

[24] Zhu M L, Jiang Y, Cui B, *et al.* Cadmium accumulation in *Panax notoginseng*: levels, affecting factors and the non-carcinogenic health risk[J]. *Environ Geochem Hlth*, 2016, 38(2): 423-435

[25] WM/T2-2004, 药用植物及制剂外经贸绿色行业标准[S].

[26] De F S, Camoirano A, Bagnasco M, *et al.* Estimates of the chromium (VI) reducing capacity in human body compartments as a mechanism for attenuating its potential toxicity and carcinogenicity[J]. *Carcinogenesis*, 1997, 18(3): 531-537.

[27] Hallenbeck W H. Quantitative risk assessment for environmental and occupational health[M]. Chelsea: Levis, 1993.

[28] Cao H, Zhu H, Jia Y, *et al.* Heavy metals in food crops and the associated potential for combined health risk due to interactions between metals[J]. *Hum Ecol Risk Assess*, 2009, 17(3): 700-711.

[29] Zhu M, Jiang Y, Cui B, *et al.* Determination of the heavy metal levels in *Panax notoginseng* and the implications for human health risk assessment[J]. *Hum Ecol Risk Assess*, 2014, 21(5): 1218-1229.

DNA 提取 4 种中药材方法的筛选

马敏敏^{1,2}, 何芳^{3#}, 杨志刚⁴, 蒋丹⁵, 仵缘^{1,2}, 黄耀江^{1,2*}
(1. 中央民族大学生命与环境科学学院, 北京 100081; 2. 北京市食品环境与健康工程技术研究中心, 北京 100081; 3. 内蒙古兴安盟医学会, 内蒙古 乌兰浩特 137400; 4. 内蒙古包钢稀土[集团]高科技股份有限公司, 内蒙古 包头 014000; 5. 辽宁出入境检验检疫局, 辽宁 大连 116001)

摘要:目的 筛选龙胆 *Gentiana scabra* Bunge、锁阳 *Cynomorium songaricum* Rupr、天花粉 *Trichosanthes kirilowii* Maxim.、菟丝子 *Cuscuta chinensis* Lam. 的 DNA 提取方法。**方法** 通过试剂盒法、SDS 法、高盐低 pH 法、CTAB 法以及改良 PVP 法, 对 4 种中药材 DNA 进行提取。紫外分光光度、琼脂糖凝胶电泳和 PCR 扩增进行检测, SPSS20.0 软件进行统计学分析。**结果** 改良 PVP 法所得 4 种中药材 DNA 的得率均较高。SDS 法和改良 PVP 法提取的 DNA 条带较清晰, 高盐低 pH 法提取者呈弥散状态, 试剂盒法和 CTAB 法提取者几乎看不到条带。试剂盒法和改良 PVP 法提取的 DNA 可完全扩增 ITS2 和 psbA-trnH 序列, 而其他 3 种方法未能完全扩增。**结论** 改良 PVP 法高效简单, 最适合提取这 4 种中药材 DNA。

关键词: 龙胆; 锁阳; 天花粉; 菟丝子; DNA 提取

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2016)08-1776-06
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.08.024

Screening of DNA extraction methods of four Chinese medicinal materials

MA Min-min^{1,2}, HE Fang^{3#}, YANG Zhi-gang⁴, JIANG Dan⁵, WU Yuan^{1,2}, HUANG Yao-jiang^{1,2*}

(1. College of Life and Environmental Science, Minzu University of China, Beijing 100081, China; 2. Beijing Municipal Engineering Research Center of Food Environment and Public Health, Beijing 100081, China; 3. Medical Association of Hinggan League in Inner Mongolia, Ulanhot 137400, China; 4. Inner Mongolia Baogang Rare Earth [Group] Hi-tech Co., Ltd., Baotou 014000, China; 5. Liaoning Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Dalian 116001, China)

收稿日期: 2016-06-25
基金项目: 教育部新世纪优秀人才项目 (NCET-11-0842); 中央民族大学学术团队建设项目 (2015MDTD25C, 2015MDTD13C); 筹推进一流大学和一流学科建设经费 (10301-0150200604)
作者简介: 马敏敏 (1992—), 女 (回族), 硕士生, 研究方向为生物化学与分子生物学。Tel: 18811303965, E-mail: mm9217@163.com
#共同第一作者: 何芳 (1971—), 女, 副主任医师, 研究方向为环境健康。Tel: 15904820566, E-mail: 529168889@qq.com
***通信作者:** 黄耀江 (1972—), 男, 博士, 教授, 研究方向为生物化学与分子生物学、食品安全与环境健康。E-mail: yaojiangh@hotmail.com

ABSTRACT: AIM To screen the DNA extraction methods of *Gentiana scabra* Bunge, *Cynomorium songaricum* Rupr, *Trichosanthes kirilowii* Maxim. and *Cuscuta chinensis* Lam. . **METHODS** The DNA of four Chinese medicinal materials was extracted by kit, SDS, high-salt low-pH, CTAB and modified PVP methods. Ultraviolet spectrophotometry, agarose gel electrophoresis and PCR amplification were adopted in the detection, then the statistical analysis was made by SPSS20.0. **RESULTS** The DNA yields of four Chinese medicinal materials obtained by modified PVP method were relatively high. The DNA bands extracted by SDS and modified PVP methods were relative clear, while those extracted by high-salt low-pH method showed diffuse status, and almost no bands were found in the DNA extracted by kit and CTAB methods. The DNA extracted by kit and modified PVP methods could completely amplify ITS2 and psbA-trnH sequences. **CONCLUSION** Modified PVP method is effective and simple, which is the most suitable for extracting DNA of these four Chinese medicinal materials.

KEY WORDS: *Gentiana scabra* Bunge; *Cynomorium songaricum* Rupr; *Trichosanthes kirilowii* Maxim. ; *Cuscuta chinensis* Lam. ; DNA extraction

随着中药事业的不断发展,对药用植物的需求量越来越大,但由于利益驱动和资源枯竭的双重影响,药材市场上假药肆虐,伪品代替真品^[1]。药材使用不正确时易对人体健康造成严重威胁,危害消费者的利益以及正常进出口贸易,故对药材真伪的鉴别将成为提高其质量和保障进出口的重要课题。

传统的中药材鉴定方法有性状鉴定、显微鉴定、理化分析鉴定等,在相关质量研究中发挥了重要作用^[2],但大部分中药材后期加工成粉末或饮片后,传统方法将难以鉴别,存在一定局限性^[3]。分子生物学方法对基因组序列差异进行比较研究,可为中药材得分类和鉴定提供本质依据,其中DNA条形码是分子生物学鉴定的最新发展,能快速准确地识别和鉴定物种。2009年,陈士林等通过对6 000份药用植物样本进行DNA条形码序列筛选,建立了以ITS2为核心,psbA-trnH为补充序列的药用植物条形码鉴定体系^[4-8]。

物种鉴定过程以ITS2、psbA-trnH等为备选条码基因,提取样品DNA后,经过PCR扩增测序,根据序列分析结果对样品进行物种鉴定,筛选合适的条码基因^[9-13],这两段序列的扩增可有效的反映所提取DNA的质量。此外,其作为备选条码基因,对于本实验所选的4种中药材都具有物种特异性和通用性。本研究未采用文献中的通用引物,主要将重点放在DNA条形码鉴定中引物的特异性,在后续特异性引物对中药材的鉴定中具有重要意义。

DNA提取是开展中药材DNA分子鉴定的首要环节,但市售中药材不同于幼嫩新鲜的材料,其经过复杂的加工及贮藏运输过程后DNA降解严重,故对其完整提取最为关键。本实验选取清热泻火中

药龙胆和天花粉,以及补肾益精中药锁阳和菟丝子作为实验对象,其分别以根、茎、种子等不同部位入药,均质地较硬,而且富含较多的多糖、酚类等物质,可较好地代表炮制和成分都较为复杂的中药材,然后通过试剂盒法、SDS法、高盐低pH法、CTAB法以及改良PVP法以筛选最佳DNA提取方法。

1 材料与仪器

1.1 材料 龙胆 *Gentiana scabra* Bunge、锁阳 *Cynomorium songaricum* Rupr、天花粉 *Trichosanthes kirilowii* Maxim.、菟丝子 *Cuscuta chinensis* Lam. 均由辽宁省出入境检验检疫局提供,均由该部门有关专家鉴定为正品。

1.2 主要仪器 DYY-11型电泳仪(北京市六一仪器厂);GelDoc XR+凝胶成像系、My cyclor PCR仪(美国Bio-Rad公司);TGL-20M高速台式冷冻离心机(湘仪离心机仪器有限公司);梯度PCR仪(德国Eppendorf公司);Nano Drop 2000紫外可见光光度计(美国赛默飞公司)。

1.3 主要试剂 DNA Marker I、DNA Marker II购于无根生化科技北京有限公司,CTAB、PVP40、乙酸铵、Tris碱、SDS、 β -巯基乙醇等提取DNA所用试剂以及Taq DNA Polymerase、dNTP Mixture、PCR buffer(含MgCl₂)等PCR试剂均购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司。

2 方法

2.1 DNA的提取 分别采用试剂盒法、SDS法、高盐低pH值法、CTAB法以及改良PVP法提取4种中药材的DNA。每种方法重复3次。

2.1.1 试剂盒法 新型植物基因组DNA提取试剂盒(离心柱型)购自天根生化科技北京有限公司。

DNA 提取过程依照说明书进行。

2.1.2 SDS 法 取药材适量，去除外源污染，加入液氮迅速研磨至粉末状。参照陈莉等^[14]报道的方法提取，并作适当改良。

2.1.3 高盐低 pH 值法 取药材适量，去除外源污染，加入液氮迅速研磨至粉末状。参照罗焜等^[15]报道的方法提取，并作适当改良。

2.1.4 CTAB 法 取药材适量，去除外源污染，加入液氮迅速研磨至粉末状。参照段中岗等^[16]报道的方法提取，并作适当改良。

2.1.5 改良 PVP 法 照马文丽等^[17]报道的方法，并作适当改良^[18-21]。取药材适量，70% 乙醇擦洗表面，无水乙醇浸泡 5 min 后脱水，去除外源污染，将药材切成小薄片，放入研钵中，加入液氮迅速研磨至粉末状。取 0.1 g，置于预冷离心管中，加 1 mL PVP 提取缓冲液（用前加 β-巯基乙醇至终浓度为 3%），65 ℃ 水浴 50 min，再加入 20 mg PVP 粉末和 500 μL 乙酸铵溶液，PVP 浓度为 3%，-20 ℃ 静置 20 min，离心，加预冷异丙醇，

-20 ℃ 静置沉淀 20 min，离心，弃上清液，70% 乙醇清洗两次。沉淀室温自然干燥后，加 60 μL TE 缓冲液或 dH₂O 定容，-20 ℃ 贮存备用。

2.2 DNA 品质的鉴定

2.2.1 DNA 浓度和纯度 取 DNA 提取液 1 μL，Nano Drop 2000 紫外分光光度计进行检测，分别测定 DNA 浓度、A₂₆₀ 及 A₂₈₀ 吸收值。

2.2.2 电泳检测 取 DNA 溶液 10 μL，上样，通过 1% 琼脂糖凝胶，110 V 电泳检测，凝胶成像系统观察并拍照。

2.2.3 PCR 扩增检测 在 NCBI 网站上查找 4 种中药材的 ITS2 序列和 psbA-trnH 序列^[22]，在 Primer3 设计引物（生工生物工程上海股份有限公司合成）。实验采用 50 μL 扩增体系，包括 Premix 11 μL，上、下游引物各 2.5 μL，DNA 模板 2 μL，加灭菌双蒸水 32 μL。反应体系中各试剂的用量根据反应体系总体积进行适当调整。PCR 反应条件见表 1，其产物用 1% 琼脂糖凝胶 110 V 电泳，凝胶成像系统观察并拍照。

表 1 反应条件

Tab. 1 Reaction conditions

药材	引物名称	反应条件	条带/bp
龙胆	ITS2-F1	95 ℃ 5 min; 95 ℃ 30 s, 54 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min, 30 个循环; 72 ℃ 10 min	123
	ITS2-R1		
	psbA-trnH-F1	95 ℃ 5 min; 95 ℃ 30 s, 54 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min, 30 个循环; 72 ℃ 10 min	186
	psbA-trnH-R1		
锁阳	ITS2-F2	95 ℃ 4 min; 95 ℃ 30 s, 56 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min, 30 个循环; 72 ℃ 10 min	165
	ITS2-R2		
	psbA-trnH-F2	95 ℃ 4 min; 95 ℃ 30 s, 56 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min, 30 个循环; 72 ℃ 10 min	221
	psbA-trnH-R2		
天花粉	ITS2-F3	95 ℃ 5 min; 95 ℃ 30 s, 56 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min, 30 个循环; 72 ℃ 10 min	160
	ITS2-R3		
	psbA-trnH-F3	95 ℃ 4 min; 95 ℃ 30 s, 56 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min, 30 个循环; 72 ℃ 10 min	203
	psbA-trnH-R3		
菟丝子	ITS2-F4	95 ℃ 5 min; 95 ℃ 30 s, 54 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min, 30 个循环; 72 ℃ 10 min	170
	ITS2-R4		
	psbA-trnH-F4	95 ℃ 4 min; 95 ℃ 30 s, 54 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min, 30 个循环; 72 ℃ 10 min	154
	psbA-trnH-R4		

2.3 统计学方法 采用 SPSS20.0 软件进行统计学处理，以 3 次提取 DNA 得率的平均值为实际得率，多组间比较采用单因素方差分析，当 $P < 0.05$ 时，采用 LSD-t 和 SNK (s) 检验作组内两两比较，以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 龙胆 DNA 的浓度、纯度及得率 由表 2 可知，高盐低 pH 法、CTAB 法和改良 PVP 法提取 DNA 的 A_{260}/A_{280} 在 1.7 ~ 1.9 之间，表明 DNA 质量

较好；试剂盒法小于 1.7，表明 DNA 被蛋白质、多糖和酚类等物质污染；SDS 法大于 1.9，表明 DNA 被 RNA 污染。SDS 法和改良 PVP 法 DNA 得率均显著高于其他方法，但前者 A_{260}/A_{280} 较大，故改良 PVP 法提取龙胆 DNA 最为理想。

3.2 锁阳 DNA 的浓度、纯度及得率 由表 2 可知，5 种方法提取锁阳 DNA 的 A_{260}/A_{280} 值均低于 1.7，表明 DNA 被蛋白质、多糖和酚类等物质污染，其中 CTAB 法 DNA 得率最高，改良 PVP 法

次之。

3.3 天花粉 DNA 的浓度、纯度及得率 由表 2 可知, SDS 法和改良 PVP 法提取 DNA 的 A_{260}/A_{280} 均在 1.7 ~ 1.9 之间, 表明 DNA 质量较好; 试剂盒法、高盐低 pH 值法和 CTAB 法均小于 1.7, 表明 DNA 被蛋白质、多糖和酚类等物质污染。改良 PVP 法、CTAB 法及 SDS 法 DNA 得率显著高于其他方法, 但 CTAB 法 A_{260}/A_{280} 较小, 故改良 PVP 法和 SDS 法适合提取天花粉 DNA。

3.4 菟丝子 DNA 的浓度、纯度及得率 由表 2 可知, 试剂盒法、高盐低 pH 值法和改良 PVP 法提取 DNA 的 A_{260}/A_{280} 均在 1.7 ~ 1.9 之间, 表明 DNA 质量较好; CTAB 法小于 1.7, 表明 DNA 被蛋白质、多糖和酚类等物质污染; SDS 法大于 1.9, 表明 DNA 被 RNA 污染。改良 PVP 法、SDS 法、CTAB 法 DNA 得率均显著高于其他方法, 但 CTAB 法 A_{260}/A_{280} 较小, 而 SDS 法 A_{260}/A_{280} 较大, 故改良 PVP 法提取菟丝子 DNA 最为理想。

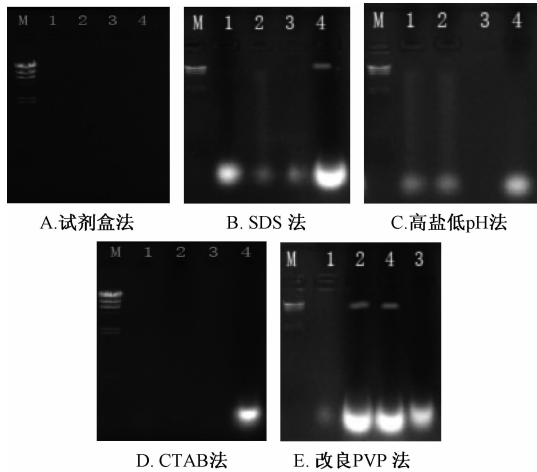
表 2 DNA 浓度和得率

Tab. 2 Concentrations and yields of DNA

药材	提取方法	A_{260}/A_{280}	DNA/ ($\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$)	得率/ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
龙胆	试剂盒法	1.45	35.3	21.18
	SDS 法	2.12	3 029.4	1 817.64
	高盐低 pH 法	1.87	970.8	582.48
	CTAB 法	1.79	381.9	229.14
	改良 PVP 法	1.62	3 129.6	1 877.76
锁阳	试剂盒法	0.80	29.1	17.46
	SDS 法	0.67	375.3	225.18
	高盐低 pH 法	0.80	226.8	136.08
	CTAB 法	1.11	2 496.5	1 497.90
	改良 PVP 法	1.39	811.2	486.72
天花粉	试剂盒法	1.31	7.6	4.56
	SDS 法	1.74	257.1	154.26
	高盐低 pH 法	1.47	96.5	57.90
	CTAB 法	1.47	302.0	181.20
	改良 PVP 法	1.75	93.2	155.92
菟丝子	试剂盒法	1.72	201.1	120.66
	SDS 法	2.11	3 004.5	1 802.70
	高盐低 pH 法	1.86	1 335.3	801.18
	CTAB 法	1.27	3 439.9	2 063.94
	改良 PVP 法	1.84	2 083.4	1 250.04

3.5 DNA 电泳检测 由图 1 可知, 4 种中药材的 DNA 均存在不同程度的降解。其中, 改良 PVP 法(图 1E)提取龙胆、锁阳和菟丝子的 DNA 电泳图及 SDS 法(图 1B)提取菟丝子的 DNA 电泳图均能看到较清晰的主带, 但在下方均有明亮的条带, 表明 DNA 存在部分降解, 并存在一定的杂质; 高

盐低 pH 值法(图 1C)提取龙胆和锁阳的 DNA 电泳图看不到明显的主带, 在泳道中呈弥散状态, 说明许多大片段 DNA 已降解成小片段 DNA; 试剂盒法(图 1A)和 CTAB 法(图 1D)提取 DNA 基本看不到条带, 表明 DNA 浓度太低或已发生严重降解。综上所述, 改良 PVP 法是中药材 DNA 提取的最佳方法。



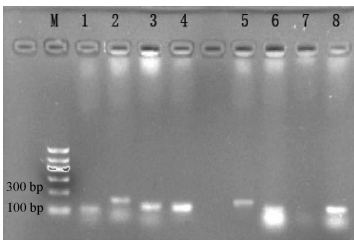
M. DNA marker (9 416 bp) 1. 龙胆 2. 锁阳 3. 天花粉 4. 菟丝子
M. DNA marker (9 416 bp) 1. *G. scabra* 2. *C. songaricum* 3. *T. kirilowii* 4. *C. chinensis*

图 1 DNA 电泳图

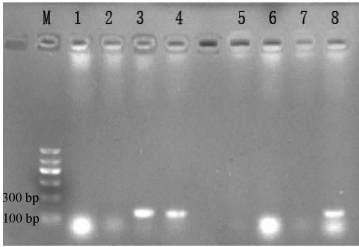
Fig. 1 DNA electrophoretograms

3.6 PCR 扩增 采用候选条形码基因 ITS2 和 psbA-trnH 序列的引物, 对 5 种方法所提取的 DNA 进行扩增, 见图 2。由图可知, 试剂盒法和改良 PVP 法(图 2A、2E)可以成功扩增出条带, 前者所提取 DNA 条带虽模糊不清, 但其 PCR 扩增结果依然清晰明亮, 说明 DNA 电泳检测结果不能直接影响 PCR 扩增结果; 其他 3 种方法均未能 100% 扩增出条带, 并且 CTAB 法(图 2D)扩增出的条带较暗, 表明 DNA 质量较低, 无法满足后续实验要求。

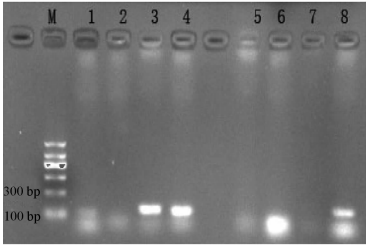
改良 PVP 法所提取中药材 DNA 的杂质较少, 降解程度较低, 浓度和质量都高于其他方法。电泳图显示, 改良 PVP 法可得到较为完整的总 DNA 条带, 而其他方法 DNA 较少或发生降解, 在泳道中呈弥散状。在后续 PCR 扩增试验中, 试剂盒法和改良 PVP 法所提取的 DNA 可 100% 扩增条形码基因的序列, 而其他方法不能满足后续实验要求。因此, 对这 4 种中药材而言, 改良 PVP 法是提取 DNA 的最佳方法。



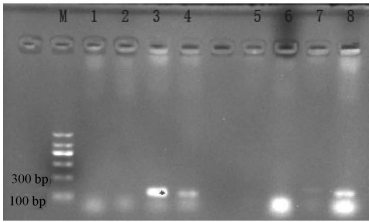
A. 试剂盒法



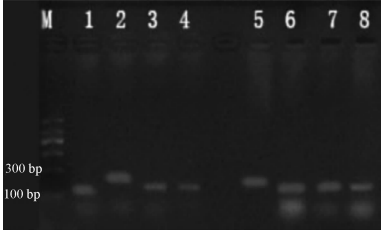
B. SDS 法



C. 高盐低pH法



D. CTAB 法



E. 改良PVP法

注：1~4 为 ITS2 引物扩增，5~8 为 psbA-trnH 引物扩增
M: DNA marker 1、5. 龙胆 2、6. 锁阳 3、7. 天花粉
4、8. 菟丝子
M: DNA marker 1 and 5. *G. scabra* 2 and 6. *C. songaricum*
3 and 7. *T. kirilowii* 4 and 8. *C. chinensis*

图 2 PCR 扩增图

Fig. 2 PCR amplification images

4 讨论

采用分子生物学方法鉴定物种时，最关键的是高质量 DNA，以保证其可用于后续的试验。中药

材加工成饮片或粉末后，DNA 降解比较严重，故需要探索以短 DNA 模板来进行有效扩增的标记基因，本研究中，各物种的 ITS2 和 psbA-trnH 基因扩增长度处于 100~300 bp 之间，长度适宜，而且种间差异明显，能够有效扩增并进行种类区分。

对提取的中药材总 DNA 进行凝胶电泳条带检测时，5 种方法所提取龙胆的 DNA 都不能看到清晰条带，甚至也无法看到弥散条带，主要原因是所用的中药材已经过复杂的加工工艺，其 DNA 已发生严重降解。电泳图表明，试剂盒法和改良 PVP 法所提取的 DNA 基本可以全部得到扩增，而其他方法未能全部扩增，可能是 DNA 中杂质对 Taq 酶活性的影响较大，从而无法完全扩增出条带，但试剂盒法所提取 DNA 的得率和纯度都偏低，不能将其中酚类等次生代谢产物完全去除，对后续实验有一定的影响。目前，试剂盒法操作简便，应用广泛，但其一般针对较为新鲜，而且含多糖、酚类较少的材料，对于炮制及成分都很复杂的中药材则不适用，而且该方法成本较高。改良 PVP 法虽然步骤较多，但成本低廉，更适合于中药材的 DNA 提取。

中药材的形成过程十分复杂，其细胞内储存有大量种类繁多的次生代谢产物，在 DNA 提取过程中可与 DNA 共沉淀，形成难以溶解的胶状物，严重影响提取 DNA 的产量和质量，以及后续的 PCR 的扩增。本研究采用改良的 PVP 方法，在液氮研磨及提取缓冲液中加入高分子螯合剂 PVP，能络合多酚和萜类物质，可有效防止溶液褐变，同时可除去中药材中的多糖^[2]。将 0.1 g 中药材与 1 mL 缓冲液混合水浴后，可充分提取 DNA，但对于含有较多次生代谢产物多糖的锁阳，可增大缓冲液用量到 1.5~2 mL，水浴时间增加到 90 min，以便更充分提取。另外，在调整 PVP 和 β-巯基乙醇用量时，前者浓度一般为 3%，而后者以 2% 为宜，可有效地除去多糖，并且防止多酚污染。改良 PVP 法在提取 DNA 过程中加入乙酸铵，而未增加酚-氯仿-异戊醇的抽提过程，所得 DNA 中蛋白质杂质较少，可能是乙酸铵可提高离子强度，使 DNA 更好地沉淀，得到质量较好的 DNA。

综上所述，对于 4 种药材而言，改良 PVP 法能得到质量更高的 DNA 以用于后续实验，但该方法对于本实验未研究的其他中药材的效果还有待作进一步研究验证。

参考文献：

- [1] 陈士林, 苏钢强, 邹健强, 等. 中国中药资源可持续发展体系构建 [J]. 中国中药杂志, 2005, 39 (15): 1141-1146.
- [2] 陈士林. 中药 DNA 条形码鉴定[M]. 1 版. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 1-6.
- [3] 马 辉, 张智俊, 罗淑萍, 等. 药用植物白术 DNA 提取方法的研究[J]. 新疆农业大学学报, 2007, 30(2): 13-16.
- [4] Jia J, Zhang H Y, Chen J, *et al.* Molecular identification of *Manis pentadactyla* using DNA barcoding[J]. *Chin J Chin Mater Med*, 2014, 39(12): 2212-2215.
- [5] 陈士林, 宋经元, 姚 辉, 等. 药用植物 DNA 条形码鉴定策略及关键技术分析[J]. 中国天然药物, 2009, 7(5): 322-327.
- [6] Chen S L, Yao H, Han J P, *et al.* Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species [J]. *PLoS One*, 2010, 5(1): e8613.
- [7] Li D Z, Liu J Q, Chen Z D, *et al.* Plant DNA barcoding in China[J]. *J Syst Evol*, 2011, 49(3): 165-168.
- [8] Li M, Cao H, But P H, *et al.* Identification of herbal medicinal materials using DNA barcodes[J]. *J Syst Evol*, 2011, 49(3): 271-283.
- [9] 宁淑萍, 颜海飞, 郝 刚, 等. 植物 DNA 条形码研究进展 [J]. 生物多样性, 2008, 6(5): 417-425.
- [10] Pang X H, Song J Y, Zhu Y J, *et al.* Applying plant DNA barcodes for *Rosaceae* species identification[J]. *Cladistics*, 2011, 27(2): 165-170.
- [11] Gao T, Yao H, Song J Y, *et al.* Evaluating the feasibility of using candidate DNA barcodes in discriminating species of the large *Asteraceae* family[J]. *BMC Evol Biol*, 2010, 10: 324.
- [12] 朱英杰, 陈士林, 姚 辉, 等. 重楼属药用植物 DNA 条形码鉴定研究[J]. 药学报, 2010, 45(3): 376-382.
- [13] 罗 焜, 陈士林, 陈科力, 等. 基于芸香科的植物通用 DNA 条形码研究[J]. 中国科学: 生命科学, 2010, 40(4): 342-351.
- [14] 陈 莉, 魏 莉, 周 童, 等. 几种中药 DNA 提取方法的比较研究[J]. 广西植物, 2007, 27(1): 137-139.
- [15] 罗 焜, 马 培, 姚 辉, 等. 中药 DNA 条形码鉴定中的 DNA 提取方法研究[J]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2012, 14(2): 1433-1439.
- [16] 段中岗, 黄琼林, 杨锦芬, 等. 适合中药材 DNA 条形码分析的 DNA 提取方法的研究[J]. 中药新药与临床药理, 2009, 20(5): 480-484.
- [17] 马文丽, 石 嵘. 核酸提取与纯化实验指南[M]. 北京: 化学工业出版社, 2012: 52.
- [18] Zheng Q, Jiang C, Huang LQ, *et al.* Rapid extraction of DNA from Chinese medicinal products by alkaline lysis[J]. *Chin J Chin Mater Med*, 2014, 39(19): 3678-83.
- [19] Lv P, Zhou X, You J, *et al.* Extraction of trace amount of severely degraded DNA[J]. *Z Naturforsch C*, 2009, 64(7-8): 581-589.
- [20] Cheng X W, Chen X H, SU X Q, *et al.* DNA extraction protocol for biological ingredient analysis of Liuwei Dihuang Wan [J]. *GPB*, 2014, 12(3): 137-143.
- [21] 刘 姗, 胡洪利, 陈 惠. 金龙胆草基因组 DNA 的提取及均匀设计优化 RAPD 反应体系[J]. 中成药, 2013, 35(5): 1006-1010.
- [22] Wen G Q, Li J, Liu X H, *et al.* Extraction of total DNA and optimization of the RAPD reaction system in *Dioscorea opposita* Thunb[J]. *Genet Mol Res*, 2014, 13(1): 1339-1347.