

方药纵横

引用:赖晶,倪琳,蔺瑞丽,等.基于ITS序列PCR-RFLP鉴别北柴胡混伪品藏柴胡[J].现代中医药,2023,43(5):105-112.

基于ITS序列PCR-RFLP鉴别 北柴胡混伪品藏柴胡^{*}

赖晶 倪琳 蔺瑞丽 靳婉君 刘富强 宋平顺 马萧 滕宝霞^{**}

(甘肃省药品检验研究院/国家中药材及饮片质量控制重点实验室,甘肃 兰州 730013)

摘要:目的 基于ITS序列用PCR-RFLP方法鉴别北柴胡药材掺伪藏柴胡的方法。方法 分析并筛选出藏柴胡特有的限制性内切酶Ase I,用Primer Premier 5.0设计特异性引物,对引物PCR扩增条件和酶切试验进行优化,并对该方法的准确性进行了考察。结果 PCR扩增的目的片段为331 bp,且建立的PCR反应方法对不同的酶均具有适应性。限制性内切酶Ase I将藏柴胡切成79 bp和252 bp两个片段,而北柴胡及其他柴胡均不能被酶切,且掺伪检出限为1%。结论 PCR-RFLP方法实现了准确鉴别北柴胡中的混伪品藏柴胡。

关键词:藏柴胡;北柴胡;ITS;PCR-RFLP;分子鉴定

中图分类号:R282.5 文献标识码:A

文章编号:1672-0571(2023)05-0105-08

DOI:10.13424/j.cnki.mtcm.2023.05.020

Identification of Mixed and Counterfeit Zang Chaihu from Bei Chaihu Based on ITS Sequence PCR-RFLP

LAI Jing NI Lin LIN Ruili JIN Wanjun LIU Fuqiang

SONG Pingshun MA Xiao TENG Baoxia

(Gansu Provincial Institute for Drug Control/National Key Laboratory for Quality Control of
Traditional Chinese Medicine and Dried Pieces, Lanzhou 730013, China)

Abstract: Objective To identify the adulteration of Bupleurum chinense with Zang Bupleurum chinense based on ITS sequence using PCR-RFLP method. **Methods** Analysis and screening were conducted to identify the specific restriction endonuclease Ase I in Tibetan Chaihu. Primer Premier 5.0 was used to design specific primers, optimize the PCR amplification conditions and enzyme digestion test, and evaluate the accuracy of this method. **Results** The target fragment amplified by PCR was 331 bp, and the established PCR reaction method was adaptable to different enzymes. Restrictive endonuclease Ase I cleaves Zang Bupleurum into 79 bp and 252 bp fragments, while Northern Bupleurum and other Bupleurum cannot be cleaved, and the detection limit for adulteration is 1%. **Conclusion** The PCR-RFLP method has achieved accurate identification of the counterfeit Zang Chaihu in Beichaihu.

Key words: Zang Chaihu; Bei Chaihu; ITS; PCR-RFLP; Molecular identification

* 基金项目:国家药监局中药材及饮片质量控制重点实验室项目(2021GSMPA-KL03)

** 通讯作者:滕宝霞,教授。E-mail:tengbx66@163.com

《中华人民共和国药典》2020 年版收载的柴胡为伞形科植物柴胡 (*Bupleurum chinense* DC.) 和狭叶柴胡 (*Bupleurum scorzonerifolium* Wild.) 的干燥根,根据性状不同,前者习称“北柴胡”,后者习称“南柴胡”^[1]。柴胡作为大宗中药材之一,含柴胡的中成药的品种也有很多,如小柴胡颗粒、柴胡疏肝丸、柴胡滴丸等,不仅具解表散热、疏肝和胃等功效,而且据文献报道,加味小柴胡汤对治疗肺部多重耐药菌感染有明显效果^[2]。当前,随着不同地方引进栽培,柴胡属出现很多变种。藏柴胡作为柴胡属变种之一,来源于伞形科植物窄竹叶柴胡 *Bupleurum marginatum* Wall. ex DC. var. *stenophyllum* (Wolf) Shan et Y. Li 的干燥根,主产于云南、四川、贵州、西藏等部分地区^[3]。我国贵州省药材标准中又以“竹叶柴胡”的名称收载^[4]。由于北柴胡野生资源短缺和价格高,药材市场出现了以藏柴胡充当正品北柴胡的现象,影响药效和安全问题,因此建立基源鉴定方法十分必要。

《中国药典》和《日本药局方》通过柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 d 的总含量控制柴胡质量,《欧洲药典》《英国药典》《中药材标准》和《韩国药典》以单一指标成分柴胡皂苷 a 进行质量控制^[5]。有文献报道利用 HPLC 和比色法对柴胡中柴胡皂苷 a (SSa) 和柴胡皂苷 d (SSd) 及总黄酮的含量来进行柴胡质量评价^[6]。SSd 是 SSa 的差向异构体,SSd 除了具有与 SSa 相似的抗炎^[7]、抗肿瘤^[8] 和免疫调节^[9] 的药理作用,SSd 还有特定的药理作用,如抗过敏^[10] 和抗凋亡^[11]。现报道的文献一般利用柴胡皂苷来鉴别柴胡药材真伪,仅靠单一指标对鉴别真伪有很大的局限性,不能更全面控制柴胡质量。

PCR-RFLP 是利用特定的限制性内切酶识别特异性序列将 PCR 扩增产物消化切割成大小不同的 DNA 片段,可直接用琼脂糖凝胶电泳分辨 DNA 条带大小及多态性的方法。现已有文献报道关于 PCR-RFLP 鉴定中药材的真伪鉴别,如大黄^[12]、木通^[13]、泽泻^[14]、川贝母^[15]、人参^[16]。PCR-RFLP 方法不仅可以用于物种鉴定,还可以用于不同产地的地理鉴别^[17]。本试验旨在筛选藏柴胡的限制性内切酶,并设计引物,对 PCR-RFLP 方法优化和考查,从而建立适用于快速、稳定鉴别北柴胡混伪品藏柴胡的方法。

1 仪器与材料

1.1 仪器 Veriti™ 96-Well 型 PCR 仪; Legend Micro 21R 型高速冷冻离心机; Nano Drop2000 型微量核酸定量仪 (美国赛默飞世尔科技公司); Sub Cell®GT 型电泳仪 (美国伯乐公司); Geldoc-It2 315 型凝胶成像系统 (美国 UVP 公司)。

1.2 试剂 Plant Genomic DNA Kit 200 preps 植物基因组 DNA 提取试剂盒, 2 × Taq PCR MasterMix, 50 × TAE [天根生化科技 (北京) 有限公司], Prime STAR HS Premix, DL500 DNA Marker (TAKARA), Ase I 限制性内切酶 (美国 NEB 公司), 2 × Taq PCR StarMix (北京康润诚业生物科技有限公司), 琼脂糖 (美国 Invitrogen 公司), GelRed (美国 Biotium 公司)。

1.3 药材 北柴胡对照药材 (批号: 120992-201509) 购于中国食品药品检定研究院。收集了 9 批北柴胡和 21 批藏柴胡的干燥根,经甘肃省药品检验研究院宋平顺检验师和马萧主任药师鉴定,具体信息见表 1。

表 1 北柴胡和藏柴胡信息表

编号	名称	拉丁学名	来源 (产地)
1	野生北柴胡	<i>Bupleurum chinense</i>	甘肃省华亭县
2	栽培北柴胡	<i>Bupleurum chinense</i>	甘肃省华亭县
3	北柴胡	<i>Bupleurum chinense</i>	甘肃省和政县
4	北柴胡	<i>Bupleurum chinense</i>	甘肃省武都区
5	北柴胡	<i>Bupleurum chinense</i>	甘肃省环县
6	北柴胡	<i>Bupleurum chinense</i>	甘肃省镇原县
7	北柴胡	<i>Bupleurum chinense</i>	甘肃省陇西县

续表 1 北柴胡和藏柴胡信息表

编号	名称	拉丁学名	来源(产地)
8	北柴胡	<i>Bupleurum chinense</i>	陕西省陈仓区
9	北柴胡	<i>Bupleurum chinense</i>	山西省陵川县
10	藏柴胡	<i>Bupleurum marginatum</i> var. <i>stenophyllum</i>	甘肃省正宁县
11	藏柴胡	<i>Bupleurum marginatum</i> var. <i>stenophyllum</i>	甘肃省镇原县
12	藏柴胡	<i>Bupleurum marginatum</i> var. <i>stenophyllum</i>	甘肃省陇西县
13	藏柴胡	<i>Bupleurum marginatum</i> var. <i>stenophyllum</i>	甘肃省康乐县
14	藏柴胡	<i>Bupleurum marginatum</i> var. <i>stenophyllum</i>	甘肃省临洮县
15	藏柴胡	<i>Bupleurum marginatum</i> var. <i>stenophyllum</i>	甘肃省临洮县
16	藏柴胡	<i>Bupleurum marginatum</i> var. <i>stenophyllum</i>	临洮燕园柴胡专营
17	藏柴胡	<i>Bupleurum marginatum</i> var. <i>stenophyllum</i>	甘肃省临洮县
18	藏柴胡	<i>Bupleurum marginatum</i> var. <i>stenophyllum</i>	甘肃省临洮县
19	藏柴胡	<i>Bupleurum marginatum</i> var. <i>stenophyllum</i>	陇西县中泰中药材销售公司
20	藏柴胡	<i>Bupleurum marginatum</i> var. <i>stenophyllum</i>	甘肃省临洮县
21	藏柴胡	<i>Bupleurum marginatum</i> var. <i>stenophyllum</i>	临洮燕园柴胡专营
22	藏柴胡	<i>Bupleurum marginatum</i> var. <i>stenophyllum</i>	临洮燕园柴胡专营
23	藏柴胡	<i>Bupleurum marginatum</i> var. <i>stenophyllum</i>	甘肃省窑店镇
24	藏柴胡	<i>Bupleurum marginatum</i> var. <i>stenophyllum</i>	甘肃省临洮县
25	藏柴胡	<i>Bupleurum marginatum</i> var. <i>stenophyllum</i>	甘肃省临洮县
26	藏柴胡	<i>Bupleurum marginatum</i> var. <i>stenophyllum</i>	甘肃省陇西县
27	藏柴胡	<i>Bupleurum marginatum</i> var. <i>stenophyllum</i>	甘肃省药材市场
28	藏柴胡	<i>Bupleurum marginatum</i> var. <i>stenophyllum</i>	甘肃省陇西县
29	藏柴胡	<i>Bupleurum marginatum</i> var. <i>stenophyllum</i>	甘肃省陇西县
30	藏柴胡	<i>Bupleurum marginatum</i> var. <i>stenophyllum</i>	四川药材市场

2 方法

2.1 酶切位点选择及 PCR-RFLP 引物设计 将 GenBank 数据库中的北柴胡和藏柴胡的 ITS 序列利用 DNAMAN 软件比对,北柴胡和藏柴胡的 ITS 序列存在多个 SNP 位点变异,藏柴胡有 Ase I 限制性内切酶酶切位点(AT⁺TAAT),北柴胡无此酶切位点。通过 Primer Premier 5.0 软件设计内含此酶切位点的鉴别引物 BmF-BmR(见表 2),送华大基因(北京)有限公司合成。

表 2 PCR 扩增引物序列

引物名称	序列(5' to 3')
BmF	GTAACAAGGTTTCCGTAG
BmR	TTCACACCAAGTATCGCA

2.2 基因组 DNA 提取 取适量药材用 75% 乙醇消毒后用灭菌超纯水冲洗,晾干,粉碎,称取药材粉末约 30 mg,置于 1.5 mL 离心管中,采用植物基因组 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA,加入 50 μL 洗脱缓冲液,于 -20 ℃ 保存备用。

2.3 PCR 扩增条件优化 用 1、7、9、10、13 号样

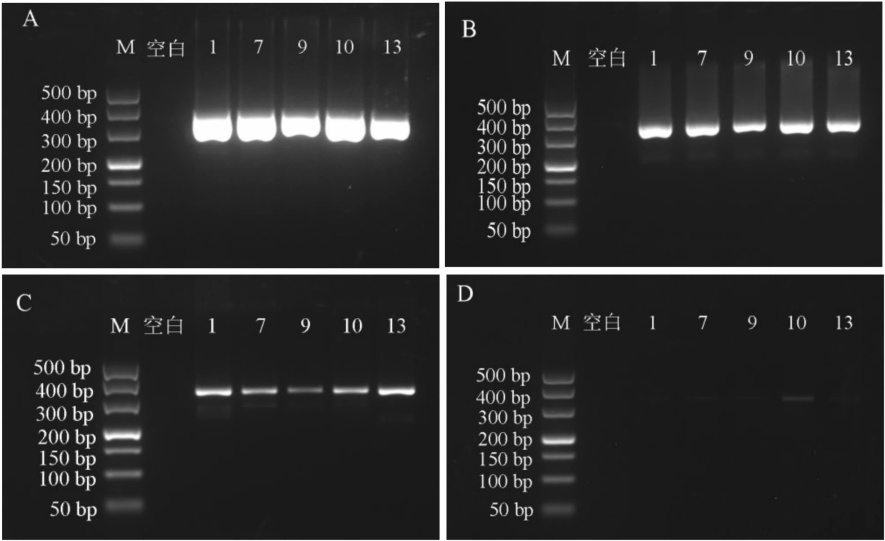
品对特异性鉴别引物进行 PCR 扩增,为获得最适特异性 PCR 反应条件,分别考察退火温度(58、60、62、63 ℃)、循环数(25、30、35 个循环)、不同酶(2 × Taq PCR StarMix、Prime STAR HS Premix)对 PCR 扩增的影响。

2.4 酶切体系及条件考察 用 1、7、9、10、13 号样品对酶切条件进行优化,分别考察酶切时间(5、10、15、30 和 60 min)和酶切底物(6、10 和 12.5 μL)。

2.5 电泳 用 2.5% 的琼脂糖电泳检测 PCR 扩增产物及酶切产物,在 130 V 电压的条件下电泳约 50 min,然后利用凝胶成像分析仪拍照。

3 结果分析

3.1 不同退火温度考察 分别设置 58、60、62 和 63 ℃ 4 个退火温度进行考查。退火温度为 60 ℃,扩增条带均清晰可见,无假阳性条带;温度上升至 63 ℃ 时,不易扩增出条带。因此,为保证 PCR 具有良好的重复性,采 60 ℃ 作为此方法的退火温度。结果见图 1。



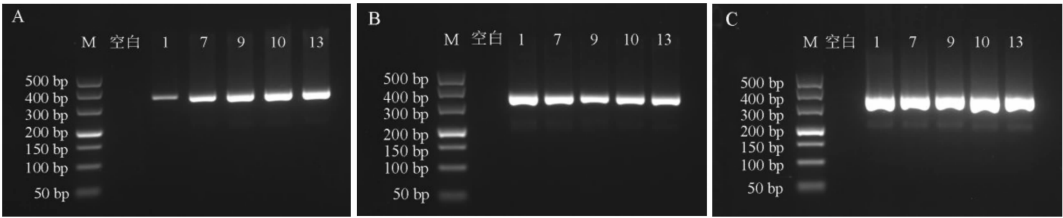
注:A. 58 ℃;B. 60 ℃;C. 62 ℃;D. 63 ℃;M. DL500 DNA Marker;空白. 空白对照;1、7、9、10、13 分别与样品信息表中的样品对应。

图 1 不同退火温度下 PCR 电泳图

3.2 不同循环数考察 将 PCR 循环数分别设置为 25、30、35 个循环。25、30 个循环时,有清晰的扩增条带;当 35 个循环时,有假阳性条带出现。因此为保证扩增的稳定性及区分度,选择 30 个循环作为扩增循环参数。结果见图 2。

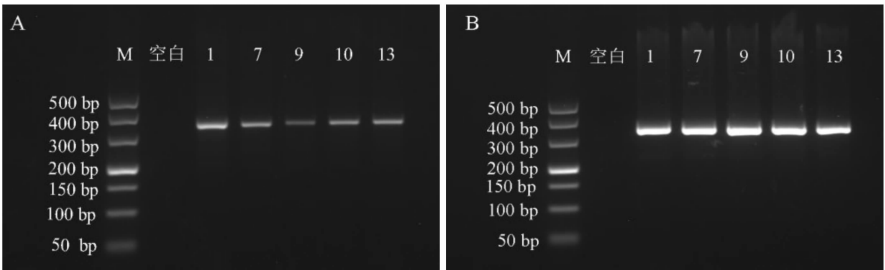
3.3 不同聚合酶考察 除上述方法中使用的聚合酶 2 × Taq PCR Mastermix 外,本试验还考察了 2 × Taq PCR StarMix 酶和 Prime STAR HS Premix

酶对该 PCR 扩增的影响。PCR 反应体系为 20 μL,包括 2 × Taq PCR Mastermix 10 μL,正反向引物 0.4 μL,DNA 模板 1 μL,无菌水补足至 20 μL;反应条件为 94 ℃ 3 min,30 个循环(94 ℃ 30 s,60 ℃ 20 s,72 ℃ 20 s),72 ℃ 5 min。用不同聚合酶均能扩增出单一 DNA 条带,说明 PCR 扩增条件适用于不同酶。结果见图 3。



注:A. 25 个循环;B. 30 个循环;C. 35 个循环;M. DL500 DNA Marker;空白. 空白对照

图 2 不同循环数 PCR 电泳图



注:A. 2 × Taq PCR StarMix;B. Prime STAR HS Premix

图 3 不同酶 PCR 电泳图

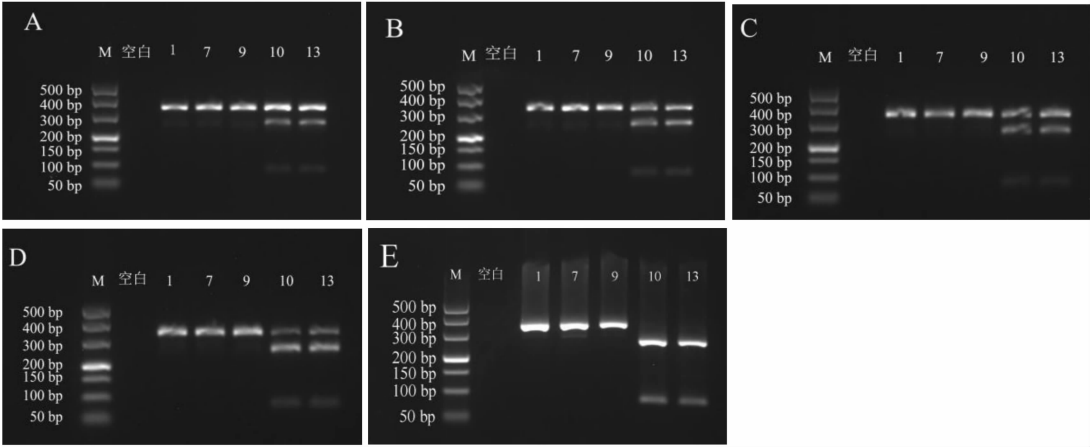
3.4 酶切体系及条件 考察酶切时间分别为 5、10、15、30 及 60 min,藏柴胡均能被限制性内切酶

Ase I 酶切切割成 79 bp 和 252 bp 两条 DNA 条带。随着酶切反应时间的增长,藏柴胡酶切后的两条 DNA 条带逐渐变亮。考虑到非特异性扩增和酶切后 79 bp 的 DNA 条带不清晰引起的误判,酶切时间为 1 h。结果见图 4。

分别设置 6、10、12.5 μL 的 PCR 扩增产物梯度,酶切 1 h。北柴胡不能被酶切,藏柴胡被酶切

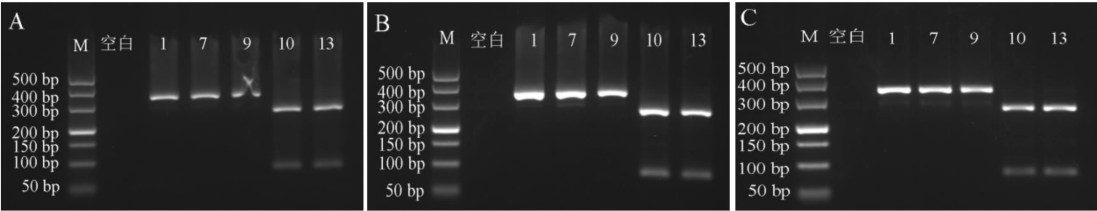
成 79 bp 和 252 bp 两条 DNA 条带。随着 PCR 产物量的增大,酶切后的两条 DNA 条带逐渐变亮。结果见图 5。

综上所述,酶切反应总体积 20 μL ,反应体系包括 10 \times 酶切缓冲液 2 μL ,限制性内切酶 Ase I (10 U/ μL) 0.4 μL ,PCR 反应液 10 μL ,无菌超纯水 7.6 μL ,酶切反应在 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴反应 1 h。



注:A. 酶切时间为 5 min;B. 酶切时间为 10 min;C. 酶切时间为 15 min;D. 酶切时间为 30 min;E. 酶切时间为 60 min

图 4 不同酶切时间下 PCR-RFLP 电泳图



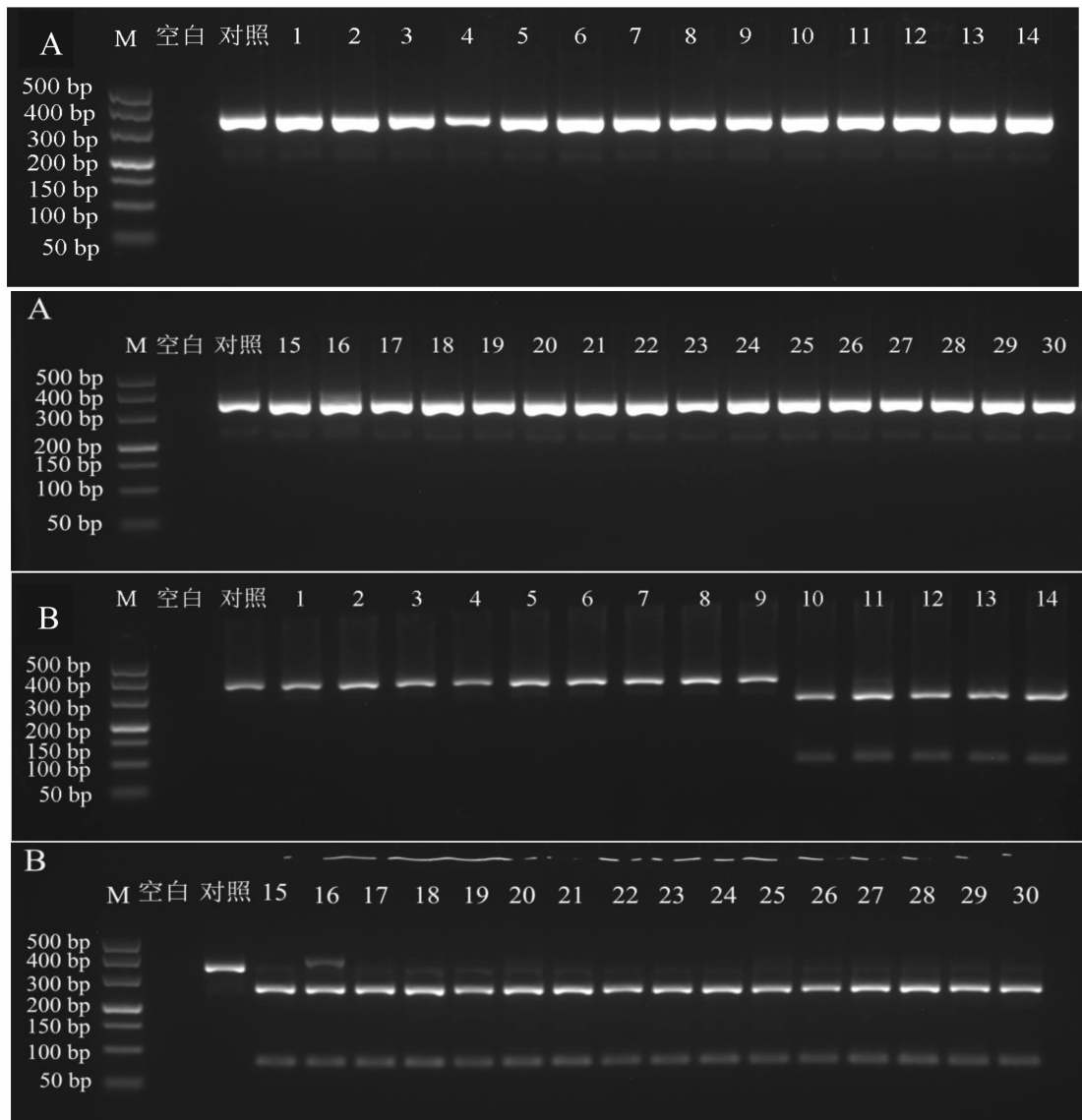
注:A:PCR 扩增产物 6 μL ;B:PCR 扩增产物 10 μL ;C:PCR 扩增产物 12.5 μL

图 5 不同 PCR 产物量酶切电泳图

3.5 适用性的考察 按照上述 PCR-RFLP 方法对北柴胡对照药材、9 份北柴胡和 21 份藏柴胡进行鉴别。PCR 反应体系为 20 μL ,包括 2 \times Taq PCR Mastermix 10 μL ,正反向引物 0.4 μL ,DNA 模板 1 μL ,无菌水补足至 20 μL ;反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min,30 个循环(94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 20 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 20 s),72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。结果表明,北柴胡和藏柴胡均能扩增出一条 331 bp 的单一 DNA 条带(图 6A)。用限制性内切酶 Ase I 酶切后 21 份藏柴胡均被酶切成大小不同的两条条带,分别为 79 bp 和 252 bp;而北柴胡对照药材和北柴胡药材均不能被酶

切(图 6B)。说明该 PCR-RFLP 反应方法适用于鉴别藏柴胡。

3.6 掺伪检出限考察 为考察藏柴胡特异性 PCR 扩增对北柴胡中掺伪藏柴胡的鉴别能力。按 0% (北柴胡)、1%、3%、5%、10%、25%、50%、75%、100% (藏柴胡) 比例将藏柴胡掺于北柴胡中,充分混匀即可。使用上述 PCR-RFLP 方法。掺有 1% 的藏柴胡,酶切后有很浅的条带;随着藏柴胡掺入量增加,酶切条带越来越清晰。结果见图 7。



注:A:PCR 扩增电泳图;B:Ase I 酶切电泳图。空白:空白对照;对照:北柴胡对照药材

图 6 不同产地北柴胡和藏柴胡样品 PCR-RFLP 电泳图

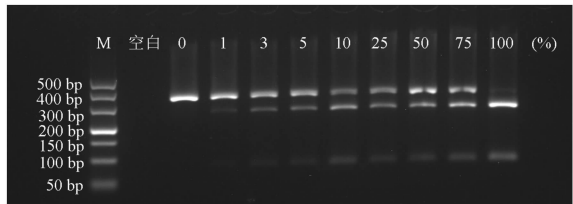
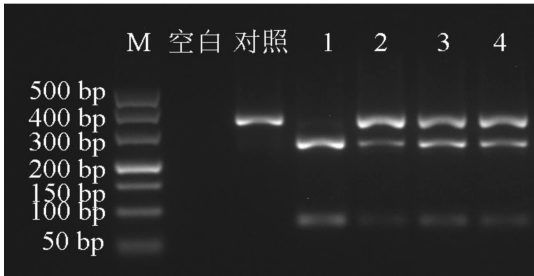


图 7 北柴胡中掺假不同比例藏柴胡
的 PCR-RFLP 电泳图

3.7 不同产地掺假验证 取不同产地的北柴胡与藏柴胡,随机比例掺兑。所有样品均能扩增出一条 331 bp 的单一 DNA 条带,掺有藏柴胡的混合样均被酶切成 79 bp 和 252 bp 两条 DNA 条带。结果见图 8。



注:空白.空白对照;对照.北柴胡对照药材;1.北柴胡(镇原)掺入藏柴胡(镇原);2.北柴胡(陇西)掺入藏柴胡(临洮);3.野生北柴胡(华亭)掺入藏柴胡(镇原);4.北柴胡(和政)掺入藏柴胡(临洮)

图 8 不同产地混合样品 PCR-RFLP 电泳图

4 讨论

在市场中存在以藏柴胡冒充北柴胡药材或掺杂混用的现象,这严重影响药材质量、药效和用药安全。随着 DNA 分子鉴定技术越来越成熟,可以从基因层面解决以化学成分为主的传统鉴定带来的不足,为中药材鉴定提供更加准确、可靠的手段。ITS 序列是位于核糖体 DNA(rDNA)上具有高度重复,各位点间协同进化,可用于属、种的鉴定。谢晖等^[18]通过对 9 种柴胡属植物进行 ITS 序列测序后同源性比对,结果发现柴胡属属内两两比对同源性均大于 88%,同种植物大于 99%。Lin 等^[19]对柴胡 3 个种(柴胡、高氏柴胡、阿尔泰柴胡)设计出序列特异性寡核苷酸探针(SSOP),分别和样品 ITS 区扩增产物杂交,通过扫描检测可鉴定不同种的柴胡。因 DNA 测序和 DNA 芯片技术制备样本时间长及程序多,该方法在日常检验中有一定的局限性。PCR-RFLP 方法作为 DNA 鉴定的方法之一,具有简单、稳定、专属性强和反应灵敏等优势,在药用植物鉴定中发挥着关键作用。本试验以 ITS 序列作为分子标记,依据北柴胡和藏柴胡的种间差异,筛选藏柴胡的特异性限制性内切酶 Ase I(ATTAAT),设计含酶切位点的引物,建立了北柴胡药材及饮片中掺伪藏柴胡的检查方法。

PCR-RFLP 反应又受到 PCR 反应体系、反应条件以及酶切时间等的影响,其中,最重要的是退火温度、引物浓度和循环数,引物浓度与退火温度选择不好会造成非特异性扩增,出现假阳性^[20]。在酶切反应时,底物浓度也会影响酶切的效果,当底物浓度过低,可能会导致酶切后的条带不清晰,可能会有一定的误判。本试验对该 PCR 扩增条件、不同聚合酶、酶切反应条件考察,建立了能够检测北柴胡中含 1% 藏柴胡掺伪检出限的 PCR-RFLP 方法。PCR-RFLP 方法提高了目的 DNA 的相对特异性、灵敏度,极大程度降低了 PCR 的假阳性,保证鉴定结果的准确性。

在历年抽检过程中,存在掺杂非药用部位的问题^[21-22]。本试验存在一定的局限性,因是从北

柴胡和藏柴胡的基源出发,只能定性的鉴别北柴胡中是否掺有藏柴胡,但对于是否掺杂北柴胡非药用部位还有待于解决。但该 PCR-RFLP 方法依然是可用于鉴别北柴胡中掺伪藏柴胡手段之一,可供质控部门参考使用。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 一部. 北京:中国医药科技出版社,2020:293.

[2] 王凌立,刘燎原,王振国. 加味小柴胡汤治疗肺部多重耐药菌感染临床研究[J]. 陕西中医药大学学报,2017, 40(2):37-40.

[3] 黄涵签,王满晗,付航,等. 柴胡属药用植物资源研究进展[J]. 中草药,2017,48(14):2989-2996.

[4] 贵州省药品监督管理局. 贵州省中药材民族药材质量标准[S]. 贵阳:贵州科学技术出版社,2003:165.

[5] 孙婷婷,骆骄阳,徐媛媛,等. 柴胡药材质量国际标准现状概述[J]. 中国中药杂志,2020,45(20):4853-4860.

[6] 张笑颜,薛璇玑,张新新,等. 宝鸡麟游县柴胡质量评价研究[J]. 现代中医药,2022,42(1):35-39.

[7] Lu XL, He SX, Ren MD, et al. Chemopreventive effect of saikosaponin-d on diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis: involvement of CCAAT/enhancer binding protein β and cyclooxygenase-2[J]. Molecular Medicine Reports, 2012, 5(3):637-644.

[8] 庄怡富,干耀恺,汤亭亭. 柴胡皂苷-d 促进骨肉瘤细胞凋亡的研究[J]. 国际骨科学杂志, 2017, 38(2): 115-120.

[9] Ying ZL, Li XJ, Dang H, et al. Saikosaponin-d affects the differentiation, maturation and function of monocyte-derived dendritic cells[J]. Experimental and Therapeutic Medicine, 2014, 7(5):1354-1358.

[10] Hao Y, Piao XS, Piao XL. Saikosaponin-d inhibits β -conglycinin induced activation of rat basophilic leukemia-2H3 cells[J]. International Immunopharmacology, 2012, 13(3):257-263.

[11] Li ZY, Jiang YM, Liu YM, et al. Saikosaponin D acts against corticosterone-induced apoptosis via regulation of mitochondrial GR translocation and a GR-dependent pathway[J]. Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry, 2014, 53:80-89.

[12] Yang DY, Fushimi H, Cai SQ, et al. Polymerase chain re-

action-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) and amplification refractory mutation system (ARMS) analyses of medicinally used Rheum species and their application for identification of Rhei Rhizoma [J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2004, 27(5): 661-669.

[13] Kitaoka F, Kakiuchi N, Long CF, et al. Molecular characterization of Akebia plants and the derived traditional herbal medicine[J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2009, 32(4): 665-670.

[14] Li XX, Ding XY, Chu BH, et al. Molecular authentication of *Alisma orientale* by PCR-RFLP and ARMS[J]. Planta Medica, 2007, 73(1): 67-70.

[15] Wang CZ, Li P, Ding JY, et al. Simultaneous identification of *Bulbus Fritillariae cirrhosae* using PCR-RFLP analysis [J]. Phytomedicine, 2007, 14(9): 628-632.

[16] Diao Y, Lin XM, Liao CL, et al. Authentication of *Panax ginseng* from its adulterants by PCR-RFLP and ARMS [J]. Planta Medica, 2009, 75(5): 557-560.

[17] Linton CJ, Jalal H, Leeming JP, et al. Rapid discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* strains by random amplified polymorphic DNA analysis[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1994, 32(9): 2169-2174.

[18] 谢晖, 晁志, 霍克克, 等. 9 种柴胡属植物的核糖体 ITS 序列及其在药材鉴定中的应用[J]. 南方医科大学学报, 2006, 26(10): 1460-1463.

[19] Lin WY, Chen LR, Lin TY. Rapid authentication of *Bupleurum* species using an array of immobilized sequence-specific oligonucleotide probes[J]. Planta Medica, 2008, 74(4): 464-469.

[20] 刘阳, 杨淑霞, 李敏惠, 等. 引物浓度与退火温度不当导致巢式 PCR 非特异性扩增[J]. 成都医学院学报, 2008, 3(2): 111-114.

[21] 魏锋, 刘薇, 严华, 等. 我国中药材及饮片的质量情况及有关问题分析[J]. 中国药学杂志, 2015, 50(4): 277-283.

[22] 张萍, 李明华, 石岩, 等. 2013—2016 年我国中药材及饮片质量状况及相关问题探讨[J]. 中国药事, 2018, 32(4): 438-444.

(修回日期: 编辑: 崔春利)