

[7] 张淑娟, 张育贵, 辛二旦, 等. 红芪研究进展及质量标志物的预测分析[J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(1): 70-74.

[8] 牛江涛, 曹 瑞, 张泽国, 等. 红芪多糖的提取分离及药理作用研究进展[J]. 中国药房, 2017, 28(1): 130-133.

[9] 张 锐, 顾志荣, 吕 鑫, 等. 基于网络药理学探讨红芪的活性成分、作用靶点及潜在治疗价值[J]. 中国野生植物资源, 2021, 40(6): 13-19.

[10] 冯慧敏, 李成义, 何军刚, 等. 红芪化学成分和药理作用研究进展及质量标志物 (Q-Marker) 的预测分析[J]. 中草药, 2021, 52(9): 2831-2842.

[11] 刘 岩, 李连泰, 计小清, 等. 土壤中无机元素对不同产地黄芩中无机元素和黄芩苷量的影响[J]. 中草药, 2017, 48(6): 1225-1228.

[12] 贾妙婷, 孙天雄, 汪 莉, 等. 外源钾对红芪药材性状及异黄酮类成分的影响[J]. 甘肃中医药大学学报, 2021, 38(2): 1-5.

[13] 宫福雨, 程 林, 韩 梅, 等. 黄芩药效成分积累的生态因子特征分析[J]. 中药材, 2020, 43(7): 1570-1576.

[14] 刘大会, 郭兰萍, 黄璐琦, 等. 矿质营养对药用植物黄酮类成分合成的影响[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(18): 2367-2371.

[15] 梁卫青, 胡轶娟, 浦锦宝, 等. 前胡有效成分含量与土壤因子的相关性分析[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(11): 1302-1308.

[16] 刘振成, 张 硕, 代艾林, 等. 土壤因子对朝鲜淫羊藿有效成分的影响[J]. 东北林业大学学报, 2021, 49(5): 40-44.

金嗓清音丸中僵蚕成分的特异性引物扩增鉴定

郭晶晶^{1,2}, 唐玲玲³, 严小萍^{1,2}, 徐 超³, 胡建慧⁴, 李 娟³, 孙小祥⁴, 夏国华³, 林 玲³, 杨 欢^{3*}

(1. 南通大学附属如皋医院药剂科, 江苏 如皋 226500; 2. 如皋市人民医院药剂科, 江苏 如皋 226500; 3. 江苏大学药学院, 江苏 镇江 212013; 4. 镇江市中医院药剂科, 江苏 镇江 212003)

摘要: **目的** 建立特异性引物扩增鉴定金嗓清音丸中僵蚕成分。**方法** 根据家蚕、白僵菌、绿僵菌线粒体全基因序列差异设计特异性引物 PM2、PB2、PA2, 采用十六烷基三甲基溴化铵法、酚仿抽提法提取纯化总 DNA, 并以此为模板进行特异性引物扩增和方法学考察, 产物以 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。**结果** 家蚕、白僵菌、绿僵菌 DNA 经 PCR 扩增后, 分别在 82、94、144 bp 处产生条带, 并且未观察到非特异性扩增条带。PM2、PB2、PA2 对相应 DNA 的检测灵敏度分别为 0.10、0.10、0.010 ng/μL。来自同一厂家的 6 批样品中同时检出家蚕、白僵菌 DNA, 但未检出绿僵菌 DNA, 而另外 2 批样品仅检出家蚕 DNA。**结论** 该方法方便可靠, 专属性强, 有助于更好地监控金嗓清音丸等含僵蚕中药成方制剂的质量, 可为其临床用药的安全性和有效性提供保障, 并与其他中成药中动物药的专属性鉴定提供参考。

关键词: 金嗓清音丸; 僵蚕; 成分鉴定; 特异性引物扩增

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2023)05-1729-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.05.061

中成药在保障大众健康方面发挥着重要作用, 其中抵当丸、大黄蛰虫丸等^[1-2] 含动物药的品种早在《伤寒杂病论》《金匱要略》中即有记载。僵蚕为蚕蛾科昆虫家蚕 *Bombyx mori* Linnaeus 4~5 龄的幼虫感染 (或人工接种) 白僵菌 *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillant 而致死的干燥体, 性平, 味咸、辛, 具有息风止痉、祛风止痛、化痰散结等功效^[3], 但市面上常见绿僵蚕、黑死蚕等伪品^[4], 对临床用药安全性与有效性造成了不良影响。2020 年版《中国药典》一部收录了含僵蚕的成方制剂共 36 种, 其中金嗓清音

丸由麸炒僵蚕等 16 位中药组成, 具有养阴清肺、化痰利咽功效, 主治肺热阴虚所致的慢喉瘖、慢喉痹等, 目前该制剂的质量评价方法主要包括观察地黄、石斛、蝉蜕、甘草显微特征, TLC 法定性鉴别麦冬、玄参、芍药苷、丹皮酚、哈巴俄苷, HPLC 法测定黄芩、木蝴蝶中黄芩苷含量^[5], 但由于其组成复杂, 传统的显微、理化方法难以准确鉴定僵蚕成分, 故相关标准尚未涉及这一方面。

DNA 分子鉴定具有特异性高的优势, 近年来发展迅速, 是黄璐琦院士提出的“分子生药学”重要组成部

收稿日期: 2022-01-02

基金项目: 国家自然科学基金 (82173937); 南通市社会民生科技计划项目 (JCZ2022031)

作者简介: 郭晶晶 (1981—), 女, 主管中药师, 研究方向为中药学。Tel: (0513) 87512315—687, E-mail: 7318874@qq.com

* 通信作者: 杨 欢 (1980—), 男, 教授, 研究方向为中药学。Tel: (0511) 85038451, E-mail: yanghuan1980@ujs.edu.cn

分^[6]，已有不少相关报道^[7-8]，但该技术要求 COI 序列保持完整，而且供试品 DNA 不能为混合物，2020 年版《中国药典》四部^[9]更是明确要求“用于中药材（包括药材及部分饮片）及基原物种的鉴定”。金嗓清音丸中不仅含有僵蚕，还有蝉蜕及 14 味植物类中药，而且僵蚕由家蚕和白僵菌组成，实质上为复合体类，故 COI 序列无法对僵蚕进行鉴定。

特异性引物扩增鉴定是指在正伪品差异序列上设计并扩增，利用引物与正品 DNA 序列能碱基互补配对可扩增产生特定长度条带，而与伪品序列不配对无法产生条带的原理而进行鉴定的方法^[10]，该技术在检验过程中无需测序，而且抗干扰能力较强，适用于混合物，弥补了 DNA 条形码技术的不足^[11-13]。近年来，研究人员已通过特异性引物扩增对龟甲与鳖甲^[14]、广地龙^[15]、宽体金线蛭^[16]等动物药进行了专属性鉴定，由于其特异性、可靠性较强，目前在中药鉴定方面的应用受到广泛关注。

本实验根据家蚕、白僵菌、绿僵菌线粒体全基因（*mtDNA*）序列的差异来设计引物，进而基于特异性引物扩增建立金嗓清音丸中僵蚕成分鉴定方法，可为该制剂质量控制提供可靠的检测方法，还能为其他中成药中动物药的专属性鉴定提供参考。

1 材料

1.1 仪器 T-MS 型恒温混匀仪（宁波拓普森科学仪器有限公司）；BSA124S 型电子分析天平（德国 Sartorius 公司）；1-13 型小型台式离心机（美国 Sigma 公司）；TGL-16C 型高速台式离心机（上海安亭科学仪器厂）；HH-S₄ 型数显恒温水浴锅（江苏金怡仪器科技有限公司）；MJ-180B 型霉菌培养箱（上海跃进医疗器械厂）；SW-CJ-2D 型净化工作台（苏州净化设备有限公司）；SHZ-82 型气浴恒温振荡器（常州国华电器有限公司）；DHG-9070A 型电热恒温鼓风干燥箱（上海精宏实验设备有限公司）；ND-1000 型核酸蛋白分析仪（美国 Thermo Fisher 公司）；LDZF-30L-II 型立式高压蒸汽灭菌器（上海申安医疗器械厂）；T100 型 PCR 仪、Power PAC 3000 型电泳电源、Wide Mini-Sub Cell GT 型水平电泳槽（美国 Bio-Rad 公司）；GenoSens 1860 型凝胶成像采集分析系统（上海勤翔科学仪器有限公司）。

1.2 药材 家蚕 *Bombyx mori* 由中国农业科学院蚕业研究所提供；球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* 购自中国工业微生物菌种保藏管理中心，保藏编号为 CICC41021；金龟子绿僵菌 *Metarhizium anisopliae* 购自北京北纳创联生物技术研究院，保藏编号为 BNCC114445；家蚕对照药材（批号 B/N121457-200501）购自中国食品药品检定研究院。课题组前期根据 2020 年版《中国药典》方法自制麸炒僵蚕^[1]，并参考文献^[17]报道的方法自制其伪品绿僵蚕及麸炒品。

金嗓清音丸中除麸炒僵蚕外的其余 15 味中药（玄参、地黄、麦冬、黄芩、牡丹皮、赤芍、川贝母、泽泻、炒薏苡仁、石斛、薄荷、胖大海、蝉蜕、木蝴蝶和甘草）均由镇江市中医院提供，经镇江市中医院药剂科孙小祥主任中

药师鉴定为正品。蝉蜕以通用引物对 LCO1490/HCO2198 扩增 COI 序列，其余 14 味植物药以通用引物对 ITS2F/ITS3R 扩增 ITS2 序列，扩增产物由生工生物工程（上海）股份有限公司测序，通过 NCBI-BLAST 以及 DNAMAN 软件进行分析与匹配。

1.3 药物 金嗓清音丸共 8 批（批号 WF118020021、WF118040141、WF118030111、WF118040181、WF118040201、WF118020061、WF118090241、WF119070181，编号 JS1 ~ JS8，1 g/10 丸×360 丸/盒），均由厂家 A 生产，购自全国各地药房。

1.4 试剂 磷酸二氢钾、七水硫酸镁、氯仿、十六烷基三甲基溴化铵（CTAB）、乙二醇四乙酸二钠（EDTA）、氯化钠、硼酸、甲醇、无水乙醇、异戊醇、异丙醇、盐酸等均为分析纯，均购自国药集团化学试剂有限公司；葡萄糖、盐酸硫胺、β-巯基乙醇、DNA 提取酚试剂、10×DreamTaq Green Buffer、dNTP Mix、DreamTaq DNA 聚合酶、低电渗琼脂糖（Low EEO）、Tris-base、Proteinase K、Ethidium Bromide、Low DNA Ladder 等购自生工生物工程（上海）股份有限公司、北京索莱宝科技有限公司、阿拉丁试剂（上海）有限公司、上海碧云天生物技术有限公司、美国 Thermo 公司、杭州胜行生物科技有限公司、美国 Sigma-Aldrich 公司等。

2 方法与结果

2.1 金嗓清音丸制备 参考文献^[6]报道，将 16 味饮片粉碎成细粉，过筛，混匀，每 100 g 粉末加 35~50 g 炼蜜、适量水制成水蜜丸，即得（编号 JB1~JB10）。另外，将麸炒僵蚕更换为麸炒绿僵蚕，同法制成伪品（编号 JA1~JA10）；不加入麸炒僵蚕，同法制成阴性制剂（编号 JN1~JN10）。

2.2 供试品溶液制备 称取“2.1”项下正品及其伪品、阴性制剂各 20.0 mg，转移至 2 mL 透明离心管中，加入 CTAB 提取液 1 mL 混匀，65 ℃金属浴中 600 r/min 振荡孵育 2 h，12 000 r/min 离心 5 min，吸出上清液，加入等体积预冷的 70% 甲醇，颠倒混匀后在 -20 ℃下冷冻 1 h，高速离心 5 min，弃去上清液，沉淀中加入 CTAB 提取液 0.5 mL 混匀，65 ℃金属浴中 600 r/min 振荡孵育 1 h，高速离心 5 min，吸出上清液，加入等体积氯仿-酚试剂（1：1）混合液，颠倒混匀，高速离心 10 min，吸出上清液，加入等体积的氯仿-异戊醇（24：1）混合液，充分混匀，高速离心，吸出上清液，加入等体积预冷的异丙醇、3 mol/L 醋酸钾溶液 100 μL，颠倒混匀，在 -20 ℃下冷冻 1 h 或 4 ℃下冷藏过夜，高速离心 10 min，弃去上清液，沉淀中加入 500 μL 预冷的 70% 乙醇洗涤，室温晾干后以 TE 缓冲液 25 μL 溶解残留物，即得，在 260、280 nm 波长处测定吸光度 A_{260} 、 A_{280} ，于 -20 ℃或 4 ℃下保存。

2.3 特异性引物设计 从 GenBank 数据库中搜索下载家蚕（AB070264.1、AB083339.1、AF149768.1、AY048187.1、GU966594.1、GU966595.1、GU966596.1、GU966599.1、

GU966600.1、GU966602.1、GU966603.1、GU966604.1、KP192479.1、KP244370.1、KP313778.1、KP729110.1、
GU966605.1、GU966607.1、GU966608.1、GU966609.1、MG797555.1、NC_002355.1)、白僵菌(CM020964.1、
GU966610.1、GU966611.1、GU966612.1、GU966613.1、EU371503.2、KT201148.1、KT201149.1、KU869769.1、
GU966614.1、GU966615.1、GU966617.1、GU966618.1、MH211586.1、NC_010652.2)、绿僵菌(AY884128.1、
GU966620.1、GU966622.1、GU966623.1、GU966624.1、NC_008068.1) 线粒体全基因组序列,基于三者基因差异,
GU966625.1、GU966626.1、GU966628.1、GU966630.1、采用 Oligo 7 软件进行特异性引物的设计与筛选,并通过
KM279431.1、KM347743.1、KM875545.1、KP192478.1、NCBI Primer-BLAST 进行评估,引物序列见表 1。

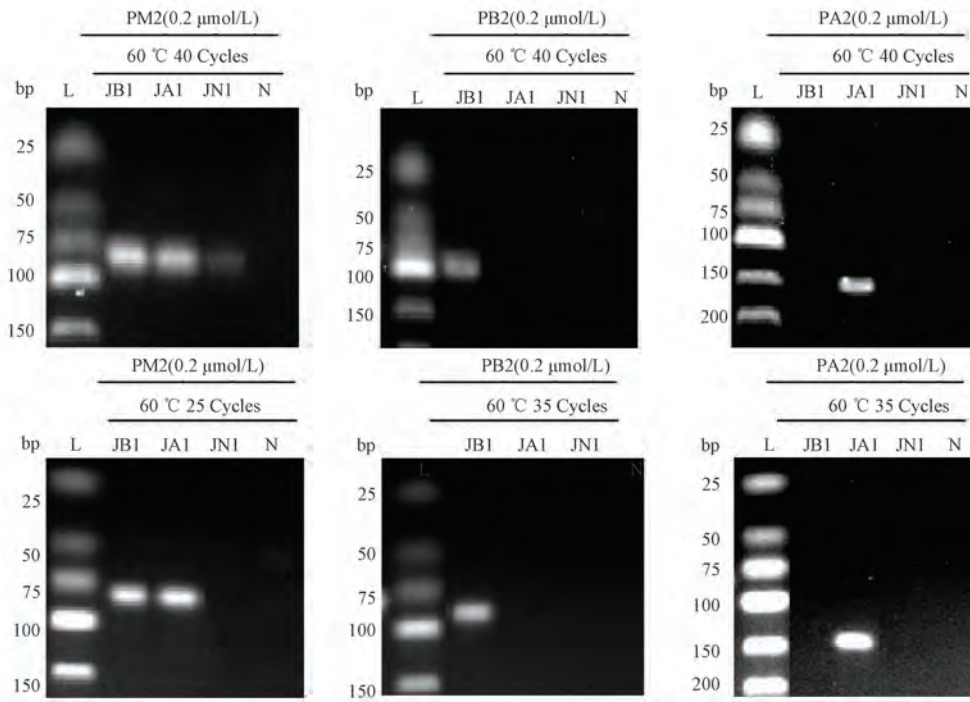
表 1 特异性引物序列

物种	编号	引物序列(5'→3')	目的产物长度/bp
家蚕 <i>Bombyx mori</i>	PM2	正向 ACCCGTAATAAGCCATAACCCAC	82
		反向 CTCATGTTGAAGCCCCAGT	
白僵菌 <i>Beauveria bassiana</i>	PB2	正向 CTCCTTTATATACGCAGTAGGCAT	94
		反向 CCTCTACCATTATATCCGCTT	
绿僵菌 <i>Metarhizium anisopliae</i>	PA2	正向 AGATTGTAATTTATGTGGCTT	144
		反向 TAAACTGTCCCCCTAGCGAT	

2.4 PCR 扩增 反应体系组成为 1×PCR 缓冲液(含 2.0 mmol/L MgCl₂) 2.5 μL、0.2 mmol/L dNTPs 0.5 μL、0.2 μmol/L 正反向引物各 0.5 μL、1 μL 模板 DNA(10 ng)、0.625 U Taq DNA Polymerase, 无菌双蒸水补足至 25 μL; 以家蚕、白僵菌、绿僵菌 DNA 为阳性对照。PCR 扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶进行水平电泳(120 V, 70 min) 分离, 并以凝胶成像系统检测条带。

由于在 PCR 扩增过程中, 循环次数、退火温度等对扩

增结果有较大影响, 故本实验对两者进行了优化, 结果见图 1。由此可知, 在总 DNA 经 PM2、PB2 或 PA2 分别扩增 35 个循环后, 电泳中在 3 个物种所对应位置处均发现明亮的条带, 并且无其他条带, 表明均特异性扩增出了目的 DNA 片段; 当循环数增加至 40 后, 引物 PM2 对阴性制剂(JN1) 扩增出较弱的条带, 出现非特异性扩增, 故设定其循环数为 35, 同时为了保证在复杂组分中能够检测到微量目标片段, 减少假阴性结果, PB2、PA2 选择循环数为 40。

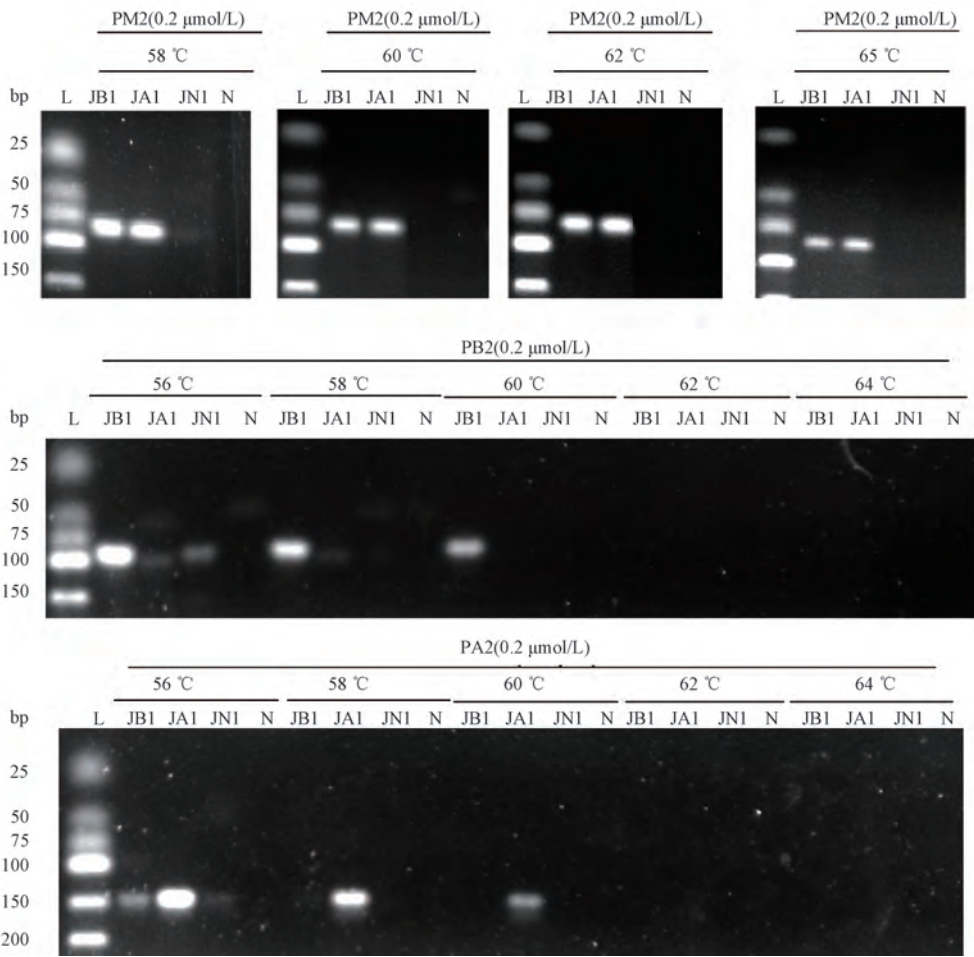


注: L、JB1、JA1、JN1、N 分别为 DNA Ladder、自制阳性制剂、自制伪品制剂、自制阴性制剂、空白对照。

图 1 循环数优化电泳图 (退火温度 60 ℃)

图 2 显示, 当退火温度较低时, 引物 PM2 对自制阴性制剂出现了非特异性扩增, 表明除麸炒僵蚕外的其余饮片对特异性 PCR 扩增有一定影响, 而逐步升高至 60、62、65 ℃ 后, 未观察到非特异性扩增条带; 当退火温度为 56 ℃

时, PB2、PA2 均出现了一定程度的非特异性扩增, 而继续升高至 58、60、62、64 ℃ 时在产物的电泳分析泳道中均未观察到非特异性扩增, 故最终选择 60 ℃ 作为最适退火温度。在此基础上建立了 PCR 扩增条件, 见表 2。



注：L、JB1、JA1、JN1、N 分别为 DNA Ladder、自制阳性制剂、自制伪品制剂、自制阴性制剂、空白对照。

图 2 退火温度优化电泳图

表 2 PCR 扩增条件

程序	特异性引物		
	PM2	PB2	PA2
预变性	95 °C (3 min)		
变性	95 °C (30 s)		
退火	60 °C (30 s)		
延伸	72 °C (1 min)		
循环数	35	40	40
终延伸	72 °C (7 min)		

2.5 特异性、灵敏度考察 将 10 批正品及其伪品、阴性制剂按“2.2”项下方法制备供试品溶液作为模板，并在表 2 条件下分别以引物 PM2、PB2、PA2 进行 PCR 扩增及电泳分析，结果见图 3。由此可知，每对引物均可扩增出对应物种的目的片段，呈现出特异性条带，即正品、伪品总 DNA 经引物 PM2 扩增后均在 82 bp 处观察到明亮的扩增条带（家蚕 DNA 片段）；正品总 DNA 经引物 PB2 扩增后，在 94 bp 处产生明亮的扩增条带（白僵菌 DNA 片段）；伪品中 DNA 经引物 PA2 扩增后，在 144 bp 处观察到了明亮的扩增条带（绿僵菌 DNA 片段），同时以上扩增中均未观察到非特异性条带，表明该方法具有良好的特异性。

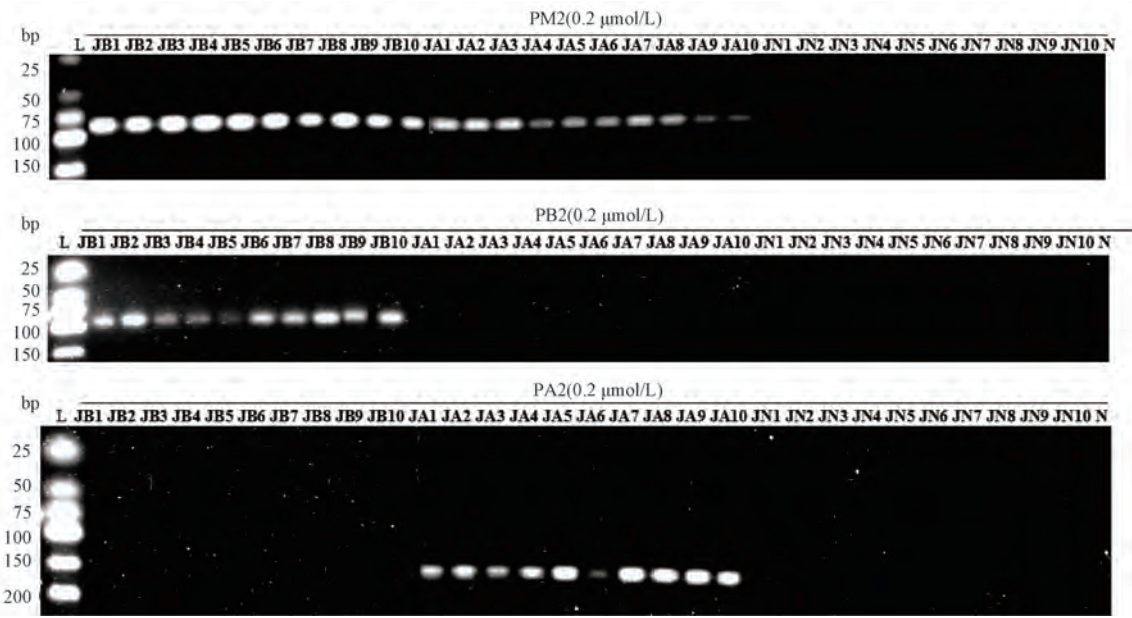
将正品、伪品的供试品溶液以十倍法依次稀释，并以

其为模板进行 PCR 扩增，结果见图 4。由此可知，当稀释至 10、1.0、0.10 ng/μL 时，经引物 PM2、PB2 扩增后可检测出家蚕、白僵菌条带，但进一步稀释至 0.010、0.001 0 ng/μL 时未检测出相应条带；当稀释至 10、1.0、0.10、0.010 ng/μL 时，经引物 PA2 扩增后可检测出绿僵菌条带，但进一步稀释至 0.001 0 ng/μL 时未检测出相应条带，表明引物 PM2、PB2 的检测灵敏度均为 0.10 ng/μL，而引物 PA2 为 0.010 ng/μL。

2.6 僵蚕成分鉴定 精密称取 8 批市售品粉末，每批 20.0 mg，按“2.2”项下方法提取、纯化 DNA，在“2.4”项条件下扩增，结果见图 5、表 3。由此可知，各批样品均检出家蚕 DNA，其中 6 批还检出白僵菌 DNA 但未发现绿僵菌 DNA，表明其所含僵蚕为正品；另外 2 批（JS2、JS5）虽然检出家蚕，但既未检出白僵菌 DNA，也未检出绿僵菌 DNA，真伪存疑。

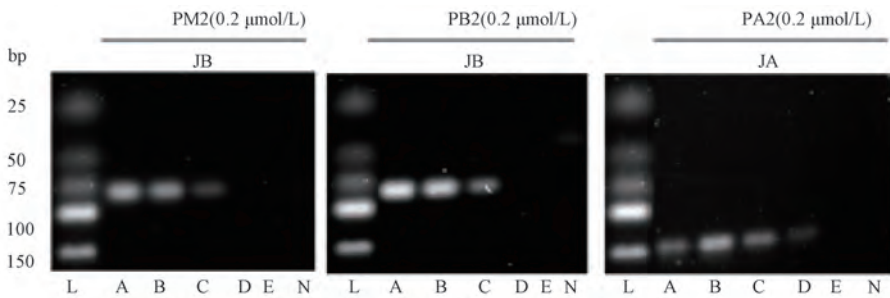
3 讨论与结论

中成药所含成分的显微特征通常较弱，其鉴定难度远胜于药材和饮片，尤其是含动物药的品种，由于它富含生物大分子，长期以来对其指标性成分的研究较少，缺乏专属性质鉴定手段。另外，中成药中以动物药炮炙品或深度加



注：L、JB1~JB10、JA1~JA10、JN1~JN10、N 分别为 DNA Ladder、10 批自制阳性制剂、10 批自制伪品制剂、10 批自制阴性制剂、空白对照。

图 3 特异性验证电泳图



注：L、A~E、N 分别为 DNA Ladder，10、1.0、0.10、0.010、0.001 0 ng/μL 模板 DNA，空白对照。

图 4 灵敏度检测电泳图

表 3 市售金嗓清音丸中僵蚕成分鉴定结果

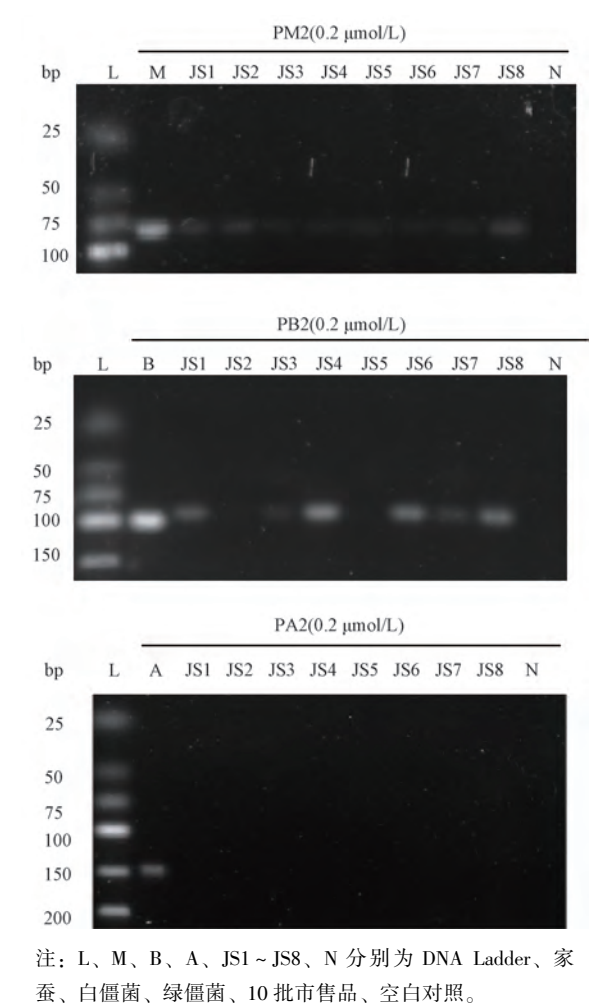
编号	扩增结果		
	家蚕	白僵菌	绿僵菌
JS1	+	+	—
JS2	+	—	—
JS3	+	+	—
JS4	+	+	—
JS5	+	—	—
JS6	+	+	—
JS7	+	+	—
JS8	+	+	—

注：+表示检出，—表示未检出。

工品、贵重动物药为原料，常同时含有多种相关成分，而且在生产过程中制法繁多，并加入了大量辅料，这种复杂背景易于在检验过程中引起干扰。

研究表明，多拷贝 *mtDNA* 在深加工产品中比单拷贝核 DNA 有更高的生存机会^[18-19]，有望作为中药处方制剂中动物药成分的专属性鉴定依据。本实验以金嗓清音丸中僵蚕

成分为对象，基于家蚕、白僵菌、绿僵菌 *mtDNA* 序列的差异设计了新颖的特异性引物，通过 PCR、电泳分析检出僵蚕及其常见伪品的基原。结果显示，8 批样品有 2 批仅检出家蚕 DNA，未检出白僵菌、绿僵菌 DNA，可能是它们在生产过程中仅使用了家蚕、黑死蚕所致，也有可能是麸炒僵蚕投料量低或在制备过程中有所损失，从而导致 DNA 量低



注：L、M、B、A、JS1~JS8、N 分别为 DNA Ladder、家蚕、白僵菌、绿僵菌、10 批市售品、空白对照。

图 5 市售金噪清音丸检测电泳图

于检测限，而且上述方法专属性强，灵敏度高，避免了 COI 条形码技术无法鉴定混合物、产物需要测序等不足，有助于更好地监控该制剂的质量，并与其他中成药中动物药的专属性鉴定提供了参考。但家蚕、白僵菌、绿僵菌这 3 种基原的 DNA 同时存在于僵蚕生品、麸炒品中，故不能用于检识所用饮片是否为麸炒僵蚕，今后将进一步通过荧光定量 PCR 开展相关研究。

参考文献：

[1] 张仲景. 伤寒杂病论[M]. 北京：中医古籍出版社，2017.

[2] 张仲景. 金匱要略[M]. 北京：中医古籍出版社，2018.

[3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：2020 年版一部[S]. 北京：中国医药科技出版社，2020：392.

[4] 邱 乙，汪云伟，程元柳，等. 基于差异蛋白质鉴别僵蚕及其新型伪品[J]. 吉林中医药，2014，34(10)：1024-1026.

[5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：2020 年版一部[S]. 北京：中国医药科技出版社，2020：1171-1172.

[6] Jiang C, Jin Y, Zhao X L, *et al.* Rapid and robust authentication of deer antler velvet product by fast PCR-RFLP analysis[J]. *Mitochondrial DNA A DNA Mapp Seq Anal*, 2018, 29(2)：266-272.

[7] Hou F X, Wen L L, Peng C, *et al.* Identification of marine traditional Chinese medicine dried seahorses in the traditional Chinese medicine market using DNA barcoding[J]. *Mitochondrial DNA A DNA Mapp Seq Anal*, 2018, 29(1)：107-112.

[8] 黄巧丽，刘振亮，孙文文，等. 四叶参内生真菌生物活性及分子鉴定[J]. 中成药，2018，40(11)：2566-2569.

[9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：2020 年版四部[S]. 北京：中国医药科技出版社，2020：490-492.

[10] 黄璐琦，袁 媛，蒋 超，等. 动物药材分子鉴别现状与策略[J]. 中国现代中药，2017，19(1)：1-10.

[11] Yang H, Yu P T, Lu Y, *et al.* A novel non-sequencing approach for rapid authentication of *Testudinis Carapax* et *Plastrum* and *Trionycis Carapax* by species-specific primers[J]. *R Soc Open Sci*, 2018, 5(4)：172140.

[12] 周辰杰，党 平，周翠霞，等. 鹿科不同物种血液的分子鉴定[J]. 中成药，2019，41(10)：2530-2535.

[13] 杨鹏飞，杨成宇，林 玲，等. 天蚕片、天蚕胶囊中僵蛹成分鉴定[J]. 中成药，2020，42(11)：3096-3099.

[14] 李 楠，虞平添，焦兆群，等. 特异性扩增技术鉴定龟甲与鳖甲[J]. 中成药，2018，40(10)：2328-2333.

[15] 张前程，文红梅，刘 娜，等. 广地龙特异性引物序列的设计及其混伪品的鉴别[J]. 南京中医药大学学报，2020，36(3)：408-413.

[16] 王文秀，高 晗，张环宇，等. 宽体金线蛭的特异性 PCR 分子鉴定[J]. 天津中医药，2020，37(11)：1299-1303.

[17] Yang H, Zhou Y, Yu P T, *et al.* A novel PCR-based technology for rapid and non-sequencing authentication of *Bombyx batryticatus* using species-specific primers[J]. *Nat Prod Res*, 2019, 33(9)：1251-1256.

[18] Amaral J S, Santos C G, Melo V S, *et al.* Authentication of a traditional game meat sausage (Alheira) by species-specific PCR assays to detect hare, rabbit, red deer, pork and cow meats[J]. *Food Res Int*, 2014, 60：140-145.

[19] Kim M J, Kim H Y. Species identification of commercial jerky products in food and feed using direct pentaplex PCR assay[J]. *Food Control*, 2017, 78：1-6.