

利用聚合酶鏈式反應限制性片段長度多態性鑒別桃兒七

1 引言

1.1 本方法載列利用聚合酶鏈式反應限制性片段長度多態性 (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, 簡稱PCR-RFLP) 鑒別桃兒七 (*Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) Ying)。

註：*Podophyllum emodi* (Wall.) Ying 是*Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) Ying的異名。

1.2 桃兒七為小檗科桃兒七屬植物。根據《中醫藥條例》(第549章)及香港中藥材標準，藥材鬼臼(桃兒七)為植物桃兒七的乾燥根和根莖。

1.3 鬼臼的主要混淆品包括威靈仙和龍膽。威靈仙的主要來源為毛茛科植物威靈仙 *Clematis chinensis* Osbeck、棉團鐵綫蓮 *Clematis hexapetala* Pall. 和東北鐵綫蓮 *Clematis manshurica* Rupr. 的乾燥根和根莖；龍膽的主要來源為龍膽科植物龍膽 *Gentiana scabra* Bge 或堅龍膽 *Gentiana rigescens* Franch 的乾燥根和根莖。由於鬼臼及其混淆品外觀相似，因此過往曾發生誤將鬼臼當作威靈仙或龍膽服用的中毒事件。

1.4 本方法包含兩個分別使用不同引物的測試：

1.4.1 內部陽性擴增對照測定法 (internal positive amplification control assay, 簡稱 IPAC) 用於確保所測試樣本的基因組DNA是可擴增的。IPAC利用通用引物進行聚合酶鏈式反應 (polymerase chain reaction, 簡稱PCR), 與植物的部分葉綠體 DNA 區域結合, 並呈現陽性擴增。

1.4.2 鑒別測定法 (differentiation test, 簡稱 DT) 首先利用引物進行PCR, 與葉綠體DNA區域ATP synthase CF0 subunit I (簡稱*atpF*) 結合, 然後以限制酶*EcoRI*進行限制性消化, 產生桃兒七特異性的去氧核糖核酸 (Deoxyribonucleic acid, 簡稱DNA) 圖譜。

1.5 本方法分為以下步驟：IPAC和DT：(1) 樣本製備和DNA提取；(2) PCR擴增目標DNA區域；(3) 凝膠電泳分析PCR產物；DT：(4) 限制性消化PCR產物；(5) 凝膠電泳分析限制性消化後的PCR產物。

1.6 本方法適用於完整的原藥材。

2 安全預防措施

- 2.1 本方法涉及使用危險物品。使用者有責任在處理相關物品時，根據物質安全資料表採取適當的防護措施，並戴上護眼及護手裝備。如有需要，在抽氣櫃或生物安全櫃進行分析。

3 試劑及材料

- 3.1 在可行的情況下，所使用的化學品或試劑須為分子生物或PCR等級。分析用水必須為分子生物等級。在可行的情況下，所使用的化學品、試劑及水須進行高壓滅菌。操作人員須全程戴上無粉手套。建議使用含濾芯的移液器吸頭以避免交叉污染。製備PCR試劑的層流櫃，必須提供高效能空氣微粒子過濾的單向空氣，以防止污染。
- 3.2 《補充資料》載有本方法進行驗證時所使用的試劑及材料，以供參考。

4 器具

- 4.1 《補充資料》載有本方法進行驗證時所使用的儀器及器具，以供參考。

5 一般步驟

《補充資料》載有完整的實驗步驟。對照應按第7段所述與樣本同步進行檢測，以檢查分析試劑或樣本之間有否出現DNA污染。

5.1 配製樣本

- 5.1.1 配製樣本、提取陽性對照（EPC，參考第7.1段）及提取空白對照（EBC，參考第7.2段）。繼續第5.2段。

5.2 DNA提取

- 5.2.1 為取得品質足以進行PCR分析的DNA提取物，建議從藥材中去除以下成分：

- 5.2.1.1 核糖核酸（RNA）；
- 5.2.1.2 多糖，例如纖維素、澱粉；
- 5.2.1.3 蛋白質；
- 5.2.1.4 脂質；以及
- 5.2.1.5 色素，例如酚類化合物。

- 5.2.2 使用分光光度法計算DNA提取物的量，然後把DNA濃度均一化。繼續第5.3段。

5.3 PCR分析

5.3.1 以PCR陰性對照（PNC，參考第7.3段）作為對照，對樣本、EPC和EBC的DNA（參考第5.2.2段）進行PCR，擴增目標DNA區域。《補充資料》載有建議的引物對及PCR條件。

5.3.2 完成PCR後，使用凝膠電泳法檢查PCR產物的譜帶長度及數目。

5.4 限制性消化分析

5.4.1 以限制性消化陰性對照（RDNC，參考第7.4段）作為對照，對樣本和EPC的PCR產物進行限制性消化。《補充資料》載有建議的限制酶及限制性消化條件。

5.4.2 完成限制性消化後，使用凝膠電泳法檢查限制性消化產物的譜帶長度及數目。

6 結果分析

6.1 為確定樣本是否桃兒七，樣本必須於內部陽性擴增對照測定法（IPAC）（參考第6.1.1段）和鑒別測定法（DT）（參考第6.1.2段）均應呈現陽性擴增。若其中任何一項測試結果為陰性，則無法確定樣本為桃兒七。

6.1.1 IPAC的結果分析是透過檢視PCR分析所得的DNA譜帶圖譜，確定所測試樣本的基因組DNA是否可擴增：

	PCR 分析所得的 DNA 譜帶圖譜	結果
(a)	1 條譜帶，長度約 130 個鹼基對	陽性
(b)	無譜帶	陰性

6.1.2 DT的結果分析是透過檢視限制性消化分析所得的DNA譜帶圖譜，區分桃兒七與其混淆品種（包括威靈仙、東北鐵綫蓮、棉團鐵綫蓮、龍膽、堅龍膽）：

	物種	限制性消化分析所得的 DNA 譜帶圖譜	結果
(a)	(1) 桃兒七 (<i>S. hexandrum</i>)	2 條譜帶，長度分別約 180 個鹼基對及約 260 個鹼基對	陽性
(b)	(1) 威靈仙 (<i>C. chinensis</i>) (2) 東北鐵綫蓮 (<i>C. manshurica</i>) (3) 棉團鐵綫蓮 (<i>C. hexapetala</i>) (4) 龍膽 (<i>G. scabra</i>) (5) 堅龍膽 (<i>G. rigescens</i>)	1 條譜帶，長度約 440 個鹼基對	陰性

6.2 品質控制

- 6.2.1 當重複樣本在PCR分析或限制性消化分析中出現不一致的結果時，表明樣本只含有少量目標DNA，可能觸及檢測下限。對於不確定的數據，須重複分析以確認檢測結果。
- 6.2.2 品質控制參數（包括EPC、EBC、PNC、RDNC）須在PCR分析中獲得預期的擴增（參考第6.3段），以及須在限制性消化分析中獲得預期的PCR產物切割（參考第6.4段），以確保測試結果有效。控制參數須顯出第7段所述的預期表現，若任何控制參數的結果跟其預期表現不一致，須重複分析。

6.3 PCR分析的擴增

- 6.3.1 須以目視方式檢查PCR分析中獲得的DNA譜帶來評估擴增。
- 6.3.2 當觀察到符合列定長度的DNA譜帶（參考S6—IPAC：約130個鹼基對；DT：約260個鹼基對）時，擴增被視為陽性。
- 6.3.3 當觀察不到符合列定長度的DNA譜帶（參考第6.3.2段）時，擴增被視為陰性。
- 6.3.4 當樣本和EPC的擴增是陰性，表示：
 - 6.3.4.1 在DNA提取過程中，可能同時分離出存在於樣本基質內的抑制物。在這種情況下，濃度均一化後的DNA（參考第5.2.2段）在加入PCR預混液前須進行稀釋，並須重複PCR分析；或進一步純化DNA提取物（參考第5.2.1段）（參見S3）及濃度均一化純化後的DNA提取物，並須重複PCR分析；或
 - 6.3.4.2 DNA提取物（參考第5.2段）可能已嚴重降解或被破壞，導致可擴增的DNA（參考第5.2.2段）量低於檢測下限。在這種情況下，須重複PCR分析，並增加濃度均一化的DNA（參考第5.2.2段）的投入量。
- 6.3.5 若執行了第6.3.4.1段或第6.3.4.2段的措施後，PCR分析的擴增仍維持陰性，須中止分析。待修正問題後重新開始分析。

6.4 限制性消化分析的PCR產物切割

- 6.4.1 須以目視檢查限制性消化分析中獲得的DNA譜帶來評估PCR產物切割。
- 6.4.2 當觀察到1條長度約180個鹼基對和1條長度約260個鹼基對的DNA譜帶時，PCR產物切割被視為陽性。

6.4.3 當出現以下情況，PCR產物切割被視為陰性：

6.4.3.1 觀察不到1條長度約180個鹼基對和1條長度約260個鹼基對的DNA譜帶，但卻觀察到1條長度約440個鹼基對的DNA譜帶；或

6.4.3.2 觀察不到任何DNA譜帶。

6.4.4 當在樣本和EPC觀察不到DNA譜帶（參考第6.4.3.2段），這可能表明PCR產物的投入量低於檢測下限。在這種情況下，須重複限制性消化分析，並增加PCR產物的投入量。

7 品質控制參數

測試的分析性能是根據品質控制標準來進行評估，以確保分析結果可接受，並且滿足方法的目的。為確保符合品質控制計劃，根據 DNA 分析人員的合理的處理能力，使用者應決定在每批次的適當樣本數量。每批樣本或每 15 個樣本（以較少者為準）須執行以下品質控制。

7.1 提取陽性對照（EPC）：至少1個桃兒七的參考物質須納入分析，數量以2個為佳。作為陽性對照，EPC須於整個分析程序與樣本一同處理。

可接受標準：預期的觀察結果須為：

7.1.1 PCR分析的擴增為陽性；及

7.1.2 限制性消化分析的PCR產物切割為陽性。

7.2 提取空白對照（EBC）：至少1個提取空白對照須納入分析，數量以2個為佳。作為空白對照，EBC須於DNA提取過程中與樣本一同處理。

可接受標準：PCR 分析的擴增須為陰性。

7.3 PCR陰性對照（PNC）：至少1個PCR陰性對照（在PCR分析中以水代替DNA）須納入分析，數量以2個為佳。

可接受標準：PCR 分析的擴增須為陰性。

7.4 限制性消化陰性對照（RDNC）：作為切割空白對照，至少1個限制性消化陰性對照（在限制性消化分析中以水代替PCR產物）須納入分析，數量以2個為佳。

可接受標準：限制性消化分析的 PCR 產物切割須為陰性，不得顯出 DNA 譜帶（參考第 6.4.3.2 段）。

7.5 至少1個隨機的重複樣本對照須納入分析，並須於整個分析程序與樣本一同處理。

可接受標準：樣本與重複樣本的分析結果須為一致。

- 7.6 品質控制結果不符合上述規定的可接受標準時，須重新進行分析，直至符合標準。否則，應停止分析。在重新開始分析前識別並解決問題。

8 參考資料

- 8.1 Chen, S., Yao, H., Han, J., Liu, C., Song, J., Shi, L., Zhu, Y., Ma, X., Gao, T., Pang, X., Luo, K., Li, Y., Li, X., Jia, X., Lin, Y., & Leon, C. (2010). Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PLoS one*, 5(1), e8613.
- 8.2 Fatima, T., Srivastava, A., Hanur, V. S., & Rao, M. S. (2018). An Effective Wood DNA Extraction Protocol for Three Economic Important Timber Species of India. *American Journal of Plant Sciences*, 09(02), 139-149.
- 8.3 Government Chinese Medicines Testing Institute, Department of Health, Government of Hong Kong Special Administrative Region. (2008-2013). *Hong Kong Chinese Materia Medica Standards (HKCMMS)*. (Vol. 2, 6, 8). Chinese Medicine Division, Department of Health, Government of Hong Kong Special Administrative Region.
- 8.4 Ivanova, N. V., Dewaard, J. R., & Hebert, P. D. N. (2006). An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA. *Molecular Ecology Notes*, 6(4), 998-1002.
- 8.5 National Pharmacopoeia Commission. (2025). *Pharmacopoeia of the People's Republic of China* (2025 ed., Vol. 1). China Medical Science Press.
- 8.6 Thakur, V. V., Tiwari, S., Tripathi, N., & Tiwari, G. (2019). Molecular identification of medicinal plants with amplicon length polymorphism using universal DNA barcodes of the *atpF-atpH*, *trnL* and *trnH-psbA* regions. *3 Biotech*, 9(5), 188.
- 8.7 Wang, L., Hu, W., Huang, Z., Zhou, Z., Chen, N., Li, Y., Hu, Y., Yang, F., Shen, C., Lou, Q., Xin, T., & Pu, X. (2025). Species-specific PCR and HRM assays targeting chloroplast *atpF* gene enable rapid authentication of *Lysimachia christinae* and detection of adulteration in commercial herbal products. *Industrial Crops and Products*, 234, 121587.
- 8.8 Wang, X., Zhang, Z., Shi, Y., Man, J., Huang, Y., Zhang, X., Liu, S., He, G., An, K., Amu, L., Chen, W., Liu, Z., Wang, X., & Wei, S. (2024). Population identification and genetic diversity analysis of *Fritillaria ussuriensis* (*Fritillaria*) based on chloroplast genes *atpF* and *petB*. *Journal of Applied Genetics*, 65(3), 453-462.

- 8.9 Watanabe, T., Akiyama, H., Maleki, S., Yamakawa, H., Iijima, K., Yamazaki, F., Matsumoto, T., Futo, S., Arakawa, F., Watai, M., & Maitani, T. (2006). A specific qualitative detection method for peanut (*Arachis hypogaea*) in foods using polymerase chain reaction. *Journal of Food Biochemistry*, 30(2), 215-233.
- 8.10 Yao, H., Song, J., Liu, C., Luo, K., Han, J., Li, Y., Pang, X., Xu, H., Zhu, Y., Xiao, P., & Chen, S. (2010). Use of ITS2 Region as the Universal DNA Barcode for Plants and Animals. *PLoS One*, 5(10), e13102.
- 8.11 Zymo Research. (2019). *OneStep™ PCR Inhibitor Removal Kit Protocol* (Ver. 2.0.2). Zymo Research Corporation.