·基础研究·

龟甲的特异性 PCR 及高分辨率熔解曲线技术鉴别方法研究△

张雪艳[1,2]，袁媛[1*]，胡启跳[1]，蒋超[1*]，方成武[2]

1. 中国中医科学院 中药资源中心 道地药材国家重点实验室培育基地，北京　100700；
2. 安徽中医药大学 药学院，安徽　合肥　230012

［摘要］ **目的**：建立高效、稳定的龟甲 Testudinis Carapax et Plastrum DNA 鉴别方法。**方法**：利用龟甲的特异性聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction，PCR)鉴别方法和高分辨率熔解曲线(HRM)鉴别方法，根据龟甲及其混伪品 COI 序列差异，寻找特异性单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism，SNP)位点设计鉴别引物，并对 PCR 反应条件进行优化；并使用通用引物扩增 COI 区域，产物直接进行 HRM 分析。**结果**：当退火温度为 60 ℃，循环次数为 35，使用设计的龟甲特异性鉴别引物 GJ-360. F/R 进行 PCR 扩增，经扩增均获得约 360 bp 特异性鉴别条带，混伪品皆无条带；使用通用引物 RonM-tl 和 Vl-tl 进行 PCR 扩增，产物使用 HRM 分析，龟甲药材在模板 DNA 质量浓度为 3.5 ~ 87.9 ng·μL^{-1}、引物浓度为 0.2 μmol·L^{-1}、镁离子浓度为 2.0 mmol·L^{-1}的条件下，龟甲药材标准熔解曲线为双峰，其 T_m 均值分别为(83.15 ± 0.76)、(87.53 ± 0.69)℃。**结论**：特异性 PCR 和 HRM 均可作为一种快速准确鉴别龟甲正伪品的鉴定方法。

［关键词］ 龟甲；特异性聚合酶链式反应；分子鉴定；高分辨率熔解曲线

［中图分类号］ R282.74；R284　［文献标识码］ A　［文章编号］ 1673-4890(2019)09-1215-06

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20190410002

Identification of Testudinis Carapax et Plastrum by Specific PCR Method and High-resolution Melting Analysis

ZHANG Xue-yan[1,2]，YUAN Yuan[1*]，HU Qi-tiao[1]，JIANG Chao[1*]，FANG Cheng-wu

1. *State Key Laboratory Breeding Base of Dao-di Herbs，China Academy of Chinese Medical Sciences，National Resource Center for Chinese Materia Medica，Beijing* 100700，*China*；
2. *Anhui University of Chinese Medicine，Hefei* 230012，*China*

［**Abstract**］ **Objective**：To establish an efficient and stable DNA identification method for Testudinis Carapax et Plastrum(TCP). **Methods**：Based on the COI sequence differences between TCP and its adulterants，specific SNP loci were designed and primers were identified by using specific PCR and high-resolution melting curve(HRM) methods，and the conditions of PCR reaction were optimized. The COI region was amplified by universal primers，and the products were analyzed by HRM directly. **Results**：When the annealing temperature was 60 ℃ and the cycle number was 35，a specific band of 360 bp was visual on the gel electropherogram were using the designed TCP specific primer Guijia. F/R. high-resolution melting curve (HRM) technology was also applied to identification of TCP using COI universal primers. The annealing temperature was 60 ℃ and cycle number was 40. With chosen appropriate DNA template concentration，and the primer concentration as well as Mg^{2+} concentration，an HRM model was established. The high melting curve of TCP was bimodal melting curve under these conditions，when the DNA template concentration was 3.5 – 87.9 ng·μL^{-1}，the primer concentration was 0.2 μmol·L^{-1}，Mg^{2+} concentration was 2.0 mmol·L^{-1}，the Tm value of HRM curve was(83.15 ± 0.76) and(87.53 ± 0.69)，respectively. **Conclusion**：The results show that these two methods could use as rapid and accurate identification method for identify TCP and its adulterants.

［**Keywords**］ Testudinis Carapax et Plastrum；specific PCR；molecular identification；High-resolution melting curve

△［基金项目］ 中央本级重大增减支项目(2060302)；中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(ZZ10-008)

*［通信作者］ 蒋超，助理研究员，研究方向：中药 DNA 分子鉴定研究；Tel：(010)64087649，E-mail：jiangchao0411@126.com
袁媛，研究员，研究方向：中药鉴定与分子生药学研究；Tel：(010)64087649，E-mail：y_yuan0732@163.com

龟甲是中国的传统名贵药材之一，来源于龟科动物乌龟 *Chinemys reevesii*（Gray）的背甲及腹甲，具滋阴潜阳、益肾强骨、养血补心、固经止崩之功效[1]。龟甲在临床上应用广泛，且为细贵中药材，极易混伪，对破碎的、不完整的龟甲也无法进行客观、准确鉴别。龟甲混伪品有近 20 种，包括巴西龟、马来闭壳龟、黄缘闭壳龟、黄喉拟水龟、平胸龟、地龟、四眼斑水龟、印度棱背龟、庙龟、锯缘龟、凹甲陆龟、缅甸陆龟等[2-6]，尤其是巴西龟在龟甲伪品中极为常见。

近年来 DNA 分子鉴别技术快速发展，位点特异性 PCR、DNA 测序等技术开始用于动物类药材的鉴别，多种动物药材已建立分子鉴别方法[7-11]。刘晓帆等[12]已使用基于 COI 序列的 DNA 条形码技术鉴定龟甲及其混伪品，邓莹等[13]根据 Cytb 序列设计特异性引物，使用酚-三氯甲烷法提取 DNA 并建立了龟甲特异性 PCR 鉴别方法。高分辨率熔解曲线技术（High resolution melting，HRM）因其具有高通量、低成本、简单快捷、和闭管操作等优点[14-15]，避免了溴化乙锭、聚丙烯酰胺等有害试剂的使用和紫外照射，且有望检出正伪掺杂的样品，在中药 DNA 分子鉴定领域已有应用[16-19]。

本研究建立了龟甲药材和饮片 DNA 快速提取方法，建立并比较了龟甲特异性 PCR 鉴别方法和高分辨率熔解曲线鉴别方法的优劣，进行了系统的方法学考察，可快速、准确鉴别龟甲及其常见混伪品。

1　材料

1.1 药材

龟甲对照药材购自中国食品药品检定研究院（批号：121494-201604）。样品购自河北安国药材市场、安徽亳州药材市场、广州玉林药材市场、云南昆明药材市场。共获得龟甲与其混伪品 42 批，实验样品经张继教授、李军德教授鉴定，存于中国中医科学院中药资源中心，见表 1。

1.2 试剂

柱式骨骼 DNAout 试剂盒（北京天恩泽公司，批号：91102-50）；Ex *Taq*（Takara 公司，批号：RR001Q）；SpeedSTAR HS *Taq*（Takara 公司，批号：RR070Q）；2 × T5 Super PCR Mix（北京擎科新业生物技术有限公司，批号：TSE005）；r *Taq* DNA（Takara 公司，批号：DR100A）；金牌 Mix Green PCR（北京擎科新业生物技术有限公司，批号：TSE101）；MightyAmp DNA 聚合酶（Takara 公司，批号：R071Q）；LightCycler480 High Resolution Melting Master（Roche 公司，批号：4909631001）；2000 bp DNA Marker（Takara 公司，批号：3427Q）。

表 1　龟甲样品

No.	名称	物种学名	数量	鉴定人
1	龟甲药材	*Chinemys reevesiis*	18	张继
2	龟甲饮片	*C. reevesiis*	6	张继
3	巴西龟	*Trachemys scripta*	7	张继、李军德
4	马来龟	*Malayemys subrtijuga*	1	张继
5	拟鳄龟	*Chelydra serpentina*	2	张继
6	锯缘龟	*Pyxidea mouhotii*	1	张继
7	缅甸陆龟	*Indotestudo elongata*	2	李军德
8	平胸龟	*Platuysternon megacephalum*	1	李军德
9	黄喉拟水龟	*Mauremys mutica*	1	李军德
10	中华花龟	*Ocadia sinensis*	1	李军德
11	黄缘闭壳龟	*Cistoclemmys flavomarginata*	1	李军德
12	四眼斑水龟	*Sacalia quadriocellata*	1	李军德

1.3 仪器

Veriti™ 型、GeneAmp 9700 型（Applied Biosystems 公司）；TC-512 型（Techne 公司）；PTC-100 型（Gene 公司）；PCR 仪、LightCycler480 型实时荧光定量 PCR 仪（Roche 公司）；SYNGENE 凝胶成像系统（GENE 公司）。

2　方法

2.1 DNA 提取

取药材约 50 mg，粉碎成粉末。取粉末 20 mg，置 2 mL 离心管中，使用柱式骨骼 DNA 提取试剂盒提取 DNA，加入 1000 μL 65 ℃预热的提取缓冲液，充分混匀；65 ℃水浴 30 min；加入 300 μL 缓冲液及 200 μL 三氯甲烷；充分混匀，12 000 r·min^{-1}下离心 5 min；取 500 μL 上清至 1 个新的 1.5 mL 离心管，加入 500 μL 上柱缓冲液，充分混匀；加入 DNA 纯化柱中，12 000 r·min^{-1}下离心 1 min；弃穿透液；加入洗脱液 500 μL，12 000 r·min^{-1}下离心 1 min；弃穿透液，加入洗脱液 500 μL，12 000 r·min^{-1}下再离心 1 min；弃穿透液，离心 DNA 纯化柱 2 min；加入 50 μL 无菌双蒸水，室温放置 2 min 后 12 000 r·min^{-1}下离心 1 min，取穿透液稀释 10 倍用于 PCR 反应。

2.2 特异性引物的设计

从 GenBank 查找乌龟及巴西龟、黄喉拟水龟、

拟鳄龟、平胸龟、中华花龟、缅甸陆龟伪品的 COI 序列。用 BioEdit 软件进行序列比对，找到差异片段，并设计鉴别引物：GJ-360. F 5′-GCTTTG-GAAACTGACTTGTACCTTTAATG-3′ 和 GJ-360. R 5′-GAGAGTAGTAATAGGACGGCTGTAATAAGTTCA-3′。

2. 3 龟甲特异性 PCR 鉴别方法

在 200 μL 离心管中进行 PCR 反应。反应总体积为 25 μL，包括 10 × PCR 缓冲液 2. 5 μL、dNTP (2. 5 mmol·L^{-1})1 μL、鉴别引物(10 μmol·L^{-1})各 0. 4 μL、*Taq* DNA 聚合酶(5 U·L^{-1})0. 2 μL 和 DNA 模板 1 μL，用无菌水补足反应体积。PCR 反应程序：95 ℃预变性 5 min，循环反应 35 次(95 ℃ 30 s，60 ℃ 30 s，72 ℃ 30 s)，72 ℃延伸 5 min，4 ℃保温结束反应。PCR 产物经 1. 5% 琼脂糖凝胶电泳，EB 染色，置于凝胶成像仪上或紫外透射仪上成像。并考察主要参数：PCR 退火温度、PCR 循环次数、DNA 模板用量、DNA 聚合酶种类和 PCR 仪类型对龟甲特异性 PCR 鉴别方法的影响，获得最优鉴别条件。

2. 4 熔解曲线分析

分别以龟甲药材 DNA 为模板，调整 DNA 浓度在合适范围内，在 Light Cycler 480 型实时荧光定量 PCR 仪上进行 PCR 扩增，而后直接进行熔解曲线分析。PCR 反应总体积 20 μL，PCR 反应体系：2 × High Resolution Melting Master Mix 10 μL、$MgCl_2$ (25 mmol·L^{-1})1. 6 μL、COI 通用引物序列 RonM-tl 5′-TGTAAAAGGAGGGCCAGTGGMGCMCCMGATATR-GCATTCCC-3′；VRL-tl 5′-CAGGAAACAGCTAT-GACTAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA-3′。引物(10 μmol·L^{-1})各 0. 4 μL、模板 DNA 1 μL、加 ddH_2O 补齐到 20 μL。反应程序为：95 ℃预变性 10 min，95 ℃变性 30 s、60 ℃退火 30 s、72 ℃延伸 45 s，40 循环；而后进入高分辨熔解曲线分析程序：95 ℃ 1 min，40 ℃ 1 min，66 ℃ 1 s；40 ℃冷却 10 s，每秒采集 25 个数据，获得龟甲及其混伪品的熔解曲线。

2. 5 熔解曲线模型的建立

随机选取 3 批龟甲药材，使用 COI 通用引物进行 PCR 扩增和熔解曲线分析；利用罗氏 Lightcycler 480 Software 1. 5 软件建立龟类熔解曲线模型，对其精密度、重复性进行考察。

2. 6 PCR 反应体系适用性分析

考察模板 DNA 用量、引物浓度、镁离子浓度对熔解曲线峰形和 T_m 值的影响，从而确定可依据峰形和 T_m 值鉴别龟甲药材真伪的适合条件。

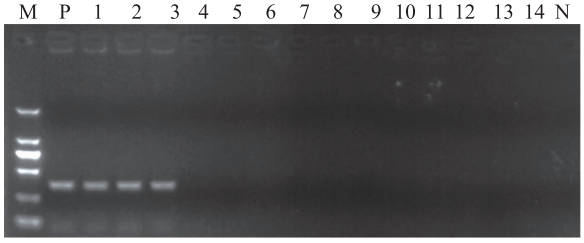
3　结果与分析

3. 1 龟甲的特异性 PCR 鉴别方法条件确定

使用设计的龟甲特异性鉴别引物进行 PCR 扩增，并依次考察 PCR 鉴别体系和鉴别条件关键因素对龟甲特异性 PCR 鉴别方法的影响，以获得最优鉴别条件。当退火温度设定为 58、60、62 ℃，结果表明，在 58 ~ 60 ℃时，龟甲正品均能扩增得到 360 bp 的条带，混伪品缅甸陆龟、黄缘拟水龟、中华花龟、四眼斑水龟、巴西龟等均无条带，使用相同方法依次对 PCR 循环次数、模板 DNA 用量、*Taq* 酶种类和 PCR 仪型号进行考察，当退火温度为 60 ℃，PCR 循环次数为 30 个循环，模板 DNA 浓度为 20 ng·μL^{-1}，使用无 5′-3′的 *Taq* DNA 聚合酶进行扩增时获得最优鉴别结果，龟甲正品均扩增获得 360 bp 特异性鉴别条带，混伪品无条带。其中 *Taq* 酶种类和模板 DNA 用量对鉴别结果有较大影响，高保真 DNA 聚合酶扩增保真率虽高，但效率低，产物获得率低，易出现假阴性结果。模板 DNA 用量过高(100 ng)易出现假阳性鉴别结果，混伪品均可出现假阳性条带，见表 2。

3. 2 龟甲特异性 PCR 鉴别方法的适用性考察

采用 **3. 1** 确定的特异性 PCR 鉴别体系，对 24 批龟甲样品及 18 批伪品进行鉴别(见图 1 ~ 2)，结果表明，该体系能稳定、准确地鉴别龟甲药材和饮片。

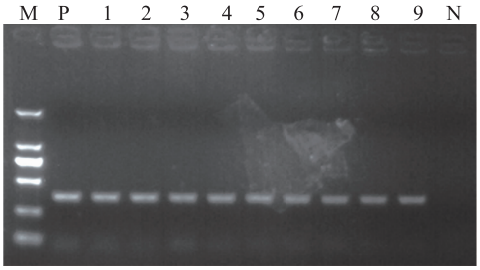


注：M. DL2000 Marker；P. 阳性对照；N. 空白对照(dd H_2O 为模板)；1 ~ 3. 龟甲；4. 巴西龟；5. 马来龟；6. 拟鳄龟；7. 锯缘龟；8. 缅甸陆龟；9. 平胸龟；10. 黄喉拟水龟；11. 中华花龟；12. 黄缘闭壳龟；13. 四眼斑水龟；14. 安南龟。

图 1　龟甲正伪品鉴别结果

表 2　龟甲特异性 PCR 鉴别条件考察结果

项目	参数				
	退火温度/℃	PCR 循环次数	模板 DNA/ng	*Taq* 酶种类	PCR 仪型号
参数值	58、60、62	25、30、35、40	100、20、4	RTaq、Ex *Taq*、pfu *Taq*	ABI 9700、Veriti、PTC-100
适宜范围	58 ~ 62	30 ~ 40	4 ~ 20	均可使用	均可使用
最优条件	60	35	20	r*Taq*	ABI 9700

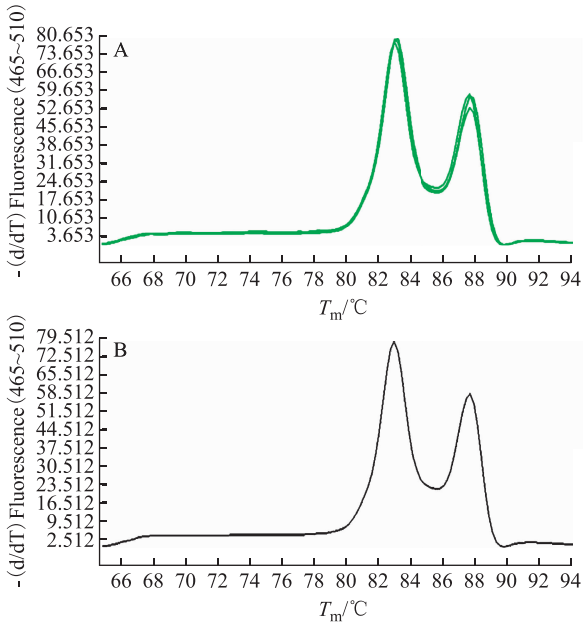


注：M. DL2000 Marker；P. 阳性对照；N. 空白对照（dd H_2O 为模板）；1 ~ 6. 不同市场来源龟甲药材；7 ~ 9. 龟甲饮片。

图 2　不同批次龟甲特异性 PCR 鉴别结果

3.3 龟甲的高分辨率熔解曲线鉴别方法的建立

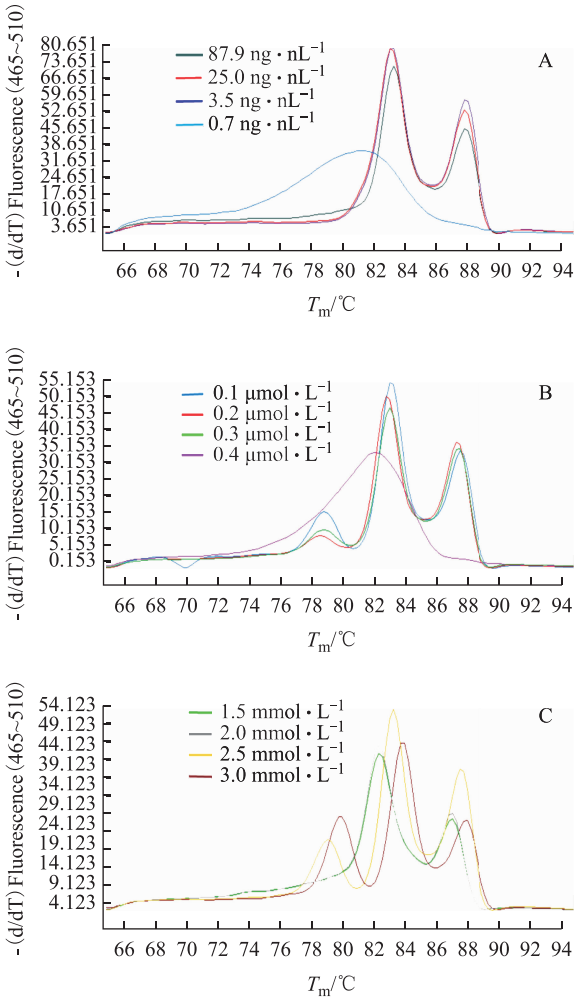
3.3.1 熔解曲线模型的建立　使用高分辨率熔解曲线技术对龟甲进行鉴别，建立其熔解曲线模型。随机选择不同来源的龟甲药材 3 批，分别提取其 DNA，使用 COI 通用引物进行 PCR 扩增，并进行熔解曲线分析，结果表明，龟甲熔解曲线为双峰，其 T_m 值分别为（83.15 ± 0.76）、（87.53 ± 0.69）℃，RSD 分别为 0.91%、0.80%。对同一批龟甲 DNA 样品，进行熔解曲线分析，重复 3 次，其熔解曲线峰形一致，RSD 值在分别在 0.30% ~ 0.80%、0.20% ~ 0.80%（见图 3）。



注：A. 3 批龟甲药材熔解曲线；B. 龟甲 COI 熔解曲线参考模型。

图 3　龟甲药材熔解曲线模型的建立

3.3.2 高分辨率熔解曲线技术鉴别反应体系适用性分析　选取龟甲 DNA，测定其浓度，并依次稀释为 87.9、25.0、3.5、0.7 ng·μL^{-1}，以 COI 作为引物进行扩增，获得熔解曲线，并分析不同浓度模板 DNA 对龟甲熔解曲线峰形和 T_m 值的影响。结果表明，模板 DNA 在 3.5 ~ 87.9 ng·μL^{-1} 均获得较为均一的熔解曲线，可用于龟甲药材分子鉴别（见图 4A）。



注：A. 不同浓度模板 DNA 对龟甲熔解曲线峰形和 T_m 值的影响；B. 不同引物浓度对龟甲熔解曲线峰形和 T_m 值的影响；C. 不同浓度 $MgCl_2$ 对龟甲熔解曲线峰形的影响。

图 4　龟甲高分辨率熔解曲线鉴别条件考察结果

依据 Light Cycler 480 High Resolution Melting Master 说明书中引物最适浓度为 0.1 ~ 0.3 μmol·L^{-1}，在20 μL 反应体系中分别加入 0.2、0.4、0.6、0.8 μL 引物(母液浓度为 10 μmol·L^{-1})，获得其熔解曲线，并分析不同引物浓度对龟甲熔解曲线峰形和 Tm 值的影响。结果表明，引物为0.2 μmol·L^{-1}时可形成稳定的熔解曲线峰形(见图4B)。

在 20 μL 反应体系中分别加入 1.5、2.0、2.5、3.0 μL 的 $MgCl_2$ 溶液(母液浓度为 25 mmol·L^{-1})，获得其熔解曲线，并分析不同引物浓度对龟甲熔解曲线峰形和 Tm 值的影响。结果表明，引物浓度为 2.0 mmol·L^{-1}时可形成稳定的熔解曲线峰形(见图4C)。

3.3.3 高分辨率熔解曲线技术鉴别龟甲正伪品　选取4 种常见龟甲伪品巴西龟、马来龟、拟鳄龟、黄喉拟水龟，分别提取其总 DNA，进行熔解曲线分析，获得伪品熔解曲线。对龟甲及其伪品熔解曲线进行比较，结果表明，龟甲混伪品 HRM 曲线均与正品有显著差异，可以相互区分(见图 5)。

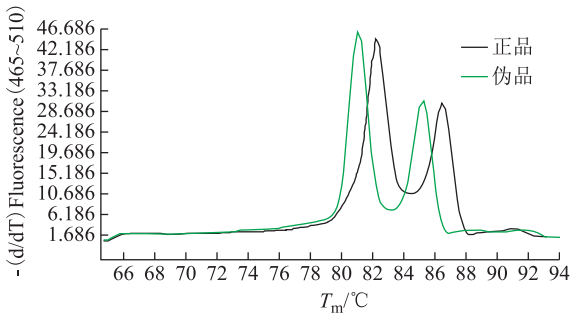


图 5　使用高分辨率熔解曲线技术鉴别龟甲正品及其混伪品(以巴西龟为例)

4　讨论

PCR 鉴别准确性取决于 DNA 提取质量。动物药材来源广泛，其中，部分动物药材来自于甲壳、皮膜、分泌物、角质物等。由于这些药材在市场上流通时间长、加之高温等因素，使得药材 DNA 严重降解，从而给 DNA 提取造成麻烦。此外，*Taq* 酶种类和模板 DNA 的用量也会对鉴别结果有较大影响，高保真 DNA 聚合酶扩增保真率虽高，但效率低，产物获得率低，易出现假阴性结果。模板 DNA 用量过高(100 ng)易出现假阳性鉴别结果，混伪品均可出现假阳性条带。另外，笔者对比了十二烷基硫酸钠法(SDS)、十六烷基三甲基溴化铵法(CTAB)、高盐低 pH 法及 3 种不同的柱式 DNA 提取试剂盒对龟甲 DNA 提取的效果，发现在不进行脱钙的情况下，仅柱式骨骼 DNA 提取试剂盒对龟甲药材和蒸制饮片具有较好的提取效果，基于硅胶膜离心柱的方法相对其他方法操作更为简单，易于标准化，且在角、甲类动物药材上具有良好的提取效果，已用于羚羊角、鹿角等动物药材的 DNA 提取[20-21]，有望拓展到其他角、甲类药材的提取。

本文建立了快速简便的龟甲 DNA 提取和 DNA 鉴定方法，使用特异性 PCR 鉴别可在 4 h 内获得鉴定结果，该方法既可用于龟甲药材亦可用于龟甲饮片，有助于龟甲的质量控制，提高龟甲质量标准。同时本文也建立了龟甲的高分辨率熔解曲线技术鉴别方法，使用 HRM 鉴别可在 3 h 内获得鉴别结果，且 HRM 可替代凝胶电泳对 PCR 产物及其酶切片段进行检测，避免使用溴化乙锭、聚丙烯酰胺等有害试剂和紫外照射。然而，在对龟甲饮片进行扩增时发现，无论是使用通用引物 L1490/H2198 或引物 RonM-tl/VRL-tl 均无法扩出条带，推测是龟甲饮片经高温水煮后 DNA 严重降解，难以扩增获得 400 bp 以上的条带，表明直接使用通用引物结合 HRM 的方法无法鉴别龟甲饮片，下一步可考虑针对龟甲及其混伪品的序列差异，根据 SNP 位点设计引物，建立特异性的 HRM 鉴别方法[22-23]。

参考文献

[1]　国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:180.

[2]　李悦,王淑芬. 龟甲的真伪鉴别[J]. 中草药,2000,31(11):68-69.

[3]　姚腊初. 平胸龟甲的动物来源与药材鉴别研究[J]. 卫生职业教育,2004,22(13):6.

[4]　金朝阳,陈政威. 龟甲及其 10 种混淆品的性状鉴别[J]. 时珍国医国药,2002,13(4):225.

[5]　刘中权,王义权,周开亚,等. 中药材龟甲及原动物的高特异性 PCR 鉴定研究[J]. 药学学报,1999,34(12):941-945.

[6]　吴平,周开亚,徐珞珊,等. 中药材龟甲的分子鉴定研究[J]. 药学学报,1998,33(4):65-70.

[7]　刘富艳,金艳,袁媛,等. 基于形态和 DNA 序列分析的海龙类药材商品的基原调查[J]. 世界中医药,2018,13(2):241-247.

[8]　何志一,唐先明,刘建辉,等. 快速 PCR 方法在哈蟆油真

伪鉴别中的应用研究[J]. 中国中药杂志,2017,42(13):2467-2472.

[9] 刘旭朝,周丽思,刘金欣,等. 基于 COI 序列的水牛角及其易混伪品 DNA 条形码鉴定研究[J]. 药学学报,2017,52(3):494-499.

[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] 陈康,蒋超,袁媛,等. 快速 PCR 方法在蛇类药材真伪鉴别中的应用[J]. 中国中药杂志,2014,39(19):3673-3677.

[12] 刘晓帆,刘春生,杨瑶珺,等. 基于 COI 基因的龟甲及其混伪品的 DNA 条形码研究[J]. 中国中药杂志,2013,38(7):947-950.

[13] 邓莹,李明成,张丽华. 复合聚合酶链反应鉴别龟甲正品与伪品的特征[J]. 中国药学杂志,2014,49(12):1022-1026.

[14] 陈康,蒋超,袁媛,等. 高分辨率熔解曲线技术及其在中药 DNA 分子鉴定中的应用[J]. 药学学报,2015,50(12):1581-1588.

[15] 陈斌,雷秀霞,周小棉. 高分辨率熔解曲线技术及其在分子诊断中的应用进展[J]. 分子诊断与治疗杂志,2009,1(2):120-124.

[16] 过立农,刘杰,赵春艳,等. 基于 DNA 条形码和高分辨率熔解曲线技术快速鉴别肉苁蓉[J]. 药物分析杂志,2018,38(4):665-671.

[17] 张梦婷,孙伟,师玉华,等. 基于 HRM 的常见伞形科香辛料快速鉴定[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(6):26-31.

[18] 陈康,蒋超,金艳,等. 人参属中药材高分辨率熔解曲线鉴定及其方法学考察[J]. 药物分析杂志,2017,37(1):64-73.

[19] 孙伟,熊超,李景剑,等. 高分辨率熔解曲线技术在多基原药材升麻鉴定中的应用[J]. 药学学报,2016,51(10):1638-1642.

[20] JIANG C,JIN Y,ZHAO X,et al. Rapid and robust authentication of deer antler velvet product by fast PCR-RFLP analysis[J]. Mitochondrial DNA A,2018,29(2):266-272

[21] YAN D,LUO J Y,HAN Y M,et al. Forensic DNA barcoding and bio-response studies of animal horn products used in traditional medicine[J]. PloS one,2013,8(2):e55854.

[22] REED G H,WITTWER C T. Sensitivity and specificity of single-nucleotide polymorphism scanning by high-resolution melting analysis[J]. Clinic Chem,2004,50(10):1748-1754.

[23] DONG X,JIANG C,YUAN Y,et al. Application of high-resolution melting analysis for authenticity testing of valuable Dendrobium commercial products[J]. J Sci Food Agri,2018,98(2):549-558.

(收稿日期：2019-04-10　　编辑：王笑辉)