

## 何首乌等位基因特异性 PCR 鉴别方法研究

解会群<sup>1</sup>, 赵玉姣<sup>1</sup>, 查良平<sup>1,2</sup>, 程铭恩<sup>1</sup>, 彭华胜<sup>1\*</sup>, 彭代银<sup>1\*</sup>

1. 安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230012

2. 安徽省中医药科学院中药资源保护与开发研究所, 安徽 合肥 230012

**摘要:**目的 建立一种快速鉴别何首乌真伪的方法。方法 通过何首乌及其混伪品的 psbA-trnH 基因序列, 寻找 SNP 位点并设计特异性引物, 对来自于不同产地的何首乌及其 3 个同属混伪品进行 PCR 扩增, 优化反应体系条件, 并对此方法进行考察。结果 建立了何首乌特异性 PCR 的方法, 在退火温度 48 °C、循环次数 30 时仅有何首乌能扩增得到 191 bp 的特异性条带, 伪品则无。结论 等位基因特异性 PCR 鉴别何首乌真伪方法简单、可靠。

**关键词:** 何首乌; 棱枝何首乌; 等位基因特异性 PCR; psbA-trnH; 分子鉴定

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)04-0951-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.04.024

## Identification of *Fallopia multiflora* by allele-specific polymerase chain reaction

XIE Hui-qun<sup>1</sup>, ZHAO Yu-jiao<sup>1</sup>, ZHA Liang-ping<sup>1,2</sup>, CHENG Ming-en<sup>1</sup>, PENG Hua-sheng<sup>1</sup>, PENG Dai-yin<sup>1</sup>

1. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China

2. Institute of Traditional Chinese Medicine Resources Protection and Development, Anhui Academy of Chinese Medicine, Hefei 230012, China

**Abstract: Objective** To establish a rapid molecular identification method for *Fallopia multiflora* and its adulterants. **Methods** Based on psbA-trnH sequences of *F. multiflora* and its adulterants, the SNP site was searched and the specific primers were designed. The allele-specific PCR amplification of *F. multiflora* and its adulterants from different producing areas was carried out and the reaction system was optimized. **Results** When the annealing temperature was raised to 48 °C with 30 cycle number, only the template DNA of *F. multiflora* could be amplified to obtain the specific 191 bp band whereas the diagnostic PCRs of the other adulterants were all negative. **Conclusion** It's simple and reliable to identify the authenticity of *F. multiflora* by allele loci specific PCR.

**Key words:** *Fallopia multiflora* Thunb.; *Fallopia multiflora* Thunb. var. *angulata* S. Y. Liu; allele-specific PCR; psbA-trnH; molecular identification

何首乌始载于唐代的《何首乌录》<sup>[1]</sup>, 为临床常用中药材。《中国药典》2015年版分别收载何首乌与制何首乌, 其中何首乌来源于蓼科植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 的干燥块根, 具有解毒截疟、润肠通便等功效<sup>[2-3]</sup>。由于何首乌等蓼属蔓蓼组 (Sect. *Tiniaria*) 植物的独特性, 《Flora of China》将蔓蓼组植物独立为何首乌属 *Fallopia* Adans, 因此何首乌的拉丁学名为 *Fallopia multiflora* (Thunb.) Harald.。长期以来, 不同地区, 尤其是民间用药中何首乌的来源问题一直存在混乱现象<sup>[4]</sup>。市场上也常出现何首乌同属药材冒充何首乌的现象, 如棱枝何首乌 *F. multiflora* Thunb. var.

*angulata* S. Y. Liu、毛脉蓼 *F. multiflora* (Thunb.) Harald. var. *ciliinervis* (Nakai) Yonekura & H. Ohashi、齿叶蓼 *F. denticulata* (Huang) A. J. Li 等近缘种<sup>[5-6]</sup>。传统的中药方法主要是根据药材的性状特征和简单的理化鉴别方法来鉴别, 但很难鉴别一些在形态和化学成分上极其相似的中药材的, 例如何首乌与变种棱枝何首乌, 两者在形态和化学成分上极其相似, 均具有纺锤状或团块状的块根, 且块根中均有异常维管束存在, 传统方法难以鉴别。前人研究表明棱枝何首乌有效成分含量较低, 不能与何首乌混用<sup>[7-8]</sup>。

近年来, 随着 DNA 分子遗传标记技术不断发

收稿日期: 2018-10-31

基金项目: 中央本级重大增减支项目“名贵中药资源可持续利用能力建设”(2060302)

作者简介: 解会群, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药学。E-mail: 13696502887@qq.com

\*通信作者 彭华胜, 教授。E-mail: hspeng@126.com

彭代银, 教授。E-mail: pengdaiyin@163.com

展和广泛的应用,使其在中药材鉴定中弥补了传统鉴别的不足,起到了重要的辅助作用<sup>[9]</sup>。在众多分子标记方法中,应用最广泛的是单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNP)。目前,也有学者利用分子标记技术对人参、三七、鱼腥草、浙贝母等众多药材真伪和基原鉴别<sup>[10-12]</sup>。黎洁文<sup>[13]</sup>基于 ITS2 序列采用等位基因特异性 PCR 技术能鉴别何首乌及其混伪品。但是,由于核基因具有多拷贝的特性,在同属植物鉴别时容易出现基因重叠现象。因此,本研究基于何首乌与混伪品的 psbA-trnH 序列差异的基础上,通过在 3'端倒数第 2 位引入错配碱基的特异性引物,使何首乌出现特异性条带,而伪品无特异性条带的鉴别,建立等位基因特异性 PCR 技术鉴别何首乌真伪。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

SimpliAmp<sup>TM</sup> 96 孔 PCR 仪(Applied Biosystems 公司); MM400 冷冻混合球磨仪(Retsch 公司); GI54TR 立式自动压力蒸汽灭菌器(致微厦门仪器有限公司); Legend Micro 21R 台式高速冷冻离心机(Thermo 公司); NanoPhotometer NP80 超微量分光光度计(Implen 公司); DYY-6C 电泳仪(北京六一生物科技有限公司)和 Alphamager HP 凝胶成像系统(ProteinSimple 公司)。

### 1.2 材料

Pfu Taq DNA 聚合酶、r Taq DNA 聚合酶、DNA Marker、4S Red Plus(生工生物工程(上海)股份有限公司), Ex Taq DNA 聚合酶(TaKaRa 公司); 其他相关试剂均为分子生物学级别,购自生工生物工程(上海)股份有限公司。样品采自安徽、浙江、河南、广西、广东、四川、贵州、湖南、湖北、云南等省,共 77 份材料。所有样品由安徽中医药大学彭华胜教授鉴定,凭证标本存放在安徽中医药大学药学院中药资源中心。样品详细信息见表 1。

## 2 方法

### 2.1 SNP 位点的筛选和特异性引物设计

利用 BioEdit 软件对测序所得和 GenBank 数据库中的何首乌及其同属混伪品的 psbA-trnH 序列进行同源对齐,手动矫正后寻找差异性 SNP 位点,见图 1。通过 Primer Premier 5.0 软件设计出何首乌及其混伪品特异性鉴别引物 FMF-FMR,其引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,序列及 PCR 扩增程序见表 2。

表 1 样品信息表

Table 1 Information of samples

编号	材料名称	拉丁名	产地	数量
1	何首乌	<i>Fallopia multiflora</i>	安徽池州	5
2	何首乌	<i>F. multiflora</i>	安徽铜陵	3
3	何首乌	<i>F. multiflora</i>	安徽合肥	4
4	何首乌	<i>F. multiflora</i>	安徽淮南	1
5	何首乌	<i>F. multiflora</i>	安徽宿州	3
6	何首乌	<i>F. multiflora</i>	安徽滁州	2
7	何首乌	<i>F. multiflora</i>	安徽安庆	1
8	何首乌	<i>F. multiflora</i>	安徽六安	1
9	何首乌	<i>F. multiflora</i>	安徽芜湖	1
10	何首乌	<i>F. multiflora</i>	安徽泾县	2
11	何首乌	<i>F. multiflora</i>	浙江杭州	2
12	何首乌	<i>F. multiflora</i>	江西赣州	2
13	何首乌	<i>F. multiflora</i>	江西南昌	1
14	何首乌	<i>F. multiflora</i>	湖南省	2
15	何首乌	<i>F. multiflora</i>	河南桐柏山	3
16	何首乌	<i>F. multiflora</i>	河南洛阳	1
17	何首乌	<i>F. multiflora</i>	湖北桃坪村	1
18	何首乌	<i>F. multiflora</i>	湖北龙王沟	1
19	何首乌	<i>F. multiflora</i>	甘肃陇南	1
20	何首乌	<i>F. multiflora</i>	陕西蓝田	1
21	何首乌	<i>F. multiflora</i>	广西柳州	1
22	何首乌	<i>F. multiflora</i>	广西贺州	1
23	何首乌	<i>F. multiflora</i>	广东德庆	1
24	何首乌	<i>F. multiflora</i>	贵州正界村	1
25	何首乌	<i>F. multiflora</i>	贵州施秉	2
26	何首乌	<i>F. multiflora</i>	贵州凯里	2
27	何首乌	<i>F. multiflora</i>	云南镇雄	3
28	何首乌	<i>F. multiflora</i>	云南威信	4
29	何首乌	<i>F. multiflora</i>	四川叙永	5
30	何首乌	<i>F. multiflora</i>	四川	1
31	棱枝何首乌	<i>F. multiflora</i> var. <i>angulata</i>	广西东兰	5
32	棱枝何首乌	<i>F. multiflora</i> var. <i>angulata</i>	广西巴马	4
33	棱枝何首乌	<i>F. multiflora</i> var. <i>angulata</i>	云南红河	3
34	棱枝何首乌	<i>F. multiflora</i> var. <i>angulata</i>	广东	1
35	毛脉蓼	<i>F. ciliinervis</i>	陕西	3
36	齿叶蓼	<i>F. denticulata</i>	云南昆明植物研究所	2

### 2.2 基因组总 DNA 的提取和 PCR 扩增条件的确定

称取干燥样品 25~50 mg,置于 2.0 mL 的 EP 管中,按照改良的 2% CTAB 法提取总 DNA<sup>[14]</sup>。取不同样品 DNA,调整质量浓度至 10~100 ng/mL,

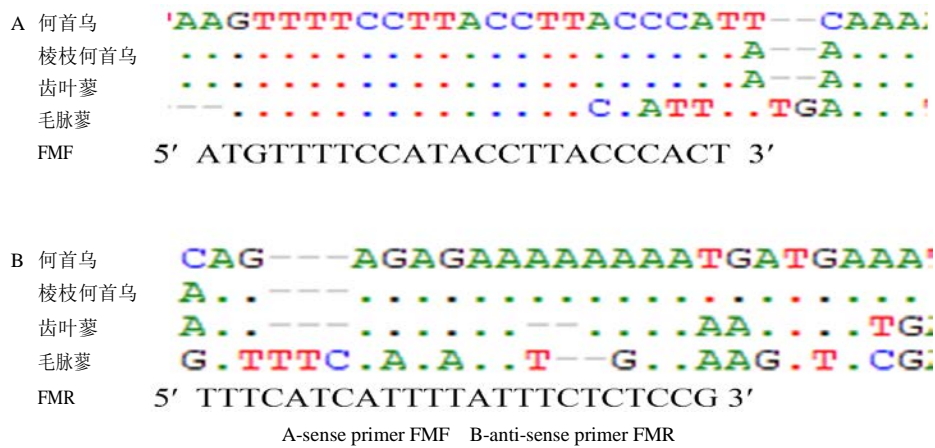


图 1 基于 psbA-trnH 序列对何首乌及其同属混伪品特异性引物设计图

Fig. 1 Species-specific primers designed for identification of *F. multiflora* and its adulterants based on psbA-trnH region sequences

表 2 引物及 PCR 反应条件

Table 2 Primers and PCR reaction conditions

引物	序列 (5'→3')	PCR 反应条件
FHF	TTCCCGCTAGACCTAGCTGC	94 °C 预变性 4 min; 30 个循环 (94 °C 变性 45 s, 58 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 45 s), 72 °C 延伸 7 min
FHA	ACTGCCTTGATCCACTTGGC	
FMF	ATGTTTTCCATACCTTACCCACT	95 °C 预变性 1 min; 30 个循环 (95 °C 变性 5 s, 48 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s); 72 °C 延伸 7 min
FMR	TTTCATCATTTTTATTCTCTCCG	

用 psbA-trnH 序列的上下游引物 FHS 和 FHA<sup>[15]</sup> 进行 PCR 反应以检测模板 DNA 质量。PCR 反应体系 (总体积为 25 μL) 组成: 10×PCR buffer 2.5 μL、2.5 mmol/L dNTPs 2 μL, 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 2 μL, 引物 FHS 1 μL, 引物 FHA 1 μL, Ex Taq DNA 聚合酶 0.125 μL, DNA 模板 1 μL, 灭菌蒸馏水补足至 25 μL。反应在 SimpliAmp™ 96 孔 PCR 仪上进行, 反应条件见表 2。反应结束后, 取 PCR 扩增产物 3 μL, 加入 2 μL 6×loading buffer, 混匀后于 4S Red Plu 染色的 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, Alphamager HP 凝胶成像系统观察成像。

### 2.3 何首乌及其同属混伪品位点特异性 PCR 鉴别

利用 FMF-FMR 特异性引物对不同样品进行特异性 PCR 反应, PCR 反应体系 (总体积为 25 μL) 组成: 10×PCR buffer 2.5 μL、2.5 mmol/L dNTPs 0.5 μL, 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 1.5 μL, 引物 FMF 1 μL, 引物 FMR 1 μL, r Taq DNA 聚合酶 0.5 μL, DNA 模板 (10~100 ng) 1 μL, 灭菌蒸馏水补足至 25 μL。反应条件见表 2。用 2.5% 琼脂糖凝胶电泳检测特异性 PCR 扩增产物, 在 100 V 电压的条件下电泳约 30 min, 然后利用凝胶成像分析仪拍照, 若电泳结

果出现 191 bp 的 DNA 条带, 则待测样品为何首乌, 若电泳图上未出现 191 bp 的 DNA 条带, 则待测样品则为何首乌混伪品。本实验分别考察退火温度、PCR 循环数、引物浓度、Taq 酶种类、MgCl<sub>2</sub> 用量对何首乌及其混伪品鉴别结果的影响, 以确定最优反应体系和条件。

## 3 结果与分析

### 3.1 等位基因特异 PCR 引物设计

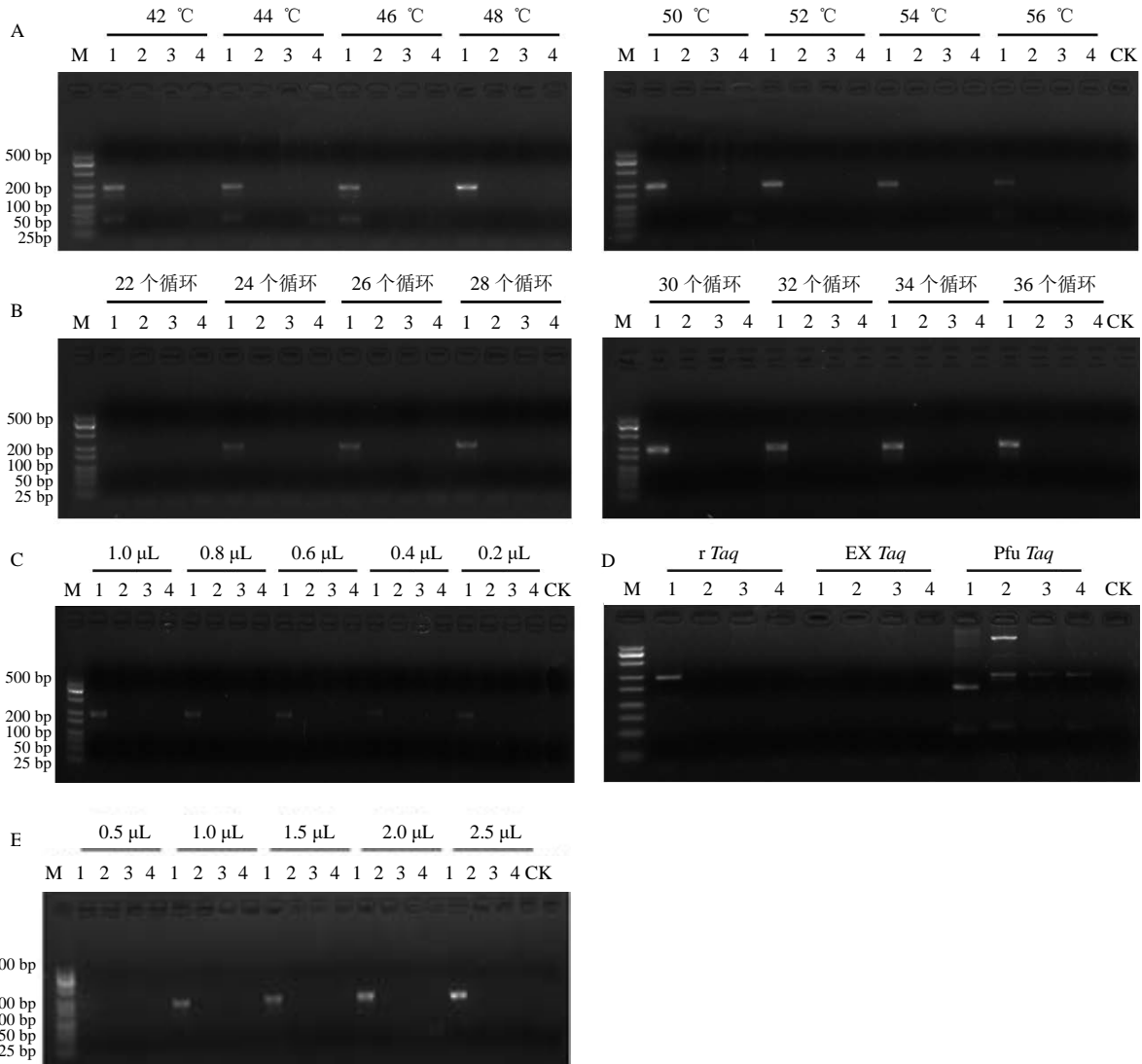
对何首乌及其同属混伪品 77 个样品的 psbA-trnH 序列分别进行分析表明 psbA-trnH 存在 3 个 SNP 位点。第 165 位碱基为 T, 第 236 位碱基为 A 和第 311 位为 C 的为何首乌特有 SNP 位点。利用这 3 个 SNP 位点, 设计何首乌及同属混伪品等位基因特异性 PCR 引物, 设置正、反向引物的 3' 端与 SNP 位点完全匹配, 并将 3' 端的倒数第 2 位引入错配碱基<sup>[16]</sup>。利用设计的引物对何首乌及其同属混伪品进行 AS-PCR 扩增, 得到长度为 191 bp 的特异条带。

### 3.2 等位基因特异 PCR 扩增反应条件优化

在同一仪器同一时间对退火温度、循环次数、引物浓度、MgCl<sub>2</sub> 的用量和不同种类的 Taq 酶 5 个

因素进行等位基因特异 PCR 扩增反应条件优化, 以确定最佳的反应条件<sup>[17]</sup>。本实验考察了 8 个退火温度, 分别为 42、44、46、48、50、52、54、56 °C, 发现退火温度在 42~56 °C 仅有何首乌扩增出特异条带, 伪品则无。但是, 当退火温度在 42~46 °C 和 56 °C 时可见非特异性条带, 见图 2-A; 循环次数考察了 8 个, 分别为 22、24、26、28、30、32、34、36, 当循环次数为 24~36 时, 仅有何首乌扩增出特异条带, 伪品则无, 循环次数低于 24 时, 正品与伪品均无条带, 见图 2-B; 考察了 5 个不同引物量, 分别为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 μL, 结果

发现引物量在 0.2~1.0 μL 仅有何首乌扩增出特异条带, 伪品则无。当 FMF/FMR 为 1 μL, 何首乌的条带最亮, 见图 2-C; 在所选的低保真 r Taq DNA 聚合酶、中度保真 Ex Taq DNA 聚合酶和高保真 Pfu Taq DNA 聚合酶中, 只有 r Taq DNA 聚合酶能实现何首乌与混伪品之间的鉴别, 高保真 Pfu Taq DNA 聚合酶进行鉴别时出现假阳性条带, 见图 2-D。这可能与高保真酶可以纠正 3'→5' 外切酶错配的碱基有关, 导致实验中特异性引物 3' 端错配的碱基被酶切, 因此, 扩增时表现与常规 PCR 一致<sup>[18]</sup>。另外, 还考察了 MgCl<sub>2</sub> 用量, 分别为 0.5、1.0、1.5、2.0、



1-何首乌(安徽铜陵) 2-棱枝何首乌(广西东兰) 3-齿叶蓼(云南) 4-毛脉蓼(陕西) A-退火温度 B-循环次数 C-引物量 D-不同种类 Taq DNA 聚合酶 E-MgCl<sub>2</sub> 用量 M-Marker CK-阴性对照

1-*F. multiflora* (Tongling City, Anhui Province) 2-*F. multiflora* var. *angulata* (Donglan County, Guangxi Province) 3-*F. denticulata* (Yunnan Province) 4-*F. cilinervis* (Shaanxi Province) A-annealing temperature B-cycle times C-quantity of primer D-different Taq DNA polymerases E-MgCl<sub>2</sub> amount M-Marker CK-negative control

图 2 不同因素对何首乌及其混伪品等位基因特异 PCR 鉴别的影响

Fig. 2 Effects of different influence factors on multiplex allele-specific PCR authentication of *F. multiflora* and its adulterants

2.5  $\mu\text{L}$ , 结果发现  $\text{MgCl}_2$  用量在小于 1.0  $\mu\text{L}$  时, 何首乌及伪品都无特异性条带, 只有大于 1.0  $\mu\text{L}$  时, 何首乌有异性条带, 伪品则无, 见图 2-E, 鉴于  $\text{MgCl}_2$  用量对何首乌鉴别影响不大和出于实验成本考虑, 故选择  $\text{MgCl}_2$  用量为 1.5  $\mu\text{L}$ 。

### 3.3 准确性考察

采用优化后的等位基因特异性 PCR 反应条件, 对 77 份样品进行等位基因特异性 PCR 扩增, 结果仅有何首乌出现 191 bp 的特异性条带, 其他 3 种同属混伪品均无假阳性和假阴性结果出现。部分结果见图 3。

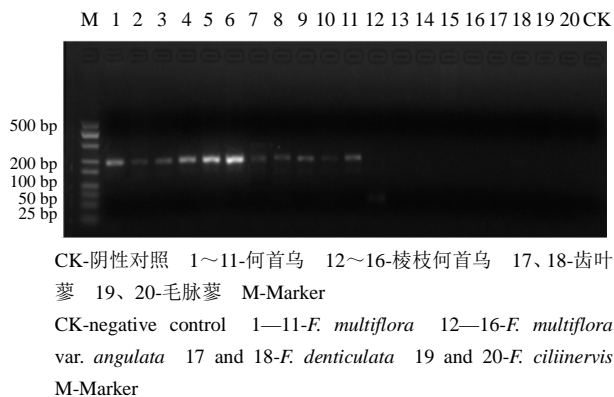


图 3 何首乌及其同属混伪品等位基因特异性 PCR 鉴别  
Fig. 3 Allele-specific PCR authentication of *F. multiflora* and its adulterants

### 3.4 检出限考察

按照优化后的 PCR 反应条件, 对不同质量浓度的模板 DNA 进行特异性 PCR。DNA 模板质量浓度在 10~100 ng/mL 时, 只有何首乌能扩增出 191 bp 的特异性条带, 且条带亮度随 DNA 模板浓度降低而减弱, 模板 DNA 检出限达 10 ng/mL, 见图 4。

## 4 讨论

何首乌属在我国分布有 7 个种和 2 个变种, 其中只有何首乌、棱枝何首乌、毛脉蓼和齿叶蓼属于多年生草本且具有肥大的块根或根状茎。它们的外观性状及理化特征相似, 传统鉴别方法通过眼观、口尝、鼻闻等具有主观性, 难以鉴别。本研究选取了我国安徽、浙江、河南、广西、广东、四川、贵州、湖南、湖北、云南、江西、陕西、甘肃共 13 个省 59 个何首乌样品及 18 个混伪品, 采集地具有一定的代表性。

郑传进等<sup>[19]</sup>基于 *trnL-trnF* 序列运用 PCR-RFLP 技术能区分何首乌与混伪品, 但是整个过程耗时, 成本高。而等位基因特异性 PCR 鉴别中药材具

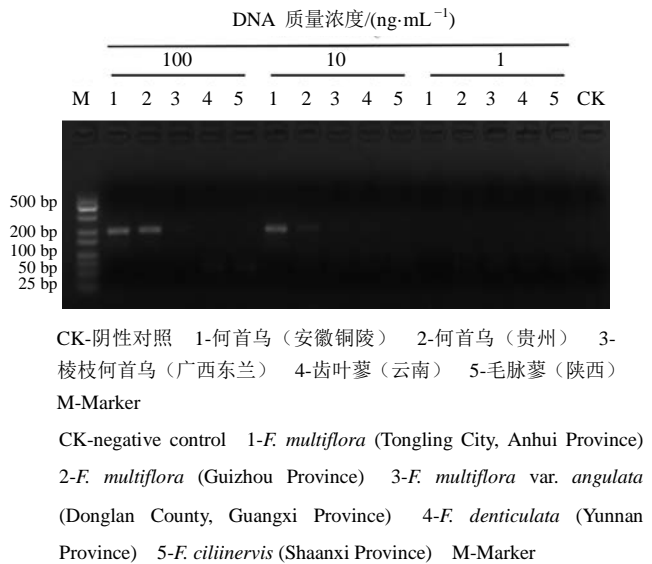


图 4 不同 DNA 质量浓度对等位基因特异性 PCR 的影响  
Fig. 4 Allele-specific PCR consequence by different DNA concentrations

有简单又切实可行的优势, 能有效鉴别何首乌真伪。*psbA-trnH* DNA 序列具有种内高度保守、种间足够变异的特点<sup>[20-23]</sup>。本研究通过分析何首乌、棱枝何首乌的 *psbA-trnH* 序列间的差异 DNA 序列, 多次尝试设计用以鉴别何首乌的引物, 但其难度很大, 原因在于两者序列极其相似。经过不断尝试后成功设计出了特异性产物, 即在 3'端引入错配的碱基的方法设计特异性引物。同时, AS-PCR 扩增的产物可直接用琼脂糖凝胶鉴别, 不需要测序。此方法简单, 方便, 时间短。

影响等位基因特异性 PCR 的因素很多, 其中, 最重要的是退火温度、引物浓度和 DNA 模板量, 引物与模板和引物与退火温度配比不好会造成非特异性扩增, 出现假阳性<sup>[23]</sup>。因此, 本研究不仅对何首乌的特异性 PCR 鉴别方法进行了各因素的优化实验和系统的考察, 确定了最佳的 PCR 扩增反应体系, 并且本实验所有的药材均经严格的形态鉴定, 何首乌正品和伪品的样品分类都与特异性 PCR 鉴定结果完全一致, 进一步验证了该鉴别引物用于何首乌药材真伪鉴定的可靠性和稳定性。

### 参考文献

[1] 唐慎微. 重修政和经史证类备用本草 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1957.  
[2] 中国药典 [S]. 一部. 2015.  
[3] 任红微, 魏静, 高秀梅, 等. 何首乌及其主要化学成分

- 分药理作用及机制研究进展 [J]. 药物评价研究, 2018, 41(7): 1357-1362.
- [4] 谢宗万. 中药材品种论述 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1990.
- [5] 葛李薇, 武智聪, 张 勉, 等. 何首乌及其同属混伪品的鉴别研究 [J]. 中国野生植物资源, 2011, 30(3): 64-68.
- [6] 刘 越, 罗定强, 王国海, 等. 何首乌药材及常见伪品的真伪鉴别方法研究 [J]. 中药材, 2017, 40(6): 1305-1308.
- [7] Yan H J, Fang Z J, Zhang H Y, *et al.* *Fallopia multiflora* var. *angulata*, a new combination in the Polygonaceae from China [J]. *Novon*, 2011, 21: 388-391.
- [8] 朱 华, 黄叔芳, 周燕华, 等. HPLC 法测定广西不同产地何首乌中二苯乙烯苷的含量 [J]. 广西中医药, 2006, 29(6): 53-54.
- [9] 崔占虎, 龙 平, 王颖莉, 等. DNA 分子标记技术在中成药鉴定中的应用与展望 [J]. 中药材, 2015, 38(1): 188-192.
- [10] 蒋 超, 罗宇琴, 袁 媛, 等. 多重位点特异性 PCR 鉴别人参、三七、西洋参掺杂 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(7): 1319-1323.
- [11] 魏艺聪, 袁 媛, 陈建雄, 等. 快速 PCR 法鉴别鱼腥草与百部还魂的方法研究 [J]. 中草药, 2016, 47(12): 2163-2166.
- [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] 黎洁文. 基于 ITS2 序列分析的何首乌 PCR-RFLP 和 AS-PCR 的分子鉴别研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2015.
- [14] 严 萍, 赵树进. 中药何首乌总基因组 DNA 的提取 [J]. 时珍国医国药, 2007, 18(3): 607-609.
- [15] 白明明, 孙小芹, 郭建林, 等. 基于 psbA-trnH 分析的何首乌野生居群遗传多样性 [J]. 植物资源与环境学报, 2012, 21(2): 36-44.
- [16] Wang H T, Kim M K, Kim Y J, *et al.* Molecular authentication of the oriental medicines *Pericarpium Citri Reticulatae* and *Citri Unshius Pericarpium* using SNP markers [J]. *Gene*, 2012, 494(2012): 92-95.
- [17] 马厚勋, 牛永红, 李章勇, 等. 等位基因特异性引物 PCR 技术及其应用研究 [J]. 生物技术, 2005, 15(1): 15-18.
- [18] 陈琳玲, 张 佳, 彭翠英, 等. DNA 聚合酶高保真机理的新发现及其在 SNP 分析中的应用 [J]. 遗传, 2005, 27(2): 279-283.
- [19] 郑传进, 生书晶, 赵树进. 基于 trnL-trnF 序列分析的何首乌 PCR-RFLP 分子鉴别 [J]. 中药材, 2012, 35(4): 543-547.
- [20] 芮 军, 赵树进, 郑传进. 何首乌及其混伪品序列相关扩增多态性反应体系的优化 [J]. 时珍国医国药, 2009, 20(5): 1137-1139.
- [21] 杨慧洁, 杨世海, 张淑丽, 等. 药用植物 DNA 条形码研究进展 [J]. 中草药, 2014, 45(18): 2581-2587.
- [22] 张宏意, 袁林林, 饶秋红, 等. 不同产地何首乌叶绿体 psbA-trnH 基因序列分析 [J]. 中草药, 2018, 49(5): 1146-1149.
- [23] 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.