

doi:10.3969/j.issn.1672-5565.2014.01.05

## 贵州桐梓何首乌 rDNA ITS 序列分析

许朋,牛宪立,姬可平\*

(遵义医学院珠海校区,广东 珠海 519041)

**摘要:**以改进的 CTAB 法对何首乌总基因组 DNA 进行提取,采用通用引物对不同来源的何首乌 rDNA ITS 序列进行 PCR 扩增、测序和序列分析。结果表明,何首乌 rDNA 完全序列片段长度共约 652 bp,其中 ITS1 的长度为 202 bp,5.8 S 的长度为 161 bp,ITS2 长度为 232 bp,与其近缘种 ITS 序列间存在明显差异。其 rDNA ITS 序列在分子水平上为鉴别何首乌提供了参考依据。

**关键词:**何首乌;ITS 序列;PCR

**中图分类号:**R978.1+6 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-5565(2014)-01-027-06

## Analysis of rDNA ITS sequences of polygonum multiflorum Thunb from Tongzi of Guizhou Province

XU Peng, NIU Xianli, JI Keping\*

(Zhuhai Campus of Zunyi Medical collage, Guangdong Zhuhai 519041, China)

**Abstract:** With improved CTAB method, Polygonum total genomic DNA was extracted using universal primers for different sources of Polygonum rDNA ITS sequences for PCR amplification, sequencing and sequence analysis. The results showed that Polygonum rDNA sequence is a 652 bp fragment, in which the lengths of ITS1, 5.8 S and ITS2 are 202 bp, 161 bp, and 232 bp, respectively. The ITS sequences indicate that Polygonum has significant difference from its related species. The rDNA ITS sequences at the molecular level can provide a reference for the identification of Polygonum.

**Keywords:** Polygonum multiflorum; ITS sequence; PCR

何首乌 (*Polygonum multiflorum* Thunb) 为蓼科植物,分布于河南、四川、贵州、广东等地区。中草药何首乌的干燥块根部分,具有滋补肝肾、益精血、抗氧化、抗肿瘤、降低胆固醇、抑制动脉粥样硬化、抑菌消炎及增强记忆等多种功效<sup>[1]</sup>,在临床上应用十分广泛。药用何首乌近缘种包括木藤蓼 (*Fallopia aubertii*), 齿叶蓼 (*Fallopia denticulate*), 毛脉蓼 (*Fallopia multiflora* var. *cilliinerve*) 等,这些近缘种与何首乌不仅在外形上很相似,化学成分也有部分相同,在药材使用上存在互混、互代、以假充真等现象,因而影响了用药的安全性和有效性,常规方法很难把它们区分开,所以考虑寻找一种有效的能够区分何首乌及其近缘种的分子手段<sup>[2]</sup>,能够很好的在分

子水平上鉴别何首乌。

核糖体 rDNA 内转录间隔区 ITS 作为一种遗传标记,具有可遗传性和可识别性,已经被广泛应用于中药材鉴定和品质评价、植物种质资源鉴定、与亲缘关系、系统发育等不同方面的研究。目前,越来越多的研究者将 ITS 应用于药用植物的鉴别。ITS 序列在核基因组中具有高度重复性,总长度只有 500~700 bp,具有通用引物,对 DNA 模板质量要求不高,因此即使不是新鲜材料,从 DNA 有降解的中药材上也可顺利进行扩增反应<sup>[3]</sup>。ITS 在科属下使用较多,解决了一些种属间的关系,还发现 ITS 在居群间甚至个体间均有变异存在。

近年来,DNA 分析技术的发展,PCR 测序方法

收稿日期:2013-09-10;修回日期:2013-10-17.

作者简介:许朋,男,在读本科生,研究方向:生物化学与分子生物学;E-mail:1515965946@qq.com.

\*通信作者:姬可平,男,教授,研究方向:生物化学与分子生物学;E-mail:jlhxxj@sina.com.

已经被广泛应用到中药品种鉴别领域<sup>[4-5]</sup>。本研究通过采用 PCR 技术对 ITS 序列进行扩增测序后运用 MEGA5 软件分析比对,并进行遗传距离分析、构建系统发育树来比较研究何首乌与其近缘种的遗传差异,为探讨何首乌的系统发育关系和分子鉴定提供分子生物学依据和基础性资料<sup>[6]</sup>,对中药材 DNA 分子鉴别和野生资源品种的鉴定等具有一定的意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料与仪器

#### 1.1.1 实验样品

所用实验材料何首乌于 2011 年 4 月采集于贵州桐梓地区,均由牛宪立老师提供。

#### 1.1.2 主要实验试剂

(1)70%乙醇:量取 70 ml 的无水乙醇,30 ml 双蒸水,混匀。

(2)3 mol/L NaAc 溶液:称取无水乙酸钠 24.589 g,先加入双蒸水 80 ml 加热溶解,再加双蒸水定容至 100 ml,121 °C 灭菌 20 min,4 °C 保存。

(3)0.5 mol/L EDTA (pH = 8.0):称取 EDTA-2Na-2H<sub>2</sub>O 18.8 g,加入双蒸水 75 ml,用 NaOH 调 pH 至 8.0,加双蒸水定容至 100 ml。

(4)0.5 mol/L Tris-HCl (pH = 8.0):称取 Tris 30.27 g,加入双蒸水 350 ml,用 HCl 调 pH 至 8.0,再加双蒸水定容至 500 ml。

(5)TE 液:量取 0.5 mol/L Tris-HCl (pH = 8.0) 4 ml,0.5 mol/L (pH = 8.0) EDTA (乙二胺四乙酸) 0.4 ml,加入双蒸水定容至 200 ml,分别装至 3 个干净小瓶中,121 °C 灭菌 15min,4 °C 保存。

(6)CTAB (十六烷基三甲基溴化铵)提取缓冲液:称取 CTAB 10 g,加 70 ml 双蒸水溶解,再取 0.5 mol/L Tris-HCl (pH = 8.0) 40 ml,0.5 mol/L EDTA (pH = 8.0) 8 ml,5 mol/L NaCl 56 ml,加双蒸水定容到 200 ml,室温下保存,使用前先加入 0.2% 的 β-巯基乙醇。

(7)5xTBE 溶液:称取 Tris (三羟甲基氨基甲烷) 16.3 g,硼酸 8.28 g,0.5 mol/L EDTA (pH = 8.0) 6 ml,加双蒸水至 300 ml,室温下保存,临用时稀释 10 倍。

(8)氯仿:异戊醇 (24:1):量取 192 ml 氯仿,8 ml 异戊醇,混匀。

(9)苯酚:氯仿:异戊醇 (25:24:1):量取 100 ml 的苯酚,100 ml 氯仿:异戊醇 (24:1),混匀。

(10)随机引物、PfuDNA 聚合酶、β-巯基乙醇、

dNTP、MgCl<sub>2</sub>。

#### 1.1.3 实验仪器

本实验过程中应用到以下仪器 HH-W21.C600 电热恒温水箱 (北京长源实验设备厂) 5810R 型冷冻高速离心机,WFH-202B 紫外透射分析仪 (上海精科实业有限公司),Hema-8000 型 PCR 仪 (珠海黑马仪器厂) 岛津 UV-2550 型紫外分光光度计 (日本岛津公司),DYC 型电泳仪 (北京六一仪器厂)

### 1.2 方法与步骤

#### 1.2.1 DNA 提取 (改良 CTAB 法)

(1)取何首乌干叶片 200 mg,剪成小碎片放置于冷研钵中,用液氮迅速研成粉状 (越细越好),将粉状物转入至预冷的 1.5 ml 干净离心管中,加入 600 μl 预热的 CTAB DNA 提取缓冲液,充分摇匀,65 °C 水浴 1 h,在水浴过程中每 10 min 温和颠倒混匀 1 次。

(2)取出离心管,使之恢复室温,加入等体积酚-氯仿-异戊醇 (25:24:1) 轻缓颠倒混匀,室温下 12 000 r/min 离心 10 min。

(3)取上清转移至另一新的 1.5 ml 离心管中,加入等体积的氯仿:异戊醇 (24:1) 轻轻颠倒混匀后 9 000 rpm 离心 15 min。

(4)吸取上清液于另一新的 1.5 ml 离心管中,加入 1/5 体积的 5 mol/L NaCl 溶液,2/3 倍体积冷异丙醇,轻轻颠倒混匀,4 °C 静置 30 min 后,11 000 rpm/min,离心 10 min,弃去上清液,用 70% 乙醇洗涤 2-3 次,室温吹干。

(5)将 DNA 溶于 500 μl TE,加入 5 μl RNA 酶,37 °C 恒温水浴箱保温 1 h 以裂解 RNA。

(6)加入等体积酚:氯仿:异戊醇 (25:24:1) 轻缓颠倒混匀,室温下 10 000 r/min 离心 10 min。

(7)取上清转移至另一新的 1.5 ml 离心管中,加入等体积的氯仿:异戊醇 (24:1) 轻轻颠倒混匀后 6 000 rpm 离心 15 min。

(8)上清液移入新的离心管中,加入 1/10 体积的 3 mol/L NaAc (pH = 5.2) 溶液,混匀后加入 2 倍体积的冰冷的无水乙醇,颠倒混匀,4 °C 静置 20 min 后,11 000 rpm/min,离心 10 min。

(9)倒掉液相,用 70% 乙醇冲洗 2~3 次后,在室温下自然风干,加入适量的 TE 缓冲液溶解 DNA,分装后放入 4 °C 待用。

#### 1.2.2 DNA 纯度及片段大小的检测

DNA 样品稀释 200 倍后,在 UV-2550 紫外分光光度仪上测定其在 260 nm、280 nm 处吸光度值,根据 OD<sub>260</sub>、OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 值来判断 DNA 的浓度

和纯度。

DNA 浓度计算公式: DNA 浓度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) =  $\text{OD}_{260} \times \text{稀释倍数} \times 50$

运用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳, 检测样品 DNA 片段的大小, 观察并且拍照。

### 1.2.3 电泳-琼脂糖凝胶板配制方法

制备 1% 的琼脂糖凝胶 (50 ml): 称取 0.5 g 琼脂糖于干净锥形瓶中, 再加入 50 ml 的  $0.5 \times \text{TBE}$ 。酒精灯加热煮沸至琼脂糖全部融化, 即得 1% 琼脂糖凝胶液<sup>[7]</sup>。取电泳槽内的有机玻璃内槽洗干净并晾干。将内槽置于水平位置, 并在固定位置放好梳子。将冷却到  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  左右的琼脂糖凝胶液中加入  $0.5\text{ }\mu\text{l}$  的核酸染色剂 Goldview, 轻轻混匀。小心地倒入有机玻璃板上, 使胶液缓缓展开, 一直到整个玻璃板的表面形成均匀的胶层。室温下静置直到凝胶完全凝固, 垂直轻轻拔掉梳子, 取下胶带, 将凝胶以及内槽放入电泳槽中。添加  $0.5 \times \text{TBE}$  电泳缓冲液至没过胶板为止。取  $1\text{ }\mu\text{l}$  上样缓冲液与 DNA 样品混合<sup>[7]</sup>。用  $10\text{ }\mu\text{l}$  微量移液枪分别将 Marker 和样品加入胶板的样品槽内, 每加完一个样品, 应更换一个加样头, 以防污染, 加样时勿碰坏样品孔周围的凝胶面。加样后的凝胶板立即通电进行电泳, 正确连接电泳槽和电源, 红色线连接阳极, 黑色线连接阴极, 电压  $80\text{ V}$ , 样品由负极 (黑色) 向正极 (红色) 的方向移动, 当溴酚蓝移动到距胶板下沿大约  $1\text{ cm}$  处时, 停止电泳<sup>[8]</sup>。在紫外灯下观察, DNA 存在则有红色荧光条带显示, 采用凝胶成像系统拍照并保存。

### 1.2.4 ITS 扩增和测序

参考 White 等<sup>[9]</sup> 设计一对通用引物, 用于扩增 ITS1 - 5.8S - ITS2 完整序列, P1 ( $5' - \text{CGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG} - 3'$ ) 位于 18S 上, P2 ( $5' - \text{TCCTCCGCTTATTGATATGC} - 3'$ ) 位于 26S 上, 由上海生工生物工程技术有限公司合成。采用 P1 和 P2 双引物整段扩增, 在  $50\text{ }\mu\text{L}$  反应体系中, 含基因组 DNA  $1\text{ }\mu\text{L}$ 、引物各  $1\text{ }\mu\text{L}$ 、PfuDNA 聚合酶  $2.5\text{ U}$ 、dNTPs  $0.1\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$   $1.5\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。反应条件: PCR 扩增条件为  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  预变性  $5\text{ min}$ ,  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  变性  $2\text{ min}$ ,  $52\text{ }^{\circ}\text{C}$  退火  $3\text{ min}$ ,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸  $2\text{ min}$ , 循环 30 次;  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸  $10\text{ min}$ , 反应产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳初步鉴定后, 分别送交上海生工和上海英骏广州分公司做双向测序。

### 1.2.5 序列分析

经公司测序的结果进行手工校正, 采用 MEGA5 软件进行序列比对分析和遗传距离分析, 并用 MEGA5 软件绘制 NJ 系统树。

## 2 结果分析

### 2.1 DNA 浓度

紫外分光光度计检测何首乌 DNA 浓度, DNA 的  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  比值为 1.714, 何首乌 DNA 浓度为  $480\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

### 2.2 PCR 扩增产物电泳检测

何首乌样品经改良 CTAB 法提取总 DNA, PCR 扩增产物 (见图 1), 图谱中样品条带清晰, 达到实验要求, 可以用来测序。由图知贵州桐梓何首乌样品 ITS 序列的长度在  $500\text{ bp}$  到  $750\text{ bp}$  之间。

### 2.3 测序结果及序列分析

经测序得到何首乌 rDNA ITS 序列, 对测序结果比对发现何首乌 rDNA 的 ITS 序列, 4 种何首乌近缘种 ITS 序列均来源于 Genbank, 根据 Genbank 已报道的近缘种 (Genbank 登录号见表 1) 序列资料确定 rDNA 内转录区 ITS1 和 ITS2 与 3 个编码区 18S、5.8S、26S 的界限。何首乌 rDNA 完全序列片段长度共约  $652\text{ bp}$ , 其中 ITS1 的长度为  $202\text{ bp}$ , G+C 含量为  $70.29\%$ , 5.8S 的长度为  $161\text{ bp}$ , ITS2 长度为  $232\text{ bp}$ , G+C 含量为  $68.97\%$ , 何首乌 ITS 序列与 GenBank 中近缘种序列之间的遗传距离见表 2, 其中遗传距离范围为  $0.077\text{ }0 \sim 0.421\text{ }1$ 。图 2 是贵州桐梓何首乌与 GenBank 中 4 种近缘种 ITS 序列系统发生树, 通过 NJ 树可以看出, 何首乌单独为一支, 说明何首乌与其近缘种的 ITS 序列存在较大变异。

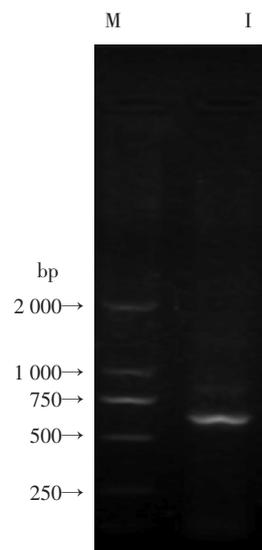


图 1 ITS 序列 PCR 扩增产物电泳图谱

Fig. 1 gel electrophoresis profiles of PCR amplification products of ITS sequence

注: M: DNA 标准参照物 (DL2000); I 为何首乌样品。

Notes: M: DNA reference standard (DL2000); I: Polygonum samples.

经测序得贵州桐梓何首乌 rDNA ITS 序列依次为:

(ITS1) CAGGGGGAGTATTGTCGATCCTGACGGCCGACCGCGAACACGTTTCCTGAAAACCGCGCGCGCCGGG  
CGCCGGGCCATCCGGCCGGGCGAACCGCGCGCGCCAAACCTAACTCTCGGCGCGGGAAGCGCCAAGGA  
CTACTCGGAACGGATCCGGCGGCGTCCCCGCGCGGGATCCCCGGCATCTGATGAAACGTAACC (5.8S)  
AACACGACTCTCGGCAACGGATATCTAGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAACAAAATGCGATACTTGGT  
GTGAATTGCAGAATCCCCTGAATCATCGAGTTTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATCCGGCCGAGG  
GCACGTCTGCCTGGGCGTCA (ITS2) CGCATCTCGTCCGACCCCCCTCCTCCCAGTCTCCGGGACGCTGGCT  
GGCAGCGGGGCGGCGGATGCTGGCCTCCCGTCCCTCGCGGTGCGGCTGGCCCAAATGCGAGCCCCCGGA  
CAAG  
GGACGTCACGGCTTGAGGTGGTTGGACATGTTTGTTCATTGAGGAGCTGTGACGGCCCCCGGGGCC  
CCCCTCGACCGACCCATTGAGAGCAGTGGCCTCCGAGCG (26S) CGACCCAGGTCAGGCGGGATCACCC  
GCTGAGTTTAAGTATTACAAAATAAATC

表 1 何首乌近缘种序列来源

Table1 Polygonum multiflorum relative sequence source

中文名	拉丁名	Genbank 登录号
篇蓄廖	Polygonum aviculare	HM357902.1
齿叶蓼	Fallopia denticulare	HM357903.1
木藤蓼	Fallopia aubertii	HM357909.1
愉悦蓼	Polygonum jucundum	HM357912.1

表 2 何首乌与其近缘种遗传距离

Table 2 polygonum multiflorum from different regions of genetic distance

名称	1	2	3	4	5
Polygonum aviculare					
Polygonum multiflorum Thunb	0.336 1				
Fallopia aubertii	0.159 8	0.421 1			
Fallopia denticulare	0.183 3	0.363 6	0.248 3		
Polygonum jucundum	0.077 0	0.330 6	0.135 9	0.198 2	

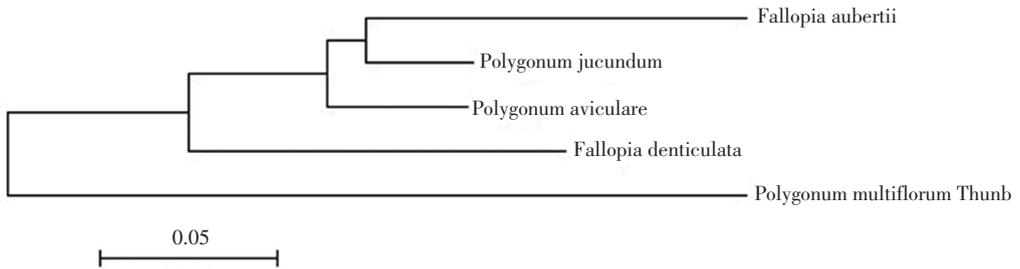


图 2 何首乌及其近缘种 rDNA ITS 系统发育树

Fig. 2 Polygonum multiflorum Thunb and its relative rDNA ITS phylogenetic tree

### 3 结论与讨论

中药材用于疾病防治已有几千年的历史,但由于中药现代品质监控技术不足,常常出现药材混淆代用、故意伪制等现象,严重影响了临床用药的安全性,甚至危及人的生命,寻找健全完善的中药品质检测技术迫在眉睫。目前,越来越多的研究者将 ITS 应用于药用植物的鉴别,为揭示药用植物的遗传差异和鉴定中药材品种提供了科学依据。

rDNA ITS 区段在科、属、种水平上均有特异性序列的特性,对 ITS 区进行 PCR 扩增、测序及序列对比分析后,设计特异性引物来检测真核生物的方法已越来越被广泛应用。ITS 序列具有相对较快的

进化速率,一般用于研究亲缘关系较近的属间关系以及种间甚至居群间的系统关系<sup>[10]</sup>。rDNA 内转录间隔区 ITS 作为一种遗传标记,具有可遗传性和可识别性,ITS 序列长度适中,人们可以从不太长的序列中获取足够信息,被广泛用于属内种间或种内群体的系统学研究<sup>[11-12]</sup>。ITS 序列的 DNA 条形码鉴定研究日益受到中药科研工作者的广泛关注和实际应用<sup>[13-14]</sup>,ITS 序列的进化速率较快、基因片段短、直观性强、扩增和测序容易,存在种内多态性,已成为中药现代化研究的一个重要方面,为揭示药用植物的遗传差异和鉴定中药材品种提供了科学依据<sup>[15-16]</sup>。

为了获取高质量的 DNA,本实验采用改进的 CTAB 法对何首乌进行 DNA 的提取,CTAB 是一种

有效的阳离子去污剂,可溶解细胞膜,能与蛋白质和多聚糖形成复合物。本实验利用 CTAB 在高离子强度的缓冲溶液中与蛋白质和大多数多聚糖形成复合物,但不沉淀核酸的特性,离心获得含 DNA 的上清液;用氯仿与异戊醇的混合溶液抽提 DNA,去除蛋白质,使蛋白质变性、分层。在抽提过程中,混合使用酚和氯仿抽提效果最好。酚的变性抽提作用要比氯仿好,但酚和水有一定比例的互溶,氯仿的变性作用不如酚的效果好,但氯仿和水不相溶,不会除掉 DNA,经酚第一次抽提后水相中有残留的酚,由于酚与氯仿互溶,用氯仿第二次变性蛋白质,此时一起将酚除去;用酚和氯仿抽提 DNA 时,还要加入少量的异戊醇,因为在抽提 DNA 时,为了混合均匀,必须剧烈震荡离心管数次,导致混合液中容易产生气泡,气泡会影响相互间的作用,加入异戊醇能降低分子表面张力,减少抽提过程中泡沫的产生,同时异戊醇有助于分相,使离心后的上层含 DNA 的水相、中间的变性蛋白相及下层有机溶剂相维持稳定。在沉淀 DNA 时,加入的 Na<sup>+</sup>能中和 DNA 分子上的负电荷,减少 DNA 分子之间的同性电荷相斥力,而使 DNA 易于聚集沉淀,加入乙醇可以除去盐离子;加入 RNase 降解 RNA,从而得到纯净的 DNA 分子,达到提取和纯化 DNA 的目的,从而获得了高质量的 DNA,适合下一步的分子生物学的研究。

本研究通过对序列的比对分析,发现何首乌 rDNA ITS 序列与 GenBank 中已有的何首乌近缘种的 ITS 序列有明显的差异,说明何首乌与其近缘种间变异较大,通过 NJ 树可以将何首乌及其近缘种区分开来。实验结果表明对 ITS 序列的比对分析可用以鉴别种属之间的差异,同时为中药材鉴别研究提供了新思路;ITS 序列可对何首乌及其近缘种做出鉴别,ITS 区序列的差异能为鉴别何首乌提供依据。

## 参考文献(References)

- [1] 生书晶,严萍,郑传进,等.何首乌及其常见混淆品的 matK 基因序列分析及鉴别[J].中药材,2010,33(11):1707-1711.  
SHENG ShuJing, YAN Ping, ZHENG Chuan Jin, et al. MatK gene sequence analysis and identification of Polygonum its common adulterants [J]. Medicines, 2010,33(11):1707-1711.
- [2] 王晓玲,郭安平,彭于发,等.海南普通野生稻不同居群 rDNA ITS 区序列的比较分析[J].热带作物学报,2008,29(4):476-483.  
WANG Xiaoling, GUO Anping, PENG Yufa, et al. Common Wild Rice comparative analysis of different populations of rDNA ITS sequences [J]. Tropical Crop Science, 2008,29(4):476-483.
- [3] 罗艳,杨亲二.川乌与草乌的 ITS 序列分析[J].中国药理学杂志,2008,43(11):820-823.  
LUO Yan, YANG Qiner. ITS sequences and Aconitum Aconitum analysis [J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2008,43(11):820-823.
- [4] WOLFE K H, LI W H, SHARP P M. Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs [J]. Proc Nat. Acad Sci, USA.1987, 84(5): 9054.
- [5] 刘文志,戴住波,钱子刚.金铁锁不同居群 rDNA ITS 序列分析[J].中药材,2008,31(2):192-195.  
LIU Wenzhi, DAI Zhubo, QIAN Zigang. Tunicoides different populations of rDNA ITS sequence analysis [J]. Herbs, 2008,31(2):192-195.
- [6] 罗洪斌,张健,胡泽华,等.道地药材板桥党参 nrDNA ITS 区序列分析[J].安徽农业科学,2010,38(9):4427-4431.  
LUO Hongbin, ZHANG Jian, HU Zehua, et al. authentic ingredients Banqiao Codonopsis nrDNA ITS Sequence Analysis [J]. Anhui Agricultural Sciences, 2010, 38(9):4427-4431.
- [7] 周鹤峰,邵敏,姬可平,等.甘肃本地地产当归、黄芪和大黄的 rDNA ITS 序列分析 [J].基因组学与应用生物学,2010,29(4):225-227.  
ZHOU Hefeng, SHAO Min, JI Keping, et al. Gansu locally Angelica, rDNA ITS sequence analysis of Astragalus and rhubarb [J]. Genomics and Applied Biology, 2010, 29(4):225-227.
- [8] 杨杰翔,肖复桑.川南高氟地区人群膝骨性关节炎患病状况及影响因素的抽样调查研究 [J].泸州医学院,2010,1:13-14.  
YANG Jixiang, XIAO Fushen. Southern Sichuan high fluoride area population of knee osteoarthritis prevalence and influencing factors of sampling survey report [J]. Luzhou Medical College, 2010,1:13-14.
- [9] WHITE T J, BRUNS T, LEE S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [M]. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, editor. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications,1990:315-332.
- [10] 孙爱群,向红,王绪英.珍珠菜 rDNA ITS 序列扩增及分析[J].西北植物学报,2008,28(1):2172-2177.  
SUN Aiqun, XIANG Hong, WANG Xuying. Loosestrife rDNA ITS sequence amplification and analysis [J]. Northwestern Agricultural University, 2008, 28(1):2172-2177.
- [11] THORSON P A. Minimal adenocarcinoma in prostate needle [J]. Am J Clin Pathol, 2000, 114(6): 896-909.
- [12] 王宏伟,徐燕,李海龙.岷县、漳县产当归基于 ITS 序列

- 的变异位点和分子进化分析[J].甘肃中医杂志,2010,23(12):68-69.
- WANG Hongwei,XU Yan,LI Hailong. Minxian, Zhangxian production Angelica ITS sequence variation based sites and molecular phylogenetic analysis [J]. Gansu Traditional Chinese Medicine, 2010,23 (12):68 -69.
- [13] 毛善国,罗玉明,沈洁,等.番红花及其混淆品的 rDNA ITS 序列与 AS-PCR 鉴别[J].南京师大学报,2007,30(2):89-92.
- MAO Shanguo,LUO Yuming,SHEN Ji,et al. saffron and its adulterants rDNA ITS sequences with AS-PCR identification [J]. Nanjing Normal University , 2007,30(2):89-92.
- [14] 庞晓慧,宋经元,徐海滨.应用 ITS2 条形码鉴定中药材麻黄[J].中国中药杂志,2012,37(8):1118-1120.
- PANG Xiaohui,SONG Jingyuan,XU Haibin. Application ITS2 barcode identification of herbal ephedra [J]. Traditional Chinese Medicine, 2012,37(8):1118-1120.
- [15] 张安世,张为民,刘永英.基于 ITS2 序列的 12 种苔藓植物亲缘关系分析[J].湖北农业科学,2012,21(13):67-76.
- ZHANG Anshi,ZHANG Weimin,LIU Yongying. Analysis based on 12 kinds of bryophytes kinship ITS2 sequences [J]. Agricultural Sciences , 2012,21(13):67-76.
- [16] 殷秀梅,罗炕,刘美子,等.蛇床及其近缘物种的 ITS2 分子鉴定[J].中国现代中药,2012,14(3):9-11.
- YIN Xiumei,LUO Kang,LIU Meizi,et al. snake bed and ITS2 molecular identification of closely related species [J]. Chinese Modern Chinese Medicine , 2012,14(3):9-11.