

基于 ITS2 条形码鉴别南大青叶的 PCR-RFLP 研究

黄韵璇, 朱晓燕, 侯惠婵, 陈伟盛*

广州市药品检验所 国家药品监督管理局中成药质量评价重点实验室, 广东 广州 510000

摘要: **目的** 建立南大青叶马蓝 *Baphicacanthus cusia* 的分子鉴别方法。**方法** 分析 36 批马蓝及其混伪品的 ITS2 和 *psbA-trnH* 基因序列信息, 根据关键差异位点建立相应的聚合酶链式反应法-限制性片段长度多态性分析 (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP) 鉴别方法, 并考察该方法的专属性和耐用性。**结果** 马蓝的 *psbA-trnH* 基因序列与其混伪品的无明显位点差异, ITS2 基因序列具有明显的种间差异, 其中 1 个关键差异位点可被限制性内切酶 *Sma* I 识别和酶切, 以此建立的 PCR-RFLP 鉴别方法符合《中国药典》2020 年版四部中专属性和耐用性的要求。**结论** 建立了有效鉴别南大青叶的 PCR-RFLP 方法, 且该方法适用于基原物种为马蓝的其他中药材鉴别。

关键词: 马蓝; 大青; DNA 条形码; PCR-RFLP; ITS2

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)20-6350-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.20.025

Identification of leaves from *Baphicacanthus cusia* based on ITS2 DNA barcode and PCR-RFLP

HUANG Yun-xuan, ZHU Xiao-yan, HOU Hui-chen, CHEN Wei-sheng

Guangzhou Institute for Drug Control, NMPA Key Laboratory of Quality Control of Chinese Patent Medicine, Guangzhou, 510000, China

Abstract: Objective To establish a molecular identification method for leaves of *Baphicacanthus cusia*. **Method** The polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) identification method was established on sequencing the ITS2 and *psbA-trnH* with DNA barcoding technique from ChP. 2020 Volume IV, analyzing the variation site of 36 batches leaves of *B. cusia* and its adulterants, and verifying the specificity and durability. **Result** There was significant interspecific difference in ITS2 and no available variation site in *psbA-trnH* of *B. cusia* and its adulterants. The PCR-RFLP method with recognizing the critical site in ITS2 and digesting the amplicification product of *B. cusia* by restriction enzyme *Sma* I was established and verified. **Conclusion** The PCR-RFLP method based on ITS2 DNA barcode can effectively identify *B. cusia* and its adulterants.

Key words: *Baphicacanthus cusia* (Nees) Bremek.; *Clerodendrum cyrtophyllum* Turcz.; DNA barcoding; PCR-RFLP; ITS2

历史上使用的“大青叶”来源有 4 个基原, 分别为十字花科植物菘蓝 *Isatis indigotica* Fort. 的干燥叶、蓼科植物蓼蓝 *Polygonum tinctorium* Ait. 的干燥叶、爵床科植物马蓝 *Baphicacanthus cusia* (Nees) Bremek. 的干燥叶、马鞭草科大青 *Clerodendrum cyrtophyllum* Turcz. 的干燥叶。其中, 菘蓝的干燥叶和蓼蓝干燥叶分别以“大青叶”和“蓼大青叶”收载在《中国药典》2020 年版; 马蓝干燥叶以“大青叶”收载在《四川省中药材标准》1987 年版和《广东省中药炮制规范》1984

年版; 大青干燥叶以“大青叶 (马大青叶)”收载在《湖南省药材标准》2009 年版。在《中国药典》2020 年版一部中, 菘蓝的干燥根和干燥叶分别被收载为“板蓝根”和“大青叶”^[1], 而马蓝的干燥根茎和根被收载为“南板蓝根”^[1], 本实验所述“南大青叶”为爵床科植物马蓝的干燥叶。

马蓝为草本植物, 主要分布于我国华南、西南和华东地区, 由于马蓝产量限制与各地区的使用习惯不同, 市售的南大青叶易为同科混伪品 (如球花

收稿日期: 2021-03-06

基金项目: 广州市科技计划项目 (20212210005); 广州市市场监督管理局科技项目

作者简介: 黄韵璇 (1992—), 女, 硕士, 从事中药分子鉴定研究。E-mail: hyx612@163.com

*通信作者: 陈伟盛, 副主任药师。Tel: (020)81245120 E-mail: petaispear@163.com

马蓝叶、广西马蓝叶、疏花马蓝叶、少花马蓝叶等)或不同科属的大青叶和菰蓝叶等^[2]。传统的显微鉴别和化学鉴别易受基原植物的生长环境影响^[3],而且对操作人员的技术背景有一定要求,鉴别结果准确度不高。因此,采用基于 DNA 条形码(DNA barcoding)技术的分子鉴别方法作为传统鉴别手段的补充,可以有效降低南大青叶的鉴别难度,加强基原物种马蓝相关药材、饮片和中成药的质量监管,提高民众用药安全^[4]。

DNA 条形码技术是通过一段短的、标准的 DNA 序列进行物种鉴定的分子技术,鉴定结果不受物种个体形态特征和发育阶段的影响,操作流程简单规范,不过度依赖操作人员的经验,经过近些年的发展已广泛应用于海关、法医、动植物检验检疫、食品、药品及化妆品检测等多个领域^[5]。在中药材鉴定方面,陈士林团队创建了基于 ITS2、*psbA-trnH*、COI 的 DNA 条形码生物鉴定体系^[6],并且该方法已纳入《中国药典》2020 年版,收载的中药材中,川贝母的鉴别项下包含了基于 ITS1 条形码测序分析的聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性(polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)法^[1]。该方法是针对限制性酶切位点限制性片段长度变异的一种常用的生物基因型鉴定方法,它在 PCR 的基础上利用限制性内切酶和琼脂糖凝胶电泳检测能准确区别川贝母与

其混伪品。

参照《中国药典》2020 年版四部中药材 DNA 条形码分子鉴定法指导原则,选用 ITS2 序列为主体序列,以叶绿体 *psbA-trnH* 为辅助序列,对 36 批南大青叶样品进行序列比对,探索马蓝与其近缘种在分子水平上的差异。并且,通过分析马蓝及其近缘物种的 DNA 条形码位点差异,建立南大青叶基于 ITS2 基因和限制性内切酶 Sma I 的 PCR-RFLP 鉴别方法。

1 材料与仪器

1.1 材料

本实验用 36 批南大青叶药材信息见表 1。其中,阳性对照药材 P2~P4 和 P6~P15 为自采样本,经广州市药品检验所中药室侯惠婵主任中药师鉴定为马蓝 *B. cusia* (Nees) Bremek.; 阴性对照药材 N14、N16~N21 样品分别为爵床科垂序马蓝 *Strobilanthes japonicus* (Thunb.) Miq.、爵床科艳芦莉 *Ruellia elegans* Poir.、爵床科翠芦莉 *R. simplex* C.Wright.、爵床科狗肝菜 *Dicliptera chinensis* (L.) Juss.、爵床科云南山壳骨 *Pseuderanthemum crenulatu* (Wallich ex Lindley) Radlkofer. 疑似品、马鞭草科大青 *C. cyrtophyllum* Turcz. 和十字花科菰蓝 *I. indigotica* Fortune.。

1.2 仪器和试剂

SIGMA 1-14K 型高速离心机(美国 SIGMA 公

表 1 36 批南大青叶样品编号和来源信息

Table 1 Serial number and source of 36 batches of materials

编号	物种名称	来源	编号	物种名称	来源
P1	马蓝	广西壮族自治区	N4	马蓝(疑似)	广东
P2	马蓝	广州中医药大学药王山	N5	马蓝(疑似)	广西壮族自治区
P3	马蓝	广州中医药大学药王山	N6	马蓝(疑似)	广西壮族自治区
P4	马蓝	福建马蓝种植基地	N7	马蓝(疑似)	广州清平市场
P5	马蓝	广东	N8	马蓝(疑似)	广州清平市场
P6	马蓝	广东罗浮山	N9	疏花马蓝(疑似)	广西壮族自治区
P7	马蓝	云南昆明植物所	N10	关节马蓝	白云山和黄神农草堂
P8	马蓝	广东从化种植基地	N11	马蓝(疑似)	广州清平市场
P9	马蓝	广西药用植物园	N12	马蓝(疑似)	广西壮族自治区
P10	马蓝	广东从化	N13	马蓝(疑似)	广东从化温泉宾馆
P11	马蓝	广东从化	N14	垂序马蓝	白云山和黄神农草堂
P12	马蓝	广东罗浮山	N15	马蓝(疑似)	广东
P13	马蓝	广东罗浮山索道	N16	艳芦莉	广州市药品检验所
P14	马蓝	广东从化吕田	N17	翠芦莉	广州市药品检验所
P15	马蓝	白云山和黄神农草堂	N18	狗肝菜	广州市药品检验所
N1	马蓝(疑似)	广东	N19	云南山壳骨(疑似)	未知
N2	马蓝(疑似)	广西壮族自治区	N20	大青	白云山和黄神农草堂
N3	马蓝(疑似)	广东	N21	菰蓝	白云山和黄神农草堂

司); 水浴摇床 WNB14 (德国 Memmert 公司); PCR 扩增仪 9700 (美国 AB Applied Biosystems 公司); 分析天平 PM200 (瑞士 Mettler Toledo 公司); 凝胶成像系统 GelDoc XR+ (美国 Bio-Rad 公司); 组织粉碎仪 pulverisette23 (德国 IKA 公司)。

植物基因组 DNA 提取试剂盒 DNeasy Plant Mini Ki (QIAGEN); PrimeSTAR Max Premix (Takara Bio); DL 2000 DNA Marker (Takara Bio); Gelred 染料 (Biotium); Sma I Fastdigest (ThermoScience); ITS2 序列正向引物 ITS2F: 5'-ATGCGAT-
ACTTGGTGTGAAT-3', 反向引物 ITS3R: 5'-GACGCTTCTCCAGACTACAAT-3' (华大基因); *psbA-trnH* 序列正向引物 psbAF: 5'-GTTATGCATG-AACGTAATGCTC-3', 反向引物 trnHR: 5'-CGCGC-ATGGTGGATTACACAATCC-3' (华大基因)。

2 方法

2.1 DNA 的提取

取样品约 20 mg, 置组织粉碎仪中制成细粉, 按照植物基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取样品 DNA。

2.2 PCR 扩增

扩增 ITS2 和 *psbA-trnH* 分别使用 ITS2R/ITS3F 和 fwd/rev 引物对, 反应总体积为 20 μ L, DNA 模板加入量为 0.5~1.0 ng, 反应参数为 98 $^{\circ}$ C 预变性 30 秒, 循环反应 30 次 (98 $^{\circ}$ C、10 s, 56 $^{\circ}$ C、15 s, 72 $^{\circ}$ C、20 s), 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

2.3 测序与比对分析

将 PCR 产物委托华大基因进行正反向测序, 测序引物为 PCR 反应引物。获得的双向测序峰图文件利用 SeqMan 软件进行序列拼接, 再去除测序结果两端信号弱或重叠峰区域, 使序列方向与 PCR 扩增正向引物方向一致。拼接的序列使用基于隐马尔科夫模型的 ITS2 注释网站 (<http://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de>) 进行标注^[7], 再在 MEGA 10.0.5 软件上采用 Clustal W 方法比对分析样品序列, 绘制 Neighbor-joining (N-J 进化树)。

2.4 Sma I 酶切反应

酶切反应总体积为 20 μ L, 反应体系包括 10 $\times$ 酶切缓冲液 2 μ L, PCR 反应液 10 μ L, Sma I 0.5 μ L, 无菌水 7.5 μ L, 反应在 37 $^{\circ}$ C 水浴进行。

3 结果与分析

3.1 南大青叶及其混伪品的 DNA 条形码鉴定

参照《中国药典》2020 年版四部通则 9107 中

药材 DNA 条形码分子鉴定法指导原则, 选用 ITS2 为主体序列, 叶绿体 *psbA-trnH* 为辅助序列对 36 批样品进行分子鉴定。所有样品的 DNA 条形码片段均成功扩增, *psbA-trnH* 测序得到约 510 bp 的序列信息, 而含有重复 GC 片段的 ITS2 序列难以测通, 经过拼接和去除信号弱的区域仅得到大小约为 300 bp、包含 28S motif 区域的片段序列。

将所有样品 ITS2 基因的可测序部分的序列用 Clustal W 方法分析比对绘制 N-J 进化树 (图 1), 再将样品序列输入 NCBI 数据库进行 BLAST 比对 (表 2), 结果显示 P1~P15 样品与马蓝的相应序列完全一致; N1~N10 样品与马蓝的 ITS2 序列存在位点差异, 相似度为 96%; N13~N15 样品与马蓝 ITS2 序列的差异位点较多, 相似度为 93%, 而且在进化树上表现为属于 P1~P15 和 N1~N12 的外群; N16~N21 样品与其他物种 ITS2 序列较一致, 与马蓝的序列差异较大。另外, 将 P1~P15、N1、N3、N9、N15 样品的 *psbA-trnH* 序列进行比对, P1~P15 与 N9 无位点差异, N1、N3、N15 与其他序列仅有 2 个位点的差异, 说明 *psbA-trnH* 不适用于马蓝鉴定。因此, 上述 36 批样品按中药材 DNA 条形码分子鉴定, P1~P15 的物种鉴定为马蓝, 为南大青叶正品, N1~N15 的物种鉴定为马蓝同科近缘物种, 为南大青叶混伪品, N16~N21 为其他科属物种, 为南大青叶混伪品。

3.2 南大青叶 PCR-RFLP 法鉴别方法建立

根据所有样品 ITS2 的测序结果, 南大青叶正品比对混伪品有 2 个稳定的关键差异位点 (图 2), 其中一个位点在限制性内切酶 Sma I 的识别区域 CCCGGG 中, 即南大青叶 ITS2 基因扩增产物约 500 bp, 经 Sma I 酶切可形成 2 条大小分别约为 200 bp 和 300 bp 的 DNA 片段, 以此可建立相应的南大青叶 PCR-RFLP 鉴别方法。另外, 按中药材 DNA 条形码鉴定指导原则采用 56 $^{\circ}$ C 退火温度扩增南大青叶样品的 ITS2 基因, 扩增产物在 300 bp 位置有非特异性条带影响酶切后目的条带的观察, 因此使用 58 $^{\circ}$ C 的退火温度进行 PCR-RFLP 反应更适用于南大青叶的鉴别。

3.3 南大青叶 PCR-RFLP 法鉴别方法验证

按《中国药典》2020 年版四部 9101 药品质量标准分析方法验证指导原则分别考察上述 PCR-RFLP 鉴别方法的专属性和耐用性。

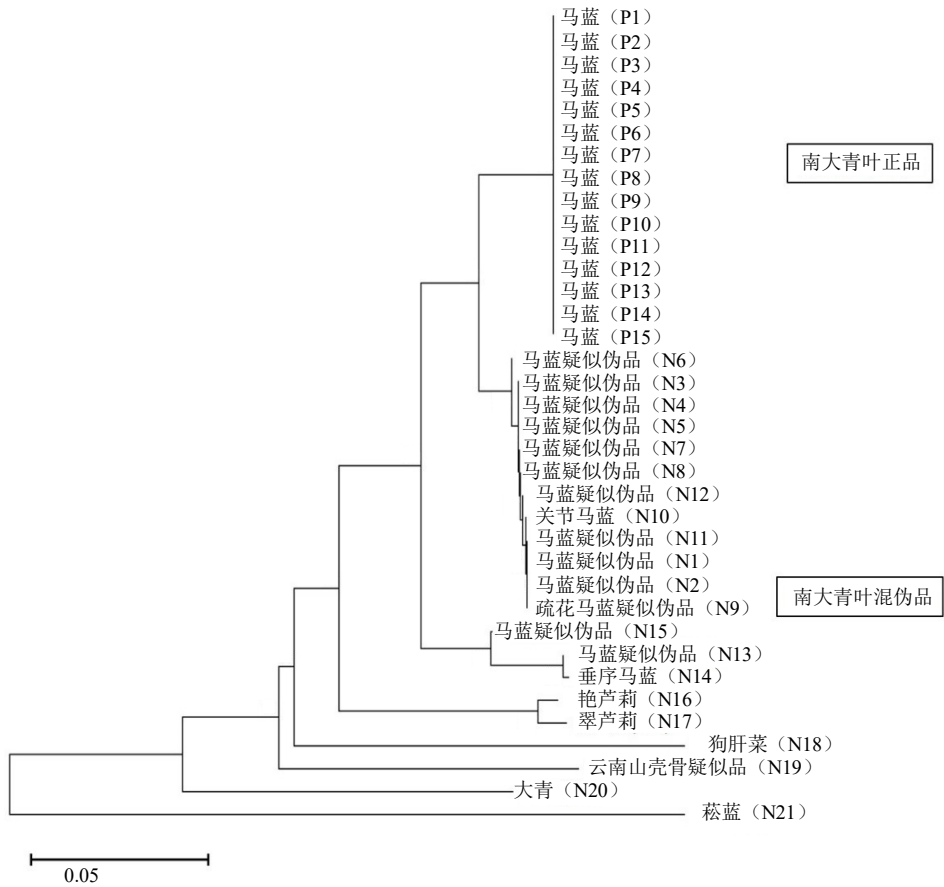


图 1 基于 36 批样品部分 ITS2 序列的 N-J 进化树

Fig. 1 N-J tree based on part of ITS2 sequences of 36 samples

表 2 36 批样品 ITS2 部分序列的 BLAST 比对结果

Table 2 BLAST result based on part of ITS2 sequeces of 36 samples

样品号	样品物种名称	比对物种名称 (登记号)	相似度/%
P1~15	马蓝	<i>Baphicacanthus cusia</i> (KT004496.1)	100
N1~8、N11~12	马蓝 (疑似)	<i>Baphicacanthus cusia</i> (KT004496.1)	95~96
N9	疏花马蓝 (疑似)		
N10	关节马蓝		
N13、N15	马蓝 (疑似)	<i>Strobilanthes cusia</i> (LC257985.1)	93
N14	垂序马蓝		
N16	艳芦莉	<i>Ruellia amoena</i> (KT004491.1)	98
N17	翠芦莉	<i>Ruellia tuberosa</i> (KT004493.1)	98
N18	狗肝菜	<i>Dicliptera chinensis</i> (KP744319.1)	99
N19	云南山壳骨	<i>Pseuderanthemum reticulatum</i> (KT004490.1)	99
N20	大青	<i>Clerodendrum cyrtophyllum</i> (MG730215.1)	100
N21	菰蓝	<i>Isatis tinctoria</i> (MG730905.1)	100

3.3.1 专属性试验 按“2.1”“2.2”项对 36 批样品进行 DNA 提取, 利用 PCR 反应扩增样品 ITS2 基因, 退火温度为 58 ℃, 然后用 Sma I Fastdigest 酶切 PCR 产物, 反应 15 min, 酶切产物用琼脂糖凝胶电泳检测。结果显示, 南大青叶正品 P1~P15 在 200~300 bp 位置有 2 个明亮的酶切的条带, 均呈

阳性反应; 南大青叶混伪品 N1~N21 和空白对照在 200~300 bp 处无条带, 均呈阴性反应 (图 3)。结果说明上述 PCR-RFLP 方法用于鉴别南大青叶符合《中国药典》2020 年版四部 9101 专属性的要求。

3.3.2 耐用性试验 取 3 批南大青叶正品和 3 批南大青叶混伪品按上述 PCR-RFLP 反应进行鉴别, 分别使

P1	GTCCG	CCCGGG	AATCG	CTTACGAGGAT
P2				
P3				
P4				
P5				
P6				
P7				
P8				
P9				
P10				
P11				
P12				
P13				
P14				
P15				
N1		G.....		A.....
N2		G.....		A.....
N3		G.....		A.....
N4		G.....		A.....
N5		G.....		A.....
N6		G.....		A.....
N7		G.....		A.....
N8		G.....		A.....
N9		G.....		A.....
N10		G.....		A.....
N11		G.....		A.....
N12		G.....		A.....
N13		A.....	A.....	A.....
N14		A.....	A.....	A.....
N16		A.....	A.....	A.....
N17		KAT.....	CT.....A.....	A.....
N15		AT.....	CT.....A.....	A.....
N19		GT.....	GC.....A.....	A.....
N18		GT.....	C.....A.....	A.....
N20	T.TT	AT.....	G.....A.....	A.....
N21	TC.T	T.....T.ATGCTC	A.....	A.....

图 2 限制性内切酶 *Sma* I 在马蓝 ITS2 基因序列中的识别位点示意图

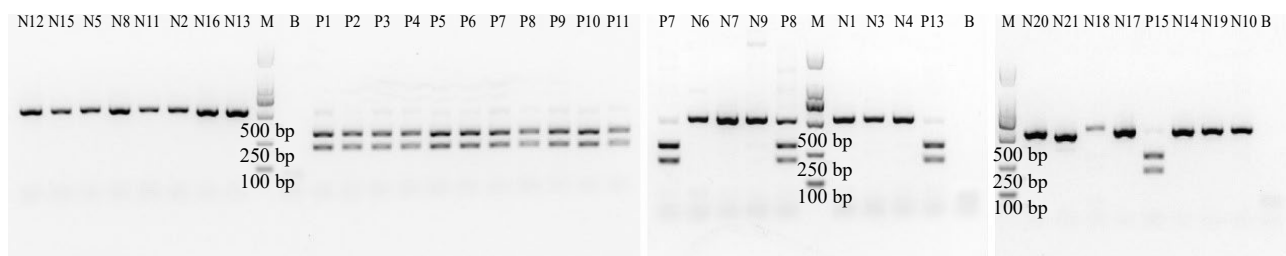
Fig. 2 Recognition site of restriction enzyme *Sma* I in ITS2 sequences of *B. cusia* and its adulterants

用与专属性试验不同的植物 DNA 提取试剂盒（北京天根、北京中科瑞泰）、ITS2 通用引物（Invitrogen）、退火温度（60 °C）、DNA 聚合酶（Promega GoTaq® DNA 聚合酶、Promega Taq DNA 聚合酶）、*Sma* I 限制性内切酶（Promega、ThermoScience）和 1 h 酶切反应时间，各反应体系与条件参考商品化试剂说明书。结果显示，所有样品的在 500 bp 的位置均有 PCR 产物条带；南大青叶正品的酶切产物在 200~300 bp 位置有 2 个酶切条带，呈阳性反应；南大青叶混伪品无酶切条带，呈阴性反应（图 4）。因此，上述 PCR-RFLP 方法用于鉴别南大青叶符合《中国药典》2020 年版四部 9101 耐用性的要求。

4 讨论

本实验针对南大青叶鉴别建立的 PCR-RFLP 方法是基于 DNA 分子条形码 ITS2 的分析应用。经过对 36 批中药材南大青叶及混伪品的序列分析，南大青叶所属物种马蓝的 ITS2 序列与疏花马蓝、关节马蓝、垂序马蓝等近缘物种的有明显的位点差异，与艳芦莉、翠芦莉、狗肝菜、云南山壳骨、大青和菰蓝等混伪品的有较大种间差异。而且，黄志海等^[8]分析马蓝、菰蓝、蓼蓝和大青的 ITS2 条形码序列，结果发现 4 个物种在 N-J 进化树上也能明显区分。因此，ITS2 作为鉴定马蓝的 DNA 分子条形码具备良好的适用性。

涂媛^[9]针对马蓝、蓼蓝和菰蓝等含靛玉红类中药材的 4 种 DNA 条形码序列进行了扩增分析，结果发现 ITS2 序列的扩增效率及测序成功率较低，进



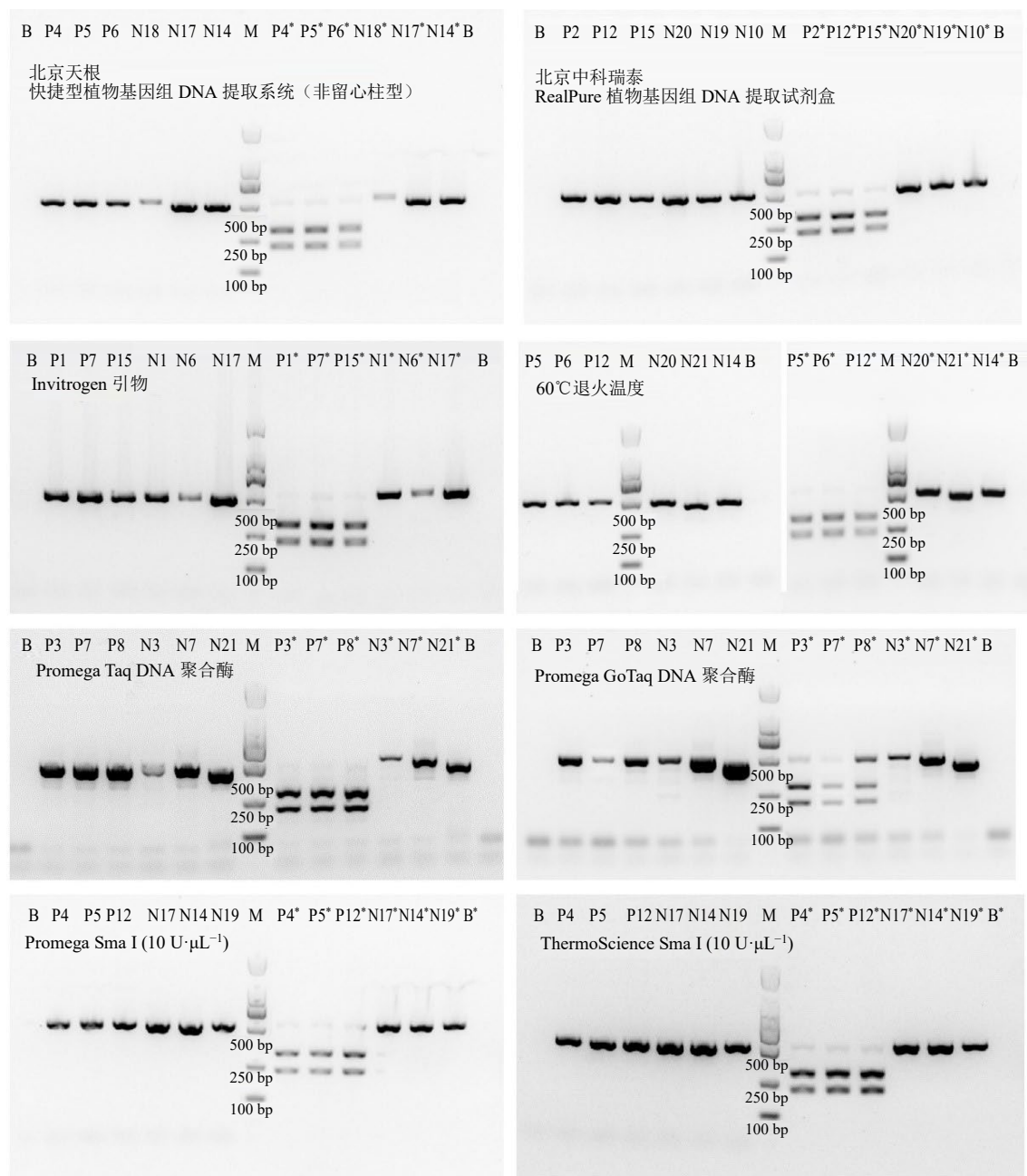
M-Marker B-空白对照 P1~15-南大青叶正品 N1~N21-南大青叶混伪品
M-Marker B-blank control P1—15-*B. cusia* (Nees) Bremek. N1—N21-adulterants

图 3 36 批南大青叶样品 PCR-RFLP 鉴别结果

Fig. 3 Identification result of 36 batches of samples with PCR-RFLP method

而采用 T-A 克隆法获得高质量测序结果。蒋超等^[10]采用碱裂法提取各类药材 DNA 发现来自植物叶样品的 DNA 纯度比根和茎的较高，但 PCR 扩增效率最低。本研究采用硅胶膜吸附柱和离心柱法提取干

燥叶样品中的基因组 DNA，经紫外分光光度计测定所得 DNA 溶液纯度较低，在 260 nm 吸光度值较大，直接用作模板会影响扩增效率或导致扩增失败。但是，用适量无菌纯化水将模板 DNA 稀释后再加



M-Marker B-空白对照 P1~P15-南大青叶正品的 PCR 产物 P1*~P15*-南大青叶正品的酶切产物 N1~N21-南大青叶混伪品的 PCR 产物 N1*~N21*-南大青叶混伪品的酶切产物

M-Marker B-blank control P1—P15-PCR product of *Baphicacanthus cusia* (Nees) Bremek. P1*—15*-enzyme digested product of *Baphicacanthus cusia* (Nees) Bremek. N1—N21-PCR product of adulterants N1*—N21*-enzyme digested product of adulterants

图 4 PCR-RFLP 法鉴别南大青叶的耐用性考察

Fig. 4 Robustness of PCR-RFLP identification method with *B. cusia*

入 PCR 反应体系中,所有样品的 ITS2 序列均能成功扩增,表明采用简单的稀释模板步骤可提高中药材 DNA 序列的扩增效率,减少植物中多糖、多酚和部分次级代谢产物对扩增反应的抑制作用。

在《中国药典》2020 年版一部的收载品种中,南板蓝根为马蓝的干燥根茎或根,青黛为马蓝、蓼

蓝或菰蓝的叶或茎叶经加工制成的干燥粉末、块团或颗粒,二者采用的鉴别方法为显微鉴别、化学鉴别和针对靛蓝与靛玉红的薄层色谱法^[1]。本研究建立的 PCR-RFLP 法对马蓝物种的鉴别具有良好的专属性和耐用性,因此同样适用于鉴别南板蓝根,方法快捷高效,结果准确,有效弥补了传统的鉴别手

段主观性强、准确性低、样品用量大等不足。同时,魏艺聪等^[11]通过对 20 条样本信息的 SNP 分析发现 matK 序列可以用于鉴别马蓝和大青,但本研究表明马蓝与其近缘物种的 *psbA-trnH* 基因不存在明显的变异位点,因此基于 DNA 条形码分子技术建立相应的鉴定体系,在鉴别中药材青黛方面也有着重要的应用前景。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 21, 205.
- [2] 刘慧. 3 种市售大青叶的鉴别比较 [J]. 海峡药学, 2012, 24(9): 34-35.
- [3] 张先达, 陈奕龙, 张丹雁. 南大青叶及其混伪品生药学研究 [J]. 广州中医药大学学报, 2016, 33(6): 860-867.
- [4] 吴田泽, 赵小惠, 胡心怡, 等. 中药材 DNA 条形码鉴定技术应用进展 [J]. 中医药导报, 2019, 25(16): 125-130.
- [5] 张彩云, 黄珊珊, 颜海飞. DNA 条形码技术在中药鉴定中的应用进展 [J]. 中草药, 2017, 48(11): 2306-2312.
- [6] 陈士林, 姚辉, 韩建萍, 等. 中药材 DNA 条形码分子鉴定指导原则 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(2): 141-148.
- [7] Keller A, Schleicher T, Schultz J, et al. 5.8S-28S rRNA interaction and HMM-based ITS2 annotation [J]. *Gene*, 2009, 430(1/2): 50-57.
- [8] 黄志海, 丘小惠, 宫璐, 等. 板蓝根与南板蓝根及其混淆品的 ITS2 条形码鉴定 [J]. 中药材, 2017, 40(1): 50-53.
- [9] 涂媛. 基于 DNA 条形码的细小种子类及含靛玉红类中药材的鉴定研究 [D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2015.
- [10] 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.
- [11] 魏艺聪, 陈建雄, 黄泽豪, 等. 马蓝与路边青的 matK 序列差异与分子鉴定方法分析 [J]. 中国民族民间医药, 2016, 25(12): 27-29.

[责任编辑 时圣明]