

TaqMan-MGB 实时荧光 PCR 法检测太白贝母及其近缘种的研究

张 田¹, 陈 娇¹, 蒋瑞平¹, 邹 萌¹, 仰铁锤², 付绍兵², 周嘉裕^{1*}, 廖 海^{1*}

(1. 西南交通大学生命科学与工程学院, 四川 成都 610031; 2. 青海绿康生物开发有限公司, 青海 西宁 810003)

摘要: 采用 TaqMan-MGB 探针实时荧光 PCR 方法对太白贝母及其近缘种进行分子鉴定研究。提取太白贝母及其近缘种的 DNA, 依据 ITS1 区序列, 利用 MEGA7.0 软件进行比较分析, 找出太白贝母及其近缘种的变异位点, 通过 Primer Premier 6.0 软件设计一对特异性引物和 TaqMan-MGB 探针。在 Roche LightCycler 96 系统中, 该方法对太白贝母 DNA 模板的检测下限为 0.002 39 ng· μL^{-1} , 最适 T_m 值区间为 60 与 61 °C。特异性鉴定研究表明, 该方法对太白贝母有良好的特异性, 能与暗紫贝母等其余 13 种不同贝母基原植物明显区分。TaqMan-MGB 实时荧光 PCR 方法可实现对太白贝母及其近缘种的准确鉴定, 为太白贝母资源的合理开发、中药材市场的管理和中药生产企业的原料监管提供技术支撑。

关键词: TaqMan-MGB 探针; 太白贝母; ITS1; 实时荧光 PCR; 分子鉴定

中图分类号: R931 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2021)09-2577-07

Identification of *Fritillaria taibaiensis* and its relatives by real-time PCR with a TaqMan-MGB probe

ZHANG Tian¹, CHEN Jiao¹, JIANG Rui-ping¹, ZOU Meng¹, YANG Tie-chui²,
FU Shao-bing², ZHOU Jia-yu^{1*}, LIAO Hai^{1*}

(1. School of Life Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China;

2. Qinghai Lv Kang Biological Development Co., Ltd., Xining 810003, China)

Abstract: The molecular identification of *Fritillaria taibaiensis* and its relatives was studied by real-time PCR with a TaqMan-MGB probe. DNA was extracted from *F. taibaiensis* and its relatives. According to the sequence of ITS1 region, the mutation sites of *F. taibaiensis* and its related species were identified by MEGA7.0 software. The specific primers (a pair) and a TaqMan-MGB probe were designed by Primer Premier 6.0 software. In the Roche LightCycler 96 system, the lowest limit of detection for *F. taibaiensis* DNA template was 0.002 39 ng· μL^{-1} , and the optimal T_m value range was 60 and 61 °C. Specificity identification showed that the method had good specificity for *F. taibaiensis*, as it could be distinguished from other 13 different *Fritillaria* species including *F. unibracteata*. Since this method could accurately identify *F. taibaiensis* and its related species, it provides technical support for rational development of *F. taibaiensis* resources, management of Chinese medicinal market and supervision of raw materials in Chinese medicine manufacturing enterprises.

Key words: TaqMan-MGB probe; *Fritillaria taibaiensis*; ITS1; real-time PCR; molecular identification

收稿日期: 2021-02-14; 修回日期: 2021-03-15.

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (31500276); 四川省重点研发项目 (2018SZ0061); 四川省科技计划项目 (2021ZH-FP0170); 四川省中医药管理局项目 (2020JC0128, 2021MS116).

*通讯作者 E-mail: spinezhou@home.swjtu.edu.cn;

ddliao@home.swjtu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-0230

川贝母 (*Fritillariae*) 源于百合科贝母属多种植物的鳞茎, 是中国乃至亚洲地区一种名贵的中药材。其性味苦、甘、微寒, 有清热润肺、化痰止咳之功效^[1], 始载于《神农本草经》。相较于平贝母、浙贝母与伊贝母^[2]等药材, 川贝母治疗劳虚咳嗽、吐痰咳血等症效果更为显著, 被誉为“止咳圣药”^[3]。由于川贝母多为

野生, 长年采挖已致野生资源渐趋枯竭, 市场上已出现大量混伪品。为满足临床需要, 《中国药典》增补了数种不同基原的贝母品种, 以《中国药典》2020年版为例, 川贝母有6种基原植物, 分别为太白贝母 (*Fritillaria taipaiensis*)、卷叶贝母 (*F. cirrhosa*)、暗紫贝母 (*F. unibracteata* P. K. Hsiao & K. C. Hsia)、甘肃贝母 (*F. przewalskii*)、梭砂贝母 (*F. delavayi*) 和瓦布贝母 (*F. unibracteata* Hsiao et K. C. Hsia var. *wabuensis*)。尽管多基原贝母品种缓解了贝母药材的市场空缺, 然而不同基原贝母在生物碱及药效上仍有较大差别。有研究发现, 暗紫贝母、梭砂贝母较之甘肃贝母、卷叶贝母在止咳和化痰两个方面可能更能代表川贝母的功效特点。在镇咳方面, 暗紫贝母、梭砂贝母优于卷叶贝母、甘肃贝母; 在祛痰方面, 暗紫贝母优于甘肃贝母、卷叶贝母、梭砂贝母^[4]; 而太白贝母祛痰作用优于暗紫贝母, 镇咳无显著差异^[5]。因此, 为了避免多基原混用而导致的无效性与安全性问题, 建立适合于单基原的准确、高效鉴定方法已刻不容缓。

不同基原川贝母及其混伪品的鉴定主要依赖于传统的生药学方法, 此法主要从植株茎高、叶片宽度、叶片是否卷曲、鳞茎色泽与鳞茎抱合度等特征进行观察比较, 需要丰富的鉴定经验^[6]。近年来, 由于不同贝母品种的混栽现象, 导致不同基原川贝母甚至常见混伪品形态高度相似, 区分难度大, 常需要结合其他分析鉴定技术进行鉴别。化学方法较为常用, 但需使用高效液相色谱以及液质联用技术, 推广难度较大。2020版《中国药典》中“川贝母”项下已有PCR-RFLP分子鉴定方法, 该法能区分川贝母、伊贝母与浙贝母等药材^[7], 但不能区分川贝母的6种基原, 并且也不能区分川贝母与浓蜜贝母、中华贝母和康定贝母等川贝母近缘物种^[8,9]。DNA条形码是近年来建立的分子鉴定方法^[10,11], 广泛用于植物物种鉴别, 但其标准操作流程包含DNA提取、PCR扩增、测序、数据分析及结果判定等, 耗时较长^[12]。因此, 急需建立更加便捷的检测方法以满足药材市场的监控需求。

TaqMan-MGB标记技术在传统TaqMan探针的基础上, 用MGB基团修饰了3'末端非荧光猝灭基团, 能够在不增加探针碱基数的情况下, 将探针的 T_m 值提高10℃以上, 从而提高特异性并更容易设计^[13,14]。此外, TaqMan-MGB的3'末端标记有非荧光猝灭基团, 可减少荧光背景并提高信噪比。此法的特异性引物对和特异性探针序列可双重保障反应的特异性, 相较常规PCR更具应用与推广价值^[15]。笔者分析太白贝母等13种不同贝母的ITS1序列, 发现太白贝母含有专属性的“ATA”序列, 即作为鉴定太白贝母的特异性标记。

本研究基于该“ATA”序列, 设计实时荧光PCR引物与TaqMan-MGB探针, 建立准确、快速鉴定太白贝母的实时荧光PCR方法, 为太白贝母资源的合理开发、中药材市场的管理和中药生产企业的原料监管提供技术支持。

材料和方法

植物材料 六种川贝母基原植物、中华贝母 (*F. sinica*)、浓蜜贝母 (*F. mellea*)、伊贝母 (*F. pallidiflora* Schrenk) 与浙贝母 (*F. thunbergii*) 采自青海省西宁市互助县; 康定贝母 (*F. cirrhosa* var. *ecirrhosa* Franch) 采自四川省康定市; 平贝母 (*F. ussuriensis*) 采自陕西汉中; 新疆贝母 (*F. walujewii* Regel) 由中国科学院苏志豪研究员与天津理工大学刘明玉教授馈赠。湖北贝母 (*F. hupehensis* Hsiao et K. C. Hsia) 药材购自中国食品药品检定研究院, 批号: 120962-201005; 川贝母 (松贝、青贝与炉贝)、浙贝母与平贝母药材购自成都荷花池中药材市场; 伊贝母药材购自新疆伊犁。所有基原植物及药材由西南交通大学生命科学与工程学院周嘉裕副教授鉴定, 并保存于生命科学与工程学院。

仪器和试剂 LightCycler 96实时荧光定量PCR仪 (Roche), DYY-6C型电泳仪 (北京六一生物科技有限公司), 多功能酶标仪 (美国Bio-Tek), Veriti 96-Well Thermal Cycler PCR仪 (Thermo Fisher)。植物DNA提取试剂盒 (DP305) 购自北京天根生化有限公司, DL2000 DNA Marker、2×T5 Fast qPCR Mix (Probe)、Agarose、核酸缓冲液 (TAE 1×), 2×Master Mix 与核酸染料 (TS-GelRed) 均购自北京擎科生物科技有限公司。

基于ITS1区序列的系统进化树 从NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载太白贝母等13种不同贝母的ITS1序列 (表1)。采用MEGAX软件 (Version 7) 构建NJ系统进化树, 重复次数为1 000。利用DNAMAN软件 (Version 6) 进行序列比对, 筛选太白贝母的特异性碱基序列。利用Primer Premier (Version 6), 设计正向、反向引物和TaqMan-MGB探针, 并由北京擎科生物科技有限公司合成, 核酸序列信息见表2。

基因组DNA提取 分别取太白贝母等样品的干燥叶片与市售药材样品各约50~60 mg, 75%的酒精和无菌水洗净, 晾干, 液氮研磨, 采用植物基因组DNA提取试剂盒 (DP305) 提取基因组DNA。Bio-Tek酶标仪检测DNA的浓度。

常规PCR反应体系 常规PCR反应体系: 2×Master Mix 12.5 μL, 正、反向引物 (10 μmol·L⁻¹) 各1.0 μL, DNA模板2.0 μL, 用灭菌水补足至总体积25 μL。

常规PCR反应参数: 95℃预变性10 min, 1次循

Table 1 ITS1 accession numbers of 13 various *Fritillaria* species

Latin name	Accession number
<i>F. unibracteata</i>	KT861541.1
<i>F. delavayi</i>	KP711999.1
<i>F. cirrhosa</i>	KT861548.1
<i>F. taipaiensis</i>	KT861551.1
<i>F. przewalskii</i>	KT861534.1
<i>F. unibracteata</i> var. <i>wabuensis</i>	KX669649.1
<i>F. sinica</i>	KF906211.1
<i>F. mellea</i>	KF906209.1
<i>F. pallidiflora</i>	KY884644.1
<i>F. thunbergii</i>	DQ191622.1
<i>F. ussuriensis</i>	MG946146.1
<i>F. walujewii</i> Regel	MG946163.1
<i>F. hupehensis</i>	KF906203.1

Table 2 Sequences of primers and probe

Designation	Sequences	T_m /°C
Forward primer	5'-CCCGTAAACGGATGACAC-3'	54
Reverse primer	5'-ATATGTTCTCTGGCGCAG-3'	53
TaqMan-MGB	5'-FAM-TCTCTCATAGCACGAT-MGB-3'	48

环; 95 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 50 s, 共计 35 次循环; 72 °C 延伸 7 min。1.5% 琼脂糖电泳检测 PCR 产物。

TaqMan-MGB 实时荧光 PCR 反应体系 实时荧光 PCR 反应体系为: 2×T5 Fast qPCR Mix (Probe) 为 10.0 μL, 正向与反向引物 (浓度为 10 μmol·L⁻¹) 各 1.0 μL, DNA 模板 2.0 μL, TaqMan-MGB 探针 1.0 μL, 用灭菌水补足至总体积 20 μL。

实时荧光反应条件参数: 95 °C 预变性 2 min, 1 次循环, (95 °C 变性 10 s, 56 °C 退火 60 s, 共计 40 次循环)。

TaqMan-MGB 实时荧光 PCR 最低灵敏度 选取太白贝母基因组 DNA 样本, 用灭菌水 10 倍稀释成 7 个梯度, 每个浓度梯度各取 2 μL 作为模板, 按照“TaqMan-MGB 实时荧光 PCR 反应体系”方法进行灵敏度检测。

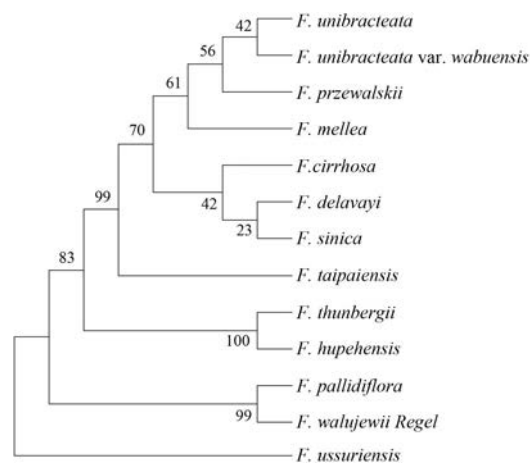
TaqMan-MGB 实时荧光 PCR 的特异性 取太白贝母等不同贝母样品的基因组 DNA。按照“TaqMan-MGB 实时荧光 PCR 反应体系”法进行实时荧光 PCR 扩增, 利用实时荧光 PCR 仪自带软件进行扩增数据分析。

结果与分析

1 13 种贝母 ITS1 的系统进化树与序列比对结果

系统进化树显示 (图 1) 6 种川贝母与浓蜜贝母、中华贝母等形成单系群, 其中太白贝母与其余贝母品种构成姐妹群, 亲缘关系较远, 表明太白贝母是分化较早的贝母品种, 推测太白贝母与其余贝母品种在 ITS1 区域有较高的变异性。随后, 比对不同贝母的 ITS1 序列, 发现太白贝母 ITS1 区域的 98 到 100 碱基位置存在

特异性的“ATA”碱基序列 (图 2), 并以该“ATA”序列为核心, 设计 MGB 探针、正向与反向实时荧光 PCR 引物, 探针及引物位置见图 2。

**Figure 1** Phylogenetic tree based on ITS1 of 13 various *Fritillaria* species

2 常规 PCR 扩增反应

开展实时荧光 PCR 实验之前, 采用常规 PCR 扩增所有贝母样品的 ITS1 区域, 结果显示所有贝母样品均能扩增出预期分子大小的 PCR 产物, 不仅表明 ITS1 序列正确, 并且引物设计合理 (图 3)。随后, 对太白贝母的 PCR 扩增产物进行 Sanger 测序, 进一步确认太白贝母的 ITS1 区域在相对应的位置上存在“ATA”碱基序列。

3 实时荧光 PCR 扩增反应条件的探索

3.1 最适 T_m 值 当 T_m 值为 56 °C 时, 不仅太白贝母出现了特异性荧光扩增曲线, 平贝母与湖北贝母也出现了低强度的非特异性荧光扩增曲线, 表明需要优化 T_m 值。随后, 选择 56、57、58、59、60、61 与 62 °C 等系列 T_m 值开展实验 (图 4), 对应的循环定量值 (Cq) 值见表 3。比较发现, 当 T_m 值为 60 和 61 °C 时, 实时荧光 PCR 结果的特异性最高 (61 °C 的荧光强度略高) (图 4), 因此确定最适 T_m 值区间为 60 与 61 °C。

3.2 TaqMan-MGB 探针的最低灵敏度 太白贝母 DNA 样本的初始浓度为 238.54 ng·μL⁻¹, 随后将其稀释到 23.854、2.385 4、0.238 54、0.023 85、0.002 39、0.000 24 与 0.000 02 ng·μL⁻¹ 等 8 个浓度梯度。实时荧光 PCR 扩增结果显示 TaqMan-MGB 探针可检测出的最低浓度为 0.002 39 ng·μL⁻¹ (图 5), 表明该探针检测的灵敏度较高。不同浓度 DNA 模板的 Cq 值见表 4。

4 TaqMan-MGB 探针特异性

以 14 种贝母为试样, 将 DNA 模板浓度控制在 100~150 ng·μL⁻¹ 区间, 进行 Taqman-MGB 实时荧光 PCR (T_m 值为 61 °C), 结果仅有太白贝母出现扩增曲线 (图 6),

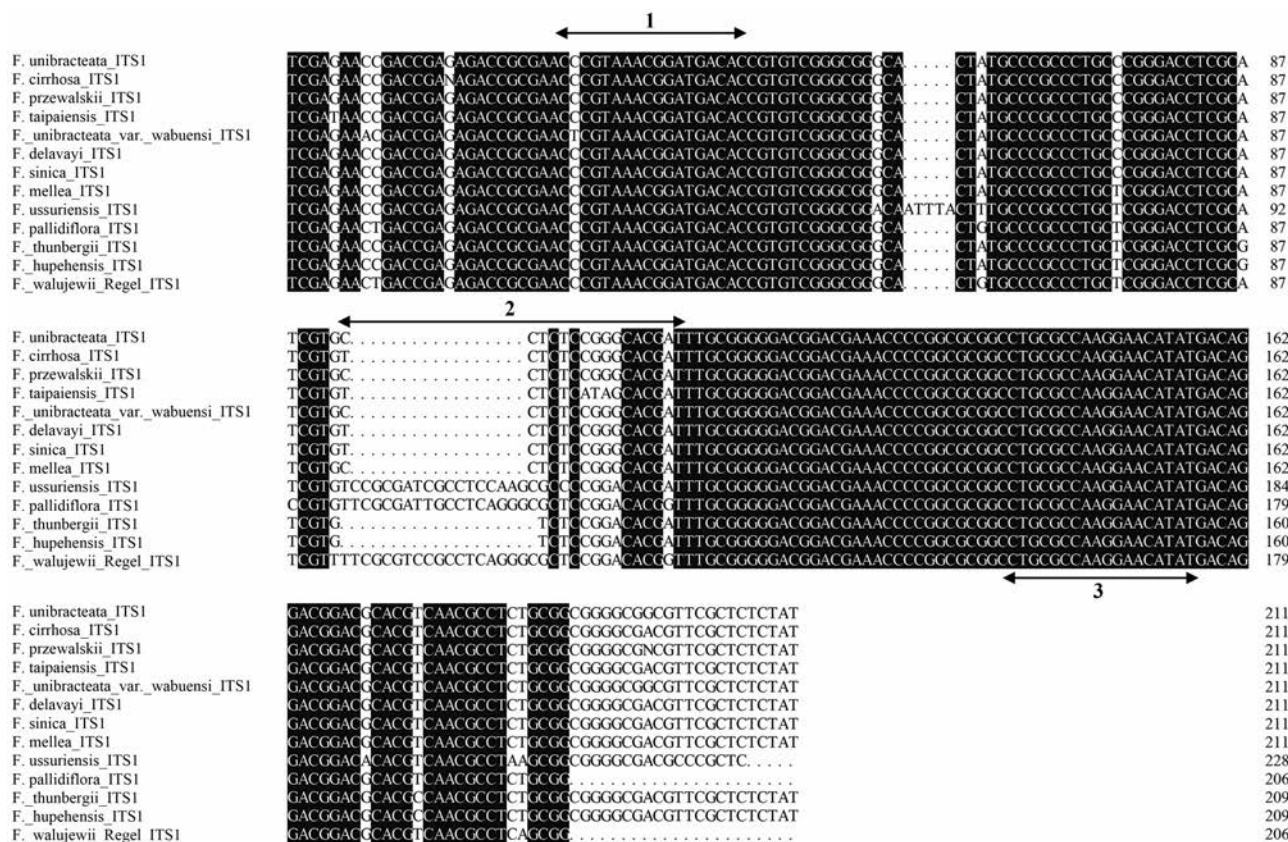


Figure 2 Alignment based on ITS1 of 13 various *Fritillaria* species. 1: The location of forward primer; 2: The location of TaqMan-MGB probe; 3: The location of reverse primer

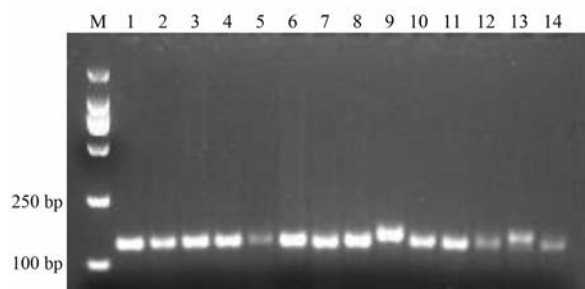


Figure 3 Agarose electrophoresis of PCR products of 14 *Fritillaria* species. M: DNA Maker (DL2000), lane 1 to 14 indicated *F. unibracteata*, *F. delavayi*, *F. cirrhosa*, *F. taipaiensis*, *F. przewalskii*, *F. unibracteata* Hsiaoet K. C. Hsia var. *wabuensis*, *F. sinica*, *F. cirrhosa* var. *ecirrhosa* Franch., *F. pallidiflora* Schrenk., *F. mellea*, *F. thunbergii*, *F. ussuriensis*, *F. walujewii* and *F. hupehensis*, respectively

Table 3 Cq at various T_m . *The former Cq in each line were three replicates of *F. taipaiensis*, respectively. Cq: Cycle quantity

T_m / °C	Cq*
56	12.83, 13.07, 12.37, 26.06 (<i>F. ussuriensis</i>), 26.96 (<i>F. hupehensis</i>)
57	14.58, 13.48, 14.67
58	13.29, 13.48, 13.68
59	12.93, 14.22, 14.01, 24.13 (<i>F. hupehensis</i>)
60	14.20, 14.03, 14.07
61	12.63, 12.50, 12.56

Table 4 Cq under various concentration of DNA templates

Concentration of DNA templates/ng· μ L ⁻¹	Cq
238.54	11.91
23.854	16.09
2.385 4	19.67
0.238 54	23.46
0.023 85	25.19
0.002 39	25.76
0.000 24	26.29
0.000 02	26.60

表明该方法具有较高的特异性。

5 对市售药材的鉴定

使用 TaqMan-MGB 实时荧光 PCR 法鉴定购买的药材 (松贝、青贝、炉贝、浙贝、平贝、伊贝母、湖北贝母), 并以太白贝母为标准品, 结果显示仅有太白贝母标准品产生特异性荧光曲线, 其余药材均不含有太白贝母 (图 7)。

讨论

筛选特异性分子标记是建立准确、高分辨率分子鉴定方法的首要前提^[16]。相较于基因编码区, ITS 位于核基因组中编码核糖体 rRNA 基因的间隔区, 受到的选择压力较小, 进化速率较快, 常用于研究属间、种

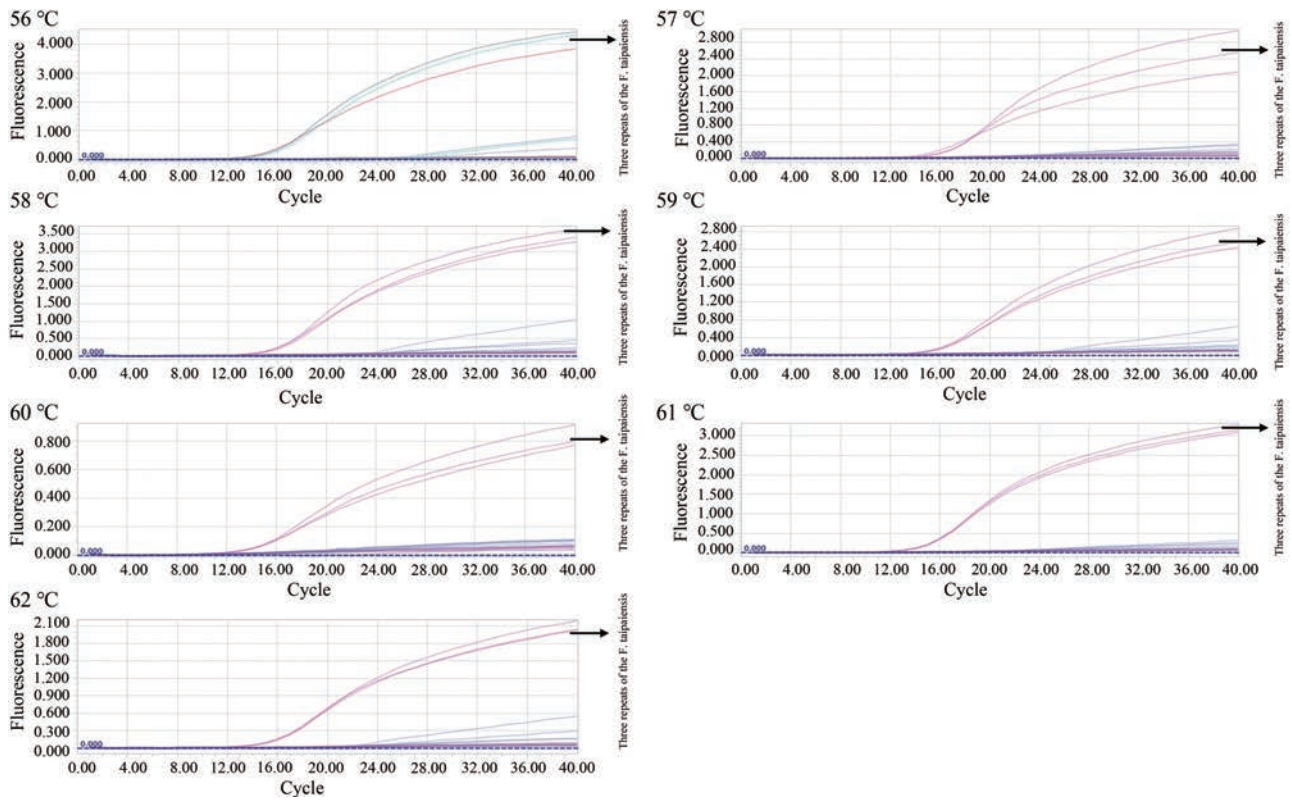


Figure 4 Real time PCR performed at various T_m

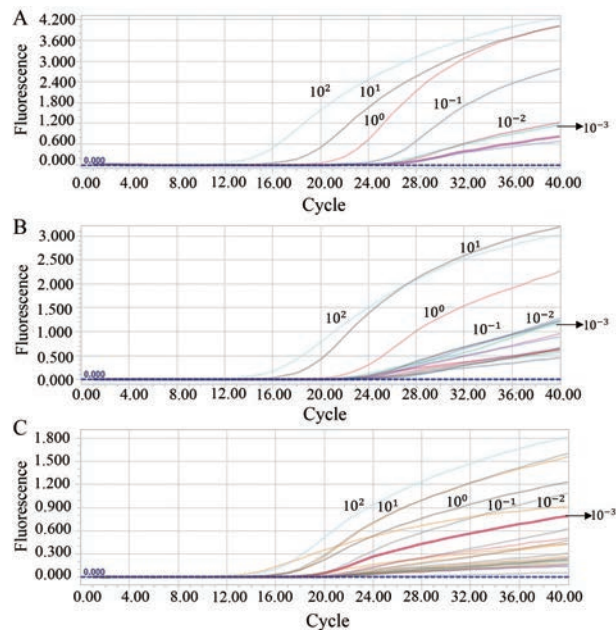


Figure 5 Limit of detection based on TaqMan-MGB real time PCR. A: The probe sensitivity of the 238.54 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ group; B: There were two replicates in 238.54 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ group; C: Sensitivity of different DNA templates

间甚至居群间等较低分类等级的系统发育关系^[17]。ITS 包括 ITS1 与 ITS2, 其中 ITS2 是 5.8S rRNA 基因与 28S rRNA 基因间的内转录 2 区。陈士林等^[18]提出以

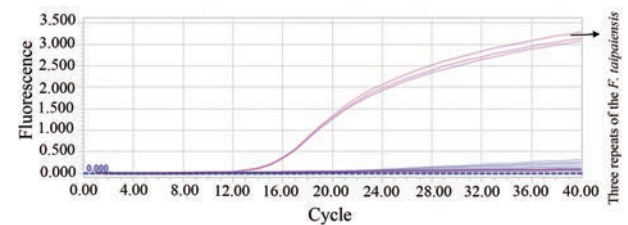


Figure 6 Taq-Man MGB real time PCR of 14 various *Fritillaria* species

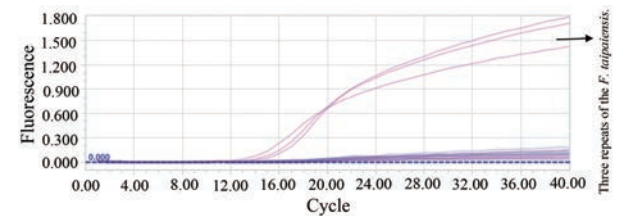


Figure 7 Taq-Man MGB real time PCR of seven Bei-mu medicines and *F. taipaiensis*

ITS2 为主, *psbA-trnH* 序列为辅的药用植物 DNA 条形码鉴定策略。本课题组分析不同贝母的 ITS2 序列, 结果显示太白贝母与其他川贝母在 ITS2 区域只相差 1 个碱基, 相似度过高, 形成特异性分子鉴定方法有一定的难度^[12]。相较于 ITS2, ITS1 是 18S rRNA 基因与 5.8S rRNA 基因间的内转录 1 区, 其序列长度更长, 产生的变异更多^[19]。例如, 负凯祎等^[20]利用冬虫夏草及其混

伪品在 ITS1 区域的差异,建立了特异鉴定冬虫夏草的 Taqman 方法。从结果 1 中发现太白贝母与其他川贝母品种构成姐妹群,亲缘关系较远,表明太白贝母可能在较早时间即与其他川贝母品种产生了分化,这与郑辉等^[12]基于 ITS2 序列的系统分类结果相似。导致这种现象的原因可能与太白贝母独特的生境相关,太白贝母是川贝母中唯一能在低海拔地区 (< 2 000 m) 生长的品种,环境的差异可能导致遗传物质发生变异。为考察该“ATA”序列的稳定性,比对了 NCBI 中已有的 10 条太白贝母 ITS1 序列(序列号分别为 MH588425.1、MH588424.1、MH588423.1、MH588422、MH588421.1、KT861553.1、KT861552.1、KT861551.1、KP712002.1 与 HM045470.1),结果发现所有序列均含有“ATA”碱基序列,结合进一步的 Sanger 测序,表明该碱基序列稳定性比较好,适合用于下一步的 qPCR 实验验证。

由于太白贝母 ITS1 区域中“ATA”碱基序列的上下游含有较多的 AT 碱基,导致初始探针的 T_m 值较低(48 °C),但该探针连接 MGB 基团以后,其最终 T_m 值超过实时荧光定量 PCR 引物的 T_m 值,实验能够获得成功。郭丽霞等^[21]也利用 MGB 修饰基团提高探针的 T_m 值,建立了小球藻的分子鉴定方法。以上结果表明,MGB 适用于 AT 密集区域的探针设计,能够提高探针的 T_m 值,从而增强了该技术的应用范围。合适的 T_m 值不仅决定着 PCR 的扩增效率^[22],也影响 MGB 探针的特异性杂交^[23]。

灵敏度结果显示,检测太白贝母 DNA 浓度最低可达 $0.002\ 39\ \text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 。负凯祎等^[20]设计 Taqman 探针,检测冬虫夏草的最低 DNA 模板浓度为 $0.016\ \text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$,与之相比,本文设计的探针检测的 DNA 模板浓度更低,应用前景较好。在对市售药材开展实时荧光 PCR 检测时,松贝、青贝与炉贝等川贝母药材均未出现扩增曲线,表明所购买的川贝母药材中未含有太白贝母。《中国药典》记载,太白贝母常以“松贝”与“青贝”入药,其主要栽培区位于陕西、甘肃与重庆等地区,而本次实验购买的川贝母药材产地为四川阿坝州与甘孜州,并非太白贝母的主产区,因此未出现阳性扩增结果,本文作者将继续收集来自陕西、甘肃与重庆等地区的川贝母药材,开展进一步的验证。

最后,采用本文的 Taqman-MGB 实时荧光 PCR 方法,整体仅需 1.5 h,即可完成太白贝母的准确检测。与《中国药典》2020 版的 PCR-RFLP、DNA 条形码等方法^[24]比较,本方法能够实时监测试验结果,省去电泳及核酸测序等步骤,操作更加便捷,大大缩短检测周期^[25],本方法具有特异性高、快速、标准化程度高与高效的特点,从而为太白贝母资源的合理开发、中药材市

场的管理和中药生产企业的原料监管提供技术支撑。

作者贡献: 张田是本研究的实验设计者和实验研究的执行人,完成数据分析,论文初稿的写作;陈娇、蒋瑞平、邹萌、仰铁锤和付绍兵参与样品采集、实验设计,试验结果分析;周嘉裕和廖海是项目的构思者及负责人,指导实验设计、数据分析、论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

利益冲突: 本文的研究内容无任何利益冲突。

References

- [1] State Pharmacopoeia Committee. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [M]. 2020 Ed. Part I. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 38-39.
- [2] Li Y, Wang YE, Bai YG, et al. A comparative study was conducted on *Fritillaria ussuriensis*, *Fritillaria pallidiflora* and *Fritillaria cirrhosa* based on principal components and antitussive and expectorant effects [J]. Guid J Tradit Chin Med Pharm (中医药导报), 2018, 24: 46-56.
- [3] Sun T, Peng C. The study of anti-asthmatic effect of Bulbus *Fritillariae Cirrhosae* cough relieving granule [J]. Lishizhen Med Mater Med Res (时珍国医国药), 2013, 24: 1575-1577.
- [4] Zhou Y, Ding H, Yan BH, et al. Experimental study on the difference of antitussive and expectorant effects of *Fritillaria cirrhosa* from different basic sources [J]. Chin J Clin Pharmacol Ther (中国临床药理学与治疗学), 2010, 15: 612-616.
- [5] Shen L, Ma L, Liu SX, et al. Comparative study on antitussive and expectorant pharmacological effects of *Fritillaria unibracteata* and *Fritillaria taipaiensis* [J]. J Pract Tradit Chin Med (实用中医药杂志), 2012, 28: 784-785.
- [6] Jiang BQ. Identification characteristics of *Fritillaria cirrhosa* and its similar, confused and counterfeit products [J]. China Pharm (中国药业), 2010, 19: 73.
- [7] Zhang WJ, Liu W, Wei F, et al. Study on the detection of adulteration of *Fritillaria cirrhosa* by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 2014, 34: 1830-1835.
- [8] Hu W, Chen WS, Lin XN, et al. Optimization of polymerase chain reactor-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method for identification of *Fritillaria cirrhosa* [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 2017, 37: 1716-1720.
- [9] Wu D, Guo Q. Detection of other animal species in *Placenta Hominis* by using Taqman real time PCR [J]. J Chin Med Mater (中药材), 2017, 40: 38-41.
- [10] Li J, Zhang R, Yu S, et al. Identification of Chinese medicinal materials *Stellariae Radix* and its adulterants using DNA barcoding [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2019, 54: 937-943.
- [11] Lou Q, Xin T, Song J. Application of DNA barcoding technology in the whole industrial chain of traditional Chinese medicine [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2020, 55: 1784-1791.

- [12] Zheng H, Deng KY, Chen AQ, et al. Molecular identification and genetic relationship of *Fritillaria cirrhosa* and related species based on DNA barcode [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2019, 54: 2326-2334.
- [13] Zheng M, Chen XQ, Wang S, et al. A TaqMan-MGB real-time RT-PCR assay with an internal amplification control for rapid detection of Muscovy duck reovirus [J]. Mol Cell Probes, 2020, 52: 101575.
- [14] Watzinger F, Ebner K, Lion T. Detection and monitoring of virus infections by real-time PCR [J]. Mol Aspect Med, 2006, 27: 254-298.
- [15] Guo LX, Duan LJ, Wang YC, et al. Tanman MGB based real-time PCR method for the detection of *Didymella glomerata* [J]. Acta Phytopathol Sin (植物病理学报), 2019, 50: 97-106.
- [16] Liu W, Zhang WJ, Cheng XL, et al. Progress in constituents and isolation and analysis methods of *Fritillariae Cirrhosae Bulbus* [J]. Asia-Pac Tradit Med (亚太传统医药), 2015, 11: 41-46.
- [17] Xu CL, Li HJ, Li P, et al. Study on molecular identification method of *Fritillaria cirrhosa* [J]. J China Pharm Univ (中国药科大学学报), 2010, 41: 226-230.
- [18] Chen SL, Song JY, Yao H, et al. Strategy and key technique of identification of Chinese herbal medicine using DNA barcoding [J]. Chin J Nat Med (中国天然药物), 2009, 7: 322-327.
- [19] Xin T, Yao H, Luo K, et al. Stability and accuracy of the identification of *Notopterygii Rhizoma* Radix using the ITS/ITS2 barcodes [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2012, 47: 1098-1105.
- [20] Yun KY, Xiang L, Wang XY, et al. Identification of *Ophiocordyceps sinensis* and its adulterants based on portable and CFX96 real-time fluorescent PCR systems [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2019, 54: 746-752.
- [21] Guo LX, Duan LJ, Wang CY, et al. TaqMan MGB base real time PCR method for the detection of *Didymella glomerata* (in Chinese) [J]. Acta Phytopathol Sin (植物病理学报), 2020, 50: 97-106.
- [22] Zhou GY, Lan H, Li HW. Research on changes of PCR enthalpy in different annealing temperature with DSC [J]. Food Mach (食品与机械), 2011, 27: 28-30,118.
- [23] You Y, Tataurov AV, Owczarzy R. Measuring thermodynamic details of DNA hybridization using fluorescence [J]. Biopolymers, 2011, 95: 472-486.
- [24] Xin T, Xu Z, Jia J, et al. Biomonitoring for traditional herbal medicinal products using DNA metabarcoding and single molecule, real-time sequencing [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2018, 53: 488-497.
- [25] Zhou CD, Huang ZS. Application of fluorescent quantitative PCR in drug inspection [J]. Tianjin Pharm (天津药学), 2018, 30: 65-71.