引物和探针的设计

通过对 ITS 序列部分进行扩增和测序的方式得到虎掌南星、半夏、天南星以及水半夏的 ITS 序列, 并将所获得的序列与 Genbank 中已知序列相对比, 发现所测得序列与 Genbank 中所登记序列一致 (虎掌南星序列登记号为 AF469040.1, 半夏序列登记号为 AF469036.1, 水半夏序列登记号为 AM777883.1, 天南星序列登记号为 JF975897.1。)采用序列比对软件将四者的序列进行比对, 比对结果发现虎掌南星与天南星和水半夏的序列差异较大, 相似度约为 78%; 虎掌南星与半夏由于属于同科同属植物, 序列相似性高达 92%。根据前期的研究经验以及引物和 TaqMan 探针设计原则, 将差异碱基放至引物和探针的 3' 端, 设计出核酸扩增所需要的引物和探针 (图 1)。

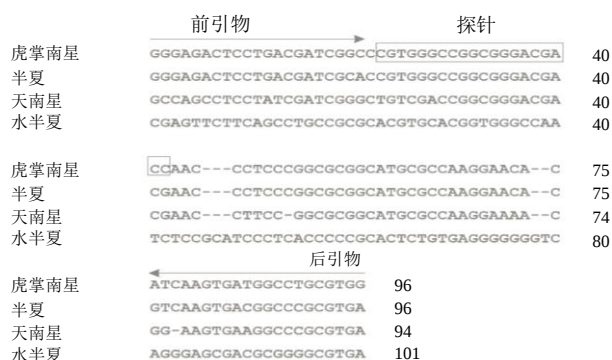


图 1 虎掌南星及其近缘品种 ITS 序列分析

Fig. 1 Sequence alignments of ITS (partial sequence) from *P. pedatisecta* and its closely related species

3.2 Real-time VPCR 体系的建立和优化

按照 Real-time VPCR 的操作^[19], 分别对引物浓度和探针浓度进行了优化, 如图 2-A 所示, 引物浓度在 0.2~0.6 $\mu\text{mol/L}$, 随着引物浓度增加, C_t 值从 26.12 降至 20.99, 但是当引物浓度从 0.6 $\mu\text{mol/L}$ 升至 1 $\mu\text{mol/L}$ 的过程中, C_t 值变化不大, 同时由于过高的引物浓度可能导致非特异性扩增的产生, 故将引物浓度设定为 0.6 $\mu\text{mol/L}$ 。在探针浓度方面, 如图 2-B 所示,

当探针浓度从 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 升至 0.3 $\mu\text{mol/L}$ 的过程中, C_t 值从 21.66 降低至 20.85, 但是当探针浓度从 0.3 $\mu\text{mol/L}$ 升至 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 的过程中, C_t 值变化不大, 所以将探针浓度设定为 0.3 $\mu\text{mol/L}$ 。所以最终确定在 20 μL 的反应体系中, 优化后引物浓度为 0.6 $\mu\text{mol/L}$; 探针浓度为 0.3 $\mu\text{mol/L}$, 反应程序为 95 $^{\circ}\text{C}$ 解链 30 s; 94 $^{\circ}\text{C}$ 、0 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 、0 s, FAM 通道荧光采集, 循环 40 次。总反应时间为 24 min。

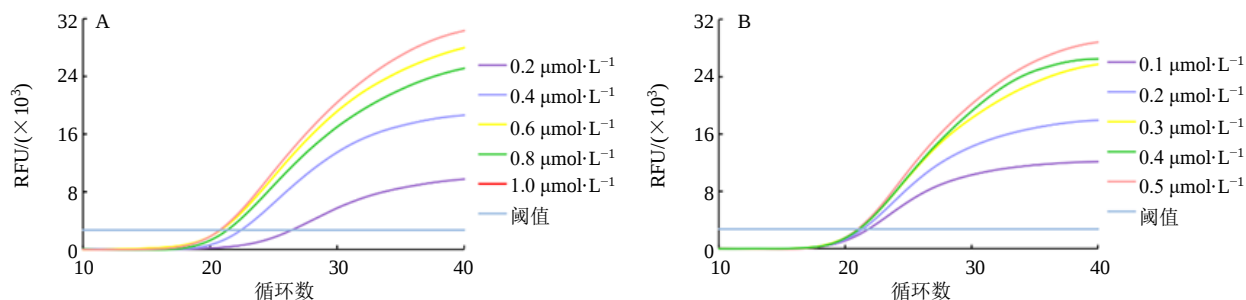


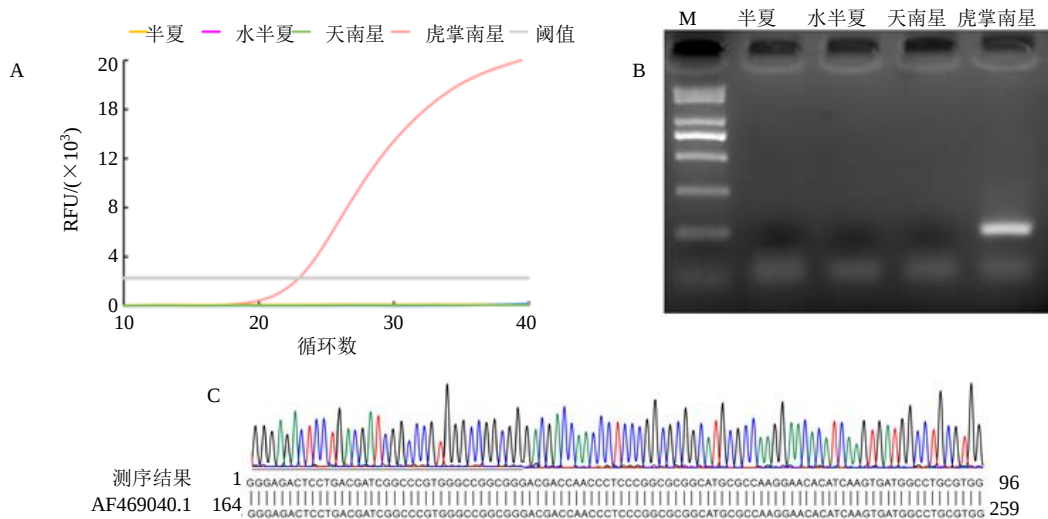
图 2 引物 (A) 和探针 (B) 浓度优化

Fig. 2 Optimization of primers (A) and probes concentration (B)

3.3 虎掌南星 Real-time VPCR 体系特异性和准确性考察

利用虎掌南星 Real-time VPCR 检测体系对虎掌南星、半夏、水半夏以及天南星的基因组 DNA 进行扩增和检测, 从而考察所建立体系的特异性, 荧光扩增结果如图 3-A 所示, 仅虎掌南星样本显示有明显的扩增曲线, C_t 值在 20 个循环左右, 而其他 3 个品种在 40 个循环以内均无明显扩增, 将该扩

增产物取出经琼脂糖凝胶电泳检测, 电泳检测结果与荧光 PCR 结果一致: 仅虎掌南星样本中有特异性的目的 DNA 条带产生, 在其他样品中均没有特异性扩增条带产生 (图 3-B)。上述结果表明该方法具有良好的特异性。将该扩增产物制作成单克隆后送测序公司测序, 测序结果显示该序列与 Genbank 中虎掌南星序列 (AF469040.1) 百分之百一致; 表示该方法具有高度的准确性 (图 3-C)。



A-虎掌南星及其近缘品种荧光扩增曲线图 B-虎掌南星及其近缘品种扩增电泳图 C-虎掌南星扩增产物测序图 M-Marker
A-Fluorescence amplification plot of *P. pedatisecta* and its closely related species B-Agarose gel analysis of Real-time VPCR with *P. pedatisecta* and its closely related species C-Sequencing and alignment results of *P. pedatisecta* Real-time-VPCR products M-Marker

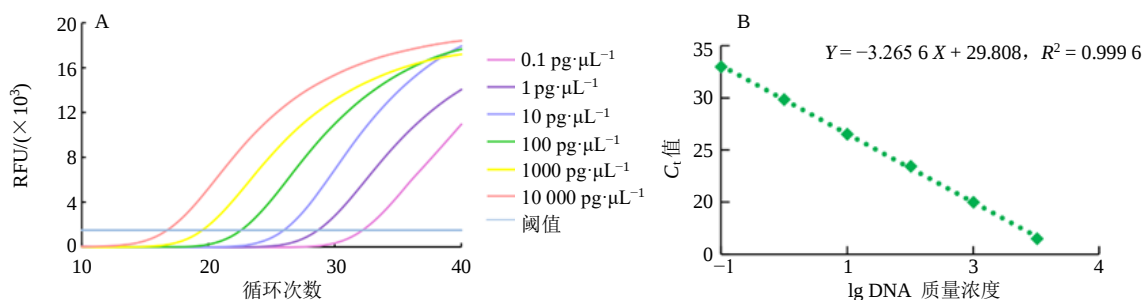
图 3 特异性和准确性考察结果

Fig. 3 Specificity and accuracy studies

3.4 虎掌南星 Real-time VPCR 体系灵敏度考察

利用虎掌南星的引物和探针分别对质量浓度为 $0.1 \sim 1 \times 10^4 \text{ pg}/\mu\text{L}$ 的虎掌南星基因组 DNA 进行实时荧光 VPCR 扩增检测, 荧光扩增曲线和标准曲线见图 4。由试验结果可知(图 4-A), 当待检测模板浓度在 $0.1 \text{ pg}/\mu\text{L}$ 时, 在荧光扩增曲线上就可以看到明显的扩

增曲线, 说明该体系可以检测到低至 $0.1 \text{ pg}/\mu\text{L}$ 的 DNA 模板。与此同时, 从标准曲线中还可以看出(图 4-B), 当待检测模板质量浓度在 $0.1 \sim 10 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 内, C_t 值与 DNA 浓度的 $\lg$ 值之间的相关系数(R^2)为 0.999 6, 表明二者之间存在良好的线性关系, 说明该体系条件良好, 适合实时荧光 PCR 的扩增分析。



A-梯度稀释的虎掌半夏 DNA 扩增曲线 B-标准曲线

A-Fluorescence amplification plot generated by serially diluted *P. pedatisecta* DNA extracts B-Calibration curve generated by serially diluted *P. pedatisecta* DNA extracts

图 4 灵敏度研究

Fig. 4 Sensitivity analysis

3.5 真实样本检测结果

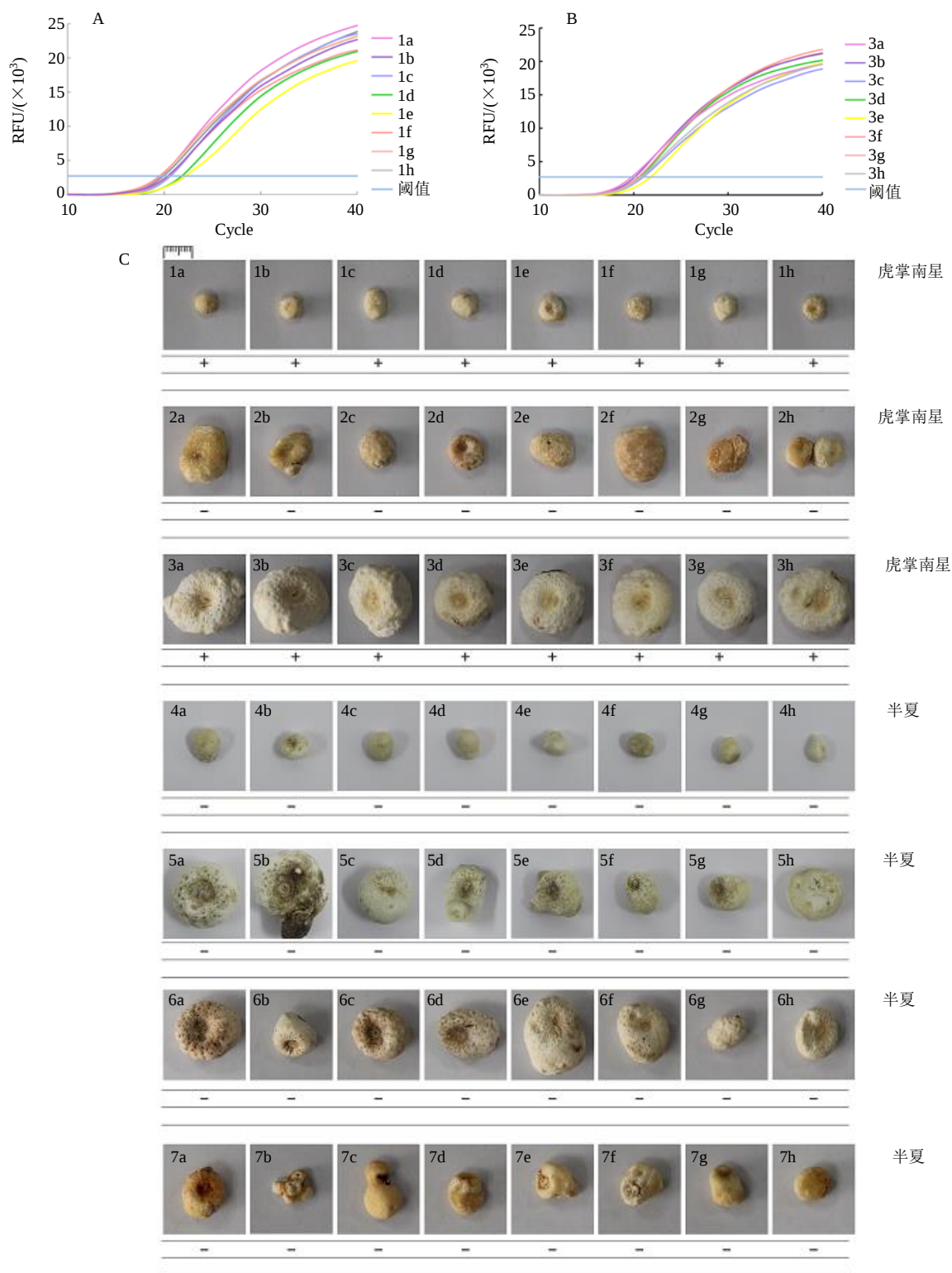
如前所述, 由于虎掌南星常被当做半夏使用, 本课题组尝试利用上述虎掌南星 Real-time VPCR 快速扩增体系对课题组所采购的“半夏”药材进行检测。首先利用“2.2”项中所述的 DNA 提取方法对所购 7 个批次共 56 个样本的 DNA 进行提取, 并对所提取的 DNA 质量进行分析和控制; 再利用 Real-time VPCR 扩增方法对上述 DNA 进行扩增和检测。检测结果显示, 第 1 批次和第 3 批次共 16 个样本在虎掌南星的快速鉴别体系中产生了典型的扩增曲线, 且 C_t 值均在 20 左右(图 5-A、B), 提示上述 16 个样本为虎掌南星而非半夏, 扩增产物经测序进一步验证无误, 确定为虎掌南星品种; 其余 40 个样本无明显扩增曲线, 通过 DNA 测序确定为半夏正品(图 5-C)。因此, 通过以上结果证明所建立的虎掌南星快速检测方法具有高度的准确性和实用性。

4 讨论

从药材图片可以看出, 半夏药材大小不一, 形态各异, 由于栽培变种等原因, 半夏与虎掌南星在形态学上的差异已经变得比较模糊, 而从 DNA 分子水平可以有效的对药材的真伪进行准确的鉴定。中药材的真伪鉴定除了正品的鉴定, 也包括伪品的识别, 前期已有文献报道了半夏药材的真伪鉴定方法^[20], 本实验报道了虎掌南星的快速鉴别法, 二者

联用可以互为补充, 全面的实现半夏药材以及虎掌南星药材的质量评价。另一方面, 中药的质量控制除了定性鉴别还包括定量分析, 大量研究证明以 DNA 为基础的分子鉴定方法可以有效的应用于中药材的定性鉴别; 在定量分析上, 由于 DNA 含量受采收时间、药材储存时间等因素影响较大, 利用药材 DNA 含量来对药材重质量进行定量分析的研究较少, 但是根据本研究结果, 如要实现定量分析, 可以对一批药材采取抽样分析, 如抽取一定量数目的单个药材, 并对每一颗药材都进行鉴别, 最后进行统计学计算, 得出本批药材的定量分析结果。如要实现对大量样本的真伪鉴定, 这就要求该检测方法能够快速、便捷、高通量地处理大量样本。

Real-time PCR 法由于其具有闭管、实时监测、可以有效降低污染等优点, 目前在临床病原微生物的检测方面应用较为广泛, 但在中药材的真伪鉴定领域报道较少, 本实验在 Real-time PCR 法的基础上, 建立了更加快速的 Real-time VPCR 检测方法, 使得该技术的应用变得更加简单和快捷, 目前实现了在 24 min 之内完成对虎掌南星特异性 DNA 的快速扩增和实时检测, 避免了开盖检测和容易污染等问题, 方法本身在高效快速的基础上还兼具有灵敏、特异和准确等优点, 对 7 个批次 56 个盲测样本的准确鉴定也证明了方法的准确性和实用性。随着新型



A-第 1 批样本荧光扩增曲线图 B-第 3 批样本荧光扩增曲线图 C-所有药材照片和 RealtimeVPCR 检测结果 “+”表示有典型的扩增曲线,且 C_t 值小于 35 “-”表示无典型的扩增曲线,且 C_t 值大于 35 或无 C_t 值

A-fluorescence amplification plot generated by the first batch of samples B-fluorescence amplification plot generated by the third batch of samples C-sample photos and analysis results of the 56 samples

图 5 样本照片和检测结果
Fig. 5 Sample photos and analysis results

冠状病毒疫情的爆发, 各类新型核酸检测仪器和核酸扩增技术迅速发展, 推动着整个核酸检测技术朝着更高通量、更加快速的方向前进。核酸检测主要包括核酸提取、核酸扩增和扩增产物的检测 3 个步骤, 本实验应用快速核酸扩增技术解决了虎掌南星药材核酸的快速扩增和扩增产物检测的问题, 在今后的应用中, 如果可以结合 DNA 自动提取工作站, 就可以实现虎掌南星药材的自动化、高通量、快速检测, 有效解决中药基因检测实际应用过程中的科学问题、推动中药基因检测技术在中药质量控制上的实际应用。同时, 本实验所用的方法也可以推广到其他中药品种, 为其他中药的质量评价提供新的选择和参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 曹淼淼, 朱建光, 张振凌, 等. 虎掌南星生品及不同炮制品指纹图谱和 5 种核苷类成分含量的比较研究 [J]. 中国药房, 2020, 31(13): 1601-1607.
- [2] 江苏省中药材标准 [S]. 2016: 243-248.
- [3] 聂黎行, 康帅, 张南平, 等. 高分离度快速液相色谱-三重串联四极杆质谱快速检查半夏和虎掌南星中水麦冬酸 [J]. 药物评价研究, 2018, 41(9): 1640-1643.
- [4] 敬勇, 陈辉, 刘佳灵, 等. 市售半夏药材中掺伪虎掌南星的鉴别研究 [A] // 中国商品学会第五届全国中药商品学术大会论文集 [C]. 哈尔滨: 中国商品学会第五届全国中药商品学术大会, 2017: 232.
- [5] 陈康, 蒋超, 袁媛, 等. 快速 PCR 方法在蛇类药材真伪鉴别中的应用 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(19): 3673-3677.
- [6] 田荣, 吴云, 谷巍, 等. 基于 ITS2 序列的海桐皮及其混伪品 DNA 分子鉴定 [J]. 中草药, 2021, 52(1): 211-218.
- [7] 王艳双, 姜海瀛, 刘美琳, 等. 中药材鹿心分子鉴定方法及检测试剂的研究 [J]. 中草药, 2021, 52(2): 544-551.
- [8] 夏召弟, 刘霞, 冯玛莉, 等. 基于 ITS2 条形码鉴定藏柴胡及其易混品 [J]. 中草药, 2020, 51(23): 6062-6069.
- [9] Su Y Y, Ding D D, Yao M J, et al. Specific DNA mini-barcoding for identification of Gekko gekko and its products [J]. *Chinese Medicine*, 2020, 15(1): 236.
- [10] 中国药典 [S]. 一部. 2010: 72, 349.
- [11] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 95, 229.
- [12] 中国药典 [S]. 四部. 2020: 153, 492.
- [13] Manzulli V, Scioscia G, Giganti G, et al. Real time PCR and culture-based virus isolation test in clinically recovered patients: Is the subject still infectious for SARS-CoV2? [J]. *J Clin Med*, 2021, 10(2): 309.
- [14] Wang X F, Tang T, Miao Q M, et al. Detection of transgenic rice line TT51-1 in processed foods using conventional PCR, real-time PCR, and droplet digital PCR [J]. *Food Control*, 2019, 98: 380-388.
- [15] Zhu T Y, Zhou X F, Zhang W, et al. Multiplex and real-time PCR for qualitative and quantitative donkey meat adulteration [J]. *J Food Meas Charact*, 2021, 15(2): 1161-1168.
- [16] Chen R, Lu X, Li M, et al. Polymerase chain reaction using “V” shape thermal cycling program [J]. *Theranostics*, 2019, 9(6): 1572-1579.
- [17] 吴成丽, 陈蓉, 王巍, 等. 基于 PCR 的半夏水煎液中半夏药材定量检测方法研究 [J]. 中药材, 2016, 39(4): 806-809.

[责任编辑 时圣明]