

GCMTI RD-1:2022

政府中藥檢測中心方法



川貝母中常見摻雜品 –
平貝母的實時定性聚合酶鏈式反應檢測方法

川貝母中常見摻雜品 – 平貝母的實時定性聚合酶鏈式反應檢測方法

安全預防措施：本檢測方法涉及危險物品。處理有關物品時，檢測人員應採取適當的防護措施，戴上護眼及護手裝備，如有需要可在抽氣櫃或生物安全櫃進行檢測工作。

1. 簡介

- 1.1 本檢測方法闡述如何利用實時定性聚合酶鏈式反應(PCR)測定法，從川貝母(*Bulbus Fritillariae Cirrhosae*)中鑒別出平貝母(*Bulbus Fritillariae Ussuriensis*)。平貝母是川貝母中常見的摻雜品。據《中華人民共和國藥典》(2020年版)所載，平貝母源自植物平貝母(*Fritillaria ussuriensis* Maxim.)的乾燥鱗莖，而川貝母的來源則是6種貝母屬植物的乾燥鱗莖，分別是川貝母(*Fritillaria cirrhosa* D. Don)、暗紫貝母(*Fritillaria unibracteata* Hsiao et K.C. Hsia)、甘肅貝母(*Fritillaria przewalskii* Maxim)、梭砂貝母(*Fritillaria delavayi* Franch)、太白貝母(*Fritillaria taipaiensis* P. Y. Li)和瓦布貝母(*Fritillaria unibracteata* Hsiao et K. C. Hsia var. *wabuensis* (S. Y. Tang et S. C. Yue) Z. D. Liu, S. Wang et S. C. Chen)。
- 1.2 本檢測方法和附件載列有關檢測規程，以供進行檢測時參考。本檢測方法的分析過程包括以下步驟：1. 提取脫氧核糖核酸(DNA)；2. 利用實時 PCR 進行擴增和檢出目標 DNA 區域，以作區分；以及 3. 數據分析。

2. 試劑及材料

所有使用的化學品或試劑須為分子生物或 PCR 等級，並適用於 DNA 分析。分析時所用的水須經過雙重蒸餾或屬於 PCR 等級，並且不含核酸酶及核酸。在可行的情況下，在使用有關化學品、試劑及水前須先進行高壓滅菌。操作人員在進行任何程序時均須戴上無粉手套，並建議使用含濾芯的移液管吸嘴，避免交叉污染。

《補充資料》載有本檢測方法所使用的檢測試劑及材料，以供參考。

3. 設備

《補充資料》列出本檢測方法所使用的實驗室設備及儀器，整個分析過程中主要使用的設備如下：

- 3.1 **層流櫃：**為工作區提供經高效能空氣微粒子(HEPA)過濾的單向空氣，以防樣品受到污染。
- 3.2 **溫控培養箱：**為提取核酸提供實驗條件。

- 3.3 桌上型微量離心機：透過高速旋轉樣品提取核酸。
- 3.4 分光光度計：用以評估雙鏈 DNA 的純度及產量。
- 3.5 實時 PCR 分析系統：利用 PCR 擴增 DNA 及檢出擴增所得的 PCR 產物。

4. 一般程序

附件 A 和《補充資料》所述的檢測規程僅供參考。操作人員應按其經驗，並考慮測試範圍和樣品性質，以衡量有關方法是否合適，繼而決定所使用的方法。操作人員應參考相關的國際／國家標準(如適用)。為確保測試結果準確有效，在情況適用下，對照應按第 5 段所述與檢測樣品同步接受檢測，以檢查分析純試劑中或樣品之間的 DNA 有否受到污染。

4.1 樣品製備

負責製備樣品(例如進行粒度減少、均質化和取樣等程序)的操作人員應具備良好的實驗室操作水平，能防止實驗室內出現交叉污染，以免致使檢測結果無效。

4.2 DNA 提取

4.2.1 DNA 檢測方法的先決條件是取得可擴增的 DNA。一般而言，商業的 DNA 分離試劑盒或實驗室配製的試劑均可用以提取可擴增的 DNA。經政府中藥檢測中心驗證的提取方法載於附件 A，以供參考。商業試劑盒的質量由製造商妥為管控及保證，可更容易管控提取過程的質量，亦可節省排解問題的時間。檢測人員如使用其他試劑盒，或對附件 A 所載程序作出任何修改，均須加以充分驗證，並有責任評估檢測中選用的測試項目是否合適。

4.2.2 應根據藥材的化學／細胞成分，選用合適的 DNA 提取試劑盒或規程。為取得質量夠好且分量充足的 DNA 提取物用於後續的 PCR 擴增程序，在情況適用下，應除去藥材中下列成分：

4.2.2.1 多糖部分(例如果膠、纖維素、半纖維素及澱粉等)：可使用合適的酶(例如果膠酶、纖維素酶、 α -澱粉酶等)進行酶解處理去除。

4.2.2.2 核糖核酸(RNA)及／或蛋白質：可分別使用核糖核酸酶及蛋白酶進行酶解處理後去除。

4.2.2.3 脂質部分：可進行酶解處理或使用溶劑提取法(如正己烷)來去除。

4.2.2.4 色素(例如酚類化合物、鞣質及其他次級代謝物)：可使用聚乙烯吡咯烷酮(PVP)及／或 2-巰基乙醇來去除。

4.2.3 DNA 提取物的質量可通過以下方法評估：

- 4.2.3.1 分光光度分析；以及
- 4.2.3.2 擴增植物類羣的內源基因。

4.3 利用實時 PCR 進行擴增

- 4.3.1 本檢測方法涉及 2 種分別使用不同引物／探針的測定法，適用於下列用途：
 - 4.3.1.1 本檢測方法中的特異性擴增測定法(**specific amplification assay**，簡稱 **SA**)利用特異的引物／探針組檢出平貝母的特徵 DNA 區域。**SA** 能辨識平貝母的葉綠體 DNA 區域並與之結合，呈現陽性擴增。反之，在對川貝母、暗紫貝母、甘肅貝母、梭砂貝母、太白貝母、瓦布貝母及其他植物材料進行測定時，不會出現擴增現象。
 - 4.3.1.2 內部陽性擴增對照測定法(**internal positive amplification control assay**，簡稱 **IPAC**)則利用質控引物／探針組，確保所測試樣品的基因組 DNA 是可擴增的。**IPAC** 能辨識所檢測植物(包括平貝母、川貝母、暗紫貝母、甘肅貝母、梭砂貝母、太白貝母、瓦布貝母)的部分葉綠體 DNA 區域並與之結合，呈現陽性擴增。
 - 4.3.1.3 每個檢測樣品均須同時以上述 2 種測定法分析。有關本檢測方法中使用的所有引物／探針組的資料載於附件 B 的表 B1。
- 4.3.2 建議對每個檢測樣品進行重複分析，並且以 2 個不同的模板 DNA 量進行，配製樣品時以第 4.2.3.1 段所述方法量度得出的濃度為依據：
 - 4.3.2.1 濃度歸一的 DNA 提取物：以分子級水將 DNA 提取物的濃度稀釋至每微升 10 納克。
 - 4.3.2.2 稀釋的 DNA 提取物：以分子級水將濃度歸一的 DNA 提取物進一步稀釋 5 倍。
- 4.3.3 檢測人員須利用實時 PCR 同步分析濃度歸一的 DNA 提取物、稀釋的 DNA 提取物，以及第 5.1 段所列的合適對照。
- 4.3.4 分別按照附件 B 的表 B2 和 B3 配製 PCR 預混液及進行 PCR 分析。

4.4 數據分析

- 4.4.1 使用下列設定分析數據：
 - 4.4.1.1 手動設定閾值(**manual threshold**)：進行 **SA** 分析時把閾值設定為 0.05，進行 **IPAC** 分析時則設定為 0.04。
 - 4.4.1.2 手動設定基線(**manual baseline**)：把基線設定為第 3 至第 15 個循環。

註：

- a) 數據評估須根據實時 PCR 儀器生產商建議的一般分析程序進行。此設定適用於經政府中藥檢測中心內部驗證的規程及指定的實時系統。
- b) 使用此檢測規程分析帶有 SA 和 IPAC 的單拷貝序列的雙目標質體，在進行實時 PCR 分析時加入拷貝數為 450,000 的質體 DNA，SA 和 IPAC 測定法得出的平均循環數閾值(Ct 值)結果分別為 20.4 ± 0.18 和 19.0 ± 0.27 。閾值須設定在擴增曲線的線性期。有關質體圖譜和實時 PCR 檢測的結果載於附件 C。

4.4.2 將數據(包括但不限於 Ct 值)輸出至試算表程式，以作進一步分析。

4.5 結果分析

4.5.1 判定檢測結果的基準是循環數閾值，亦即是 Ct 值。Ct 值是指反應螢光強度與指定閾值的交叉點上所對應的循環數；閾值則是可與背景區分開的訊號水平。SA 和 IPAC 測定法的結果判定如下：

Ct 值	結果判定
Undetermined (不確定)	陰性
≤ 37	陽性
> 37 (高 Ct 值)	弱陽性

如檢測得出 Ct 值高的陽性結果，即代表反應中的目標物質含量低，而且有關分析數值或與檢測限差距不大。檢測人員須重複進行整個分析過程，以確認檢測得出的是陽性結果。

4.5.2 下列是各項系統對照預計應得出的結果。每項對照均須得出有效值，倘若任何一項對照的觀測結果與相應的有效值之間存在差距，則須重新進行分析。

系統對照	測定法	有效 Ct 值
環境對照 (EC)	SA	Undetermined (不確定)
	IPAC	Undetermined (不確定)
提取陽性對照 (EPC)	SA	Ct 值 ≤ 37
	IPAC	Ct 值 ≤ 37
提取陰性對照 (ENC)	SA	Undetermined (不確定)
	IPAC	Undetermined (不確定)
目標 DNA 陽性對照 (P)	SA	Ct 值 ≤ 37
	IPAC	Ct 值 ≤ 37
目標 DNA 陰性對照 (N)*	SA	Undetermined (不確定)
	IPAC	Ct 值 ≤ 37

無模板對照 (NTC)	SA	Undetermined (不確定)
	IPAC	Undetermined (不確定)

* 建議進行目標 DNA 陰性對照。此項對照可證明核酸擴增程序有效進行，並排除在沒有代表目標物種的核酸情況下仍得出假陽性擴增的可能。川貝母的 DNA 可用作進行目標 DNA 陰性對照。

5. 質量控制參數

檢測人員檢查每次分析結果是否符合質量控制的接受準則，從而判斷分析結果是否可予接受，以及能否達到有關檢測方法的目的。衡量檢測方法是否符合質量控制計劃時，檢測人員應按操作人員處理 DNA 分析的合理能力範圍，決定每批樣品的數量。

5.1 使用系統對照

本檢測方法的系統對照表列如下，箭號(↓)表示各分析步驟中應該進行的對照。

分析步驟	環境對照 ^a	提取陰性對照 ^b	提取陽性對照 ^c	樣品重複對照 ^d	目標 DNA 陽性對照 ^e	目標 DNA 陰性對照 ^f	PCR 陰性對照 ^g
均質化	↓						
DNA 提取	↓	↓	↓	↓			
核酸的擴增及檢測	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓

備註：

- 實驗室如使用環境對照，便能在早期階段找出污染源頭及受污染的工作區。進行此項對照時，須在試管內注入適當分量且不含核酸的水，並在整個研磨過程中讓試管口保持打開狀態，讓空氣自由進出試管。
- 提取陰性對照是 DNA 提取過程的陰性對照，當中不加入任何樣品。此項對照用於證明提取過程中沒有出現會污染樣品的核酸，用於進行此對照的試管須放在最後一個 DNA 提取樣品的後面位置。每當要從一個或多個樣品中提取 DNA 時，均須包括最少 1 個提取陰性對照。
- 提取陽性對照的作用是證明有關 DNA 提取程序能夠提取出目標 DNA。進行此項對照時須使用經認證參考材料或已知陽性樣品，而有關材料或樣品須含有所研究的序列。就此項對照進行平行雙樣分析為佳。
- 在整個分析過程中，須對樣品進行平行雙樣分析，以證明檢測結果一致。
- 目標 DNA 陽性對照可以是參考 DNA、從經認證參考材料提取的 DNA，或從已知的陽性樣品提取的 DNA，而此等 DNA 須能代表本測試方法所研究的 DNA 序列或生物。此項對照的作用是展示 PCR 測定法的特異分析效果。合適的提取陽性對照也可滿足這項條件。
- 進行目標 DNA 陰性對照所使用的是從經認證參考材料或已知陰性樣品提取的 DNA，而兩者均

不可含有本測試方法所研究的 DNA 序列。此項對照可用於顯示，如檢測樣品不含目標 DNA 序列，分析結果便會呈陰性。

- g) PCR 陰性對照的作用是檢查 PCR 過程中所用試劑及其間操作過程有否欠妥之處。此項對照可用於證明所使用的 PCR 試劑不含任何會污染樣品的核酸。就此項對照，須進行平行雙樣分析。

5.2 系統對照是以實時 PCR 評估的，所須達到的參數要求如下：

	參數	可接受標準
A	環境對照	IPAC 和 SA 均得出陰性結果
B	提取陰性對照	IPAC 和 SA 均得出陰性結果
C	提取陽性對照	IPAC 和 SA 均得出陽性結果
D	樣品重複對照	重複分析檢測樣品均得出一致結果
E	目標 DNA 陽性對照	IPAC 和 SA 均得出陽性結果
F	目標 DNA 陰性對照	IPAC 得出陽性結果 SA 得出陰性結果
G	PCR 陰性對照	IPAC 和 SA 均得出陰性結果

6. 參考資料

- 6.1 國家藥典委員會(無日期)：《中華人民共和國藥典》(2020 年版)。北京：中國醫藥科技出版社。

- 6.2 《植物類中藥材的 DNA 條形碼檢測方法》(GCMTI RD-5:2020)。

此文件可於互聯網上瀏覽：

https://www.cmro.gov.hk/html/b5/useful_information/gcmti/research/testing_methods/plant_derived.html (取覽日期：2021 年 4 月 13 日)

附件 A (規範標準)

離心柱式 DNA 提取規程

本規程經政府中藥檢測中心的內部驗證，可於利用實時定性 PCR 檢測方法鑒別平貝母(川貝母中常見摻雜品)時使用。如對附件 A 所載方法的程序作出任何修改，檢測人員應加以充分驗證，並有責任評估檢測中選用的測試項目是否合適。

- A1. 在打開盛載着樣品粉末的研磨管或微型管前，應先對其進行短時間的瞬時離心。
- A2. 把裂解緩衝液(LB)與蛋白酶 K(20 毫克/毫升)按 10 比 1 的比例混合，配製成蛋白酶 K-裂解緩衝液(PLB)。例如，把 2 毫升蛋白酶 K 與 20 毫升的裂解緩衝液混合。
- A3. 把 1 毫升的蛋白酶 K-裂解緩衝液、25 微升的 α -澱粉酶和 5 微升的核糖核酸酶 A 放進研磨管或微型管。
- A4. 關上管蓋，然後渦漩振蕩管子以混勻樣品。

註：應確保裂解混合物中的組織微粒可自由流動，而非沉積於管底。如有需要，可多加緩衝液。

- A5. 如情況合適，把微型管或研磨管放在組織研磨儀的適配器，把振動頻率設定為 28 赫茲，時間則設定為 30 秒，然後拆開適配器並轉動 180 度，再以 28 赫茲振動 30 秒。
- A6. 進行培養程序前，用手搖勻每個樣品。
- A7. 把樣品置於恆溫混勻儀，以 56°C 進行為時 30 分鐘的樣品培養，再以 65°C 進行 1 小時的樣品培養。
- A8. 以最高速度對經過培養的樣品進行 1 分鐘的離心處理，使細胞碎片沉澱。離心時間或須延長以把上澄液和鬆散的細胞碎片分隔開來。
- A9. 把 350 微升的裂解物轉移至容量為 1.5 毫升的潔淨微型管，然後往每個樣品中加入 350 微升的提取結合緩衝液(EBB)。

註：若提取結合緩衝液再有結晶情況出現，須經 56°C 預熱以溶解其中的結晶體，再經混勻後方可使用。另一方面，若樣品的 DNA 產量低，有需要時可增加裂解物的分量，但同時要按比例多加提取結合緩衝液。

- A10. 充分混合微型管中的裂解物和提取結合緩衝液。
- A11. 把離心柱放在收集管上，然後把微型管內所有混合液倒進離心柱。

- A12. 離心柱以 5,000 至 6,000xg 離心 2 分鐘，讓 DNA 吸附於離心柱膜。完成後，將離心柱置於新的收集管上。
- A13. 第一次清洗步驟：把 180 微升提取漂洗液(EWB)注入離心柱，以 5,000 至 6,000xg 進行 2 分鐘的離心處理。
- A14. 第二次清洗步驟：把 600 微升提取漂洗液注入離心柱，以 5,000 至 6,000xg 進行 4 分鐘的離心處理，將離心柱置於新的收集管上，並重複此清洗步驟一次。
- 註：如樣品含大量色素，或於第 A9 段所述步驟加入了額外的裂解物，則或須再清洗一次。
- A15. 完成後，將離心柱置於新的收集管上，並以最高速度進行 4 分鐘的離心處理，把離心柱膜轉乾。
- A16. 將離心柱置於新的微型管(容量為 1.5 毫升)，打開離心柱蓋，以 56°C 進行 30 分鐘的培養程序，以除去殘留於離心柱膜上的乙醇。
- A17. 把 80 微升已預熱的純水直接加在離心柱膜上，在室溫下進行 1 分鐘的培養程序。
- 註：如要增加 DNA 的濃度，可加入較建議分量少的純水，但 DNA 產量會有所下降。
- A18. 以最高速度進行 4 分鐘的離心處理，洗脫 DNA。
- A19. 可即時對 DNA 提取物進行歸一化處理以作實時 PCR 分析，否則須先將 DNA 提取物貯存於-20°C 下待用。

附件 B
(規範標準)

實時 PCR 測定法

表 B1. 引物／探針組

本檢測方法中使用的引物／探針組表列如下。未標記 PCR 引物和 TaqMan 探針可從專門合成寡核苷酸的供應商訂購。

測定法 ¹	引物／探針	寡核苷酸 DNA 序列(5'-3')	最終濃度	目標位置
特異性擴增(SA)	正向引物	TCCTTAATGTTTACTTCTGC TTTATCCTTGT	900 納摩爾每升	位於平貝母葉綠體基因組(NCBI 登記號 KY646166.1)第 118239 至 118357 個鹼基對。 探針辨識第 118284 至 118306 個鹼基對。
	反向引物	GTCGATGAGTTAAACCAGA TAGTTATATGAGT	900 納摩爾每升	
	探針 ²	ATGTGTAGTAAAAAGAGAA AATC	250 納摩爾每升	
內部陽性擴增對照(IPAC)	正向引物	CGGACGAGAATAAAGAGA GAGT	900 納摩爾每升	位於平貝母葉綠體基因組(NCBI 登記號 KY646166.1)第 45480 至 45602 個鹼基對。 探針辨識第 45544 至 45558 個鹼基對。
	反向引物	TATTGGGGATAGAGGGACT TGA	900 納摩爾每升	
	探針 ²	AAAAGGAAAATCCGT	250 納摩爾每升	

備註：

- SA 和 IPAC 的檢測試劑盒 ID 分別為 APGZHAC 和 APNKWA7。
- TaqMan 探針的 5'端帶有螢光標記(FAM)，3'端則帶有小溝結合物(MGB)和非螢光淬滅劑(NFQ)。

表 B2. 擴增目標擴增子所須的 PCR 條件

組分	SA	IPAC
含有 TaqMan 探針(5 微摩爾每升)和引物(18 微摩爾每升)的 20X 檢測試劑盒(20X assay) ¹	0.5 微升	0.5 微升
2X PCR 預混液 ³	5.0 微升	5.0 微升
模板 DNA ⁴	4.5 微升	4.5 微升
每個反應的總體積	10.0 微升	10.0 微升

3. 使用了經優化的即用型 2X PCR 預混液，當中包含了模板 DNA、引物和探針以外的所有組分。2X PCR 預混液含有熱穩定 DNA 聚合酶、混有脫氧尿苷三磷酸 (dUTP) 和尿嘧啶-N-糖基化酶(UNG)的脫氧核糖核苷三磷酸(dNTP)混合物(用於盡量減少 PCR 殘留污染)，以及被動參比染料“ROX”和經優化的緩衝液組分(用於快速實時 PCR 分析)。
4. 應利用實時 PCR 同步分析濃度歸一至每微升 10 納克的 DNA 提取物和稀釋 5 倍的 DNA 提取物。

表 B3. SA 和 IPAC 的實時 PCR 循環條件

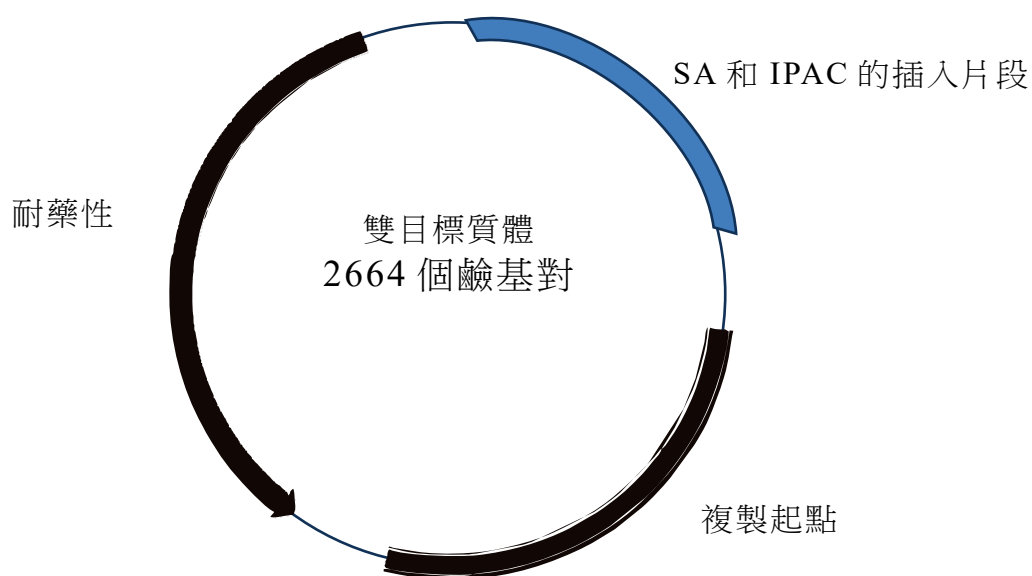
溫度	時間	循環次數
50°C	120 秒	1
95°C	120 秒	1
95°C	1 秒	40
65°C	20 秒	

附件 C (資訊性)

有關雙目標質體 DNA 的資訊

C1. 有關質體 DNA 的描述及質體圖譜

合成的雙目標質體由 SA 和 IPAC 的合成寡核苷酸組合而成。有關片段插入 pMA-T 質體(一種類 pUC18 的質體)中。質體 DNA 由轉化菌純化所得，其濃度是以紫外線光譜法測定的。最終構建體已通過定序驗證。插入位點內的序列一致性為 100%。



雙目標質體的圖譜

C2. 核苷酸的完整序列及質體中插入片段的註解

```

1   GAGTTTATACTCCTTAATGTTTACTTCTGCTTTATCCTTGTATATAGGGAATGAGATTTT 60

61  CTCTTTTACTACACATTGATAAGCTGTTTTGTTTTACTCATATAACTATCTGGTTTAAC 120

                                     HindIII
                                     |
121 TCATCGACCTGAATAACTCTGAAGCTTACTGATTATTCGGACGAGAATAAAGAGAGAGTC 180

181 CCATTCTACGTGTCAATACCGACAACAATGAAATTTATAGTAAAAGGAAAATCCGTCGAC 240

241 TTTATAAGTCGTGAGGGTTCAAGTCCCTCTATCCCAATAAAAGCCATT 290

```

圖例

劃有單行底線的第 1~141 個核苷酸：SA 擴增子(141 個鹼基對)

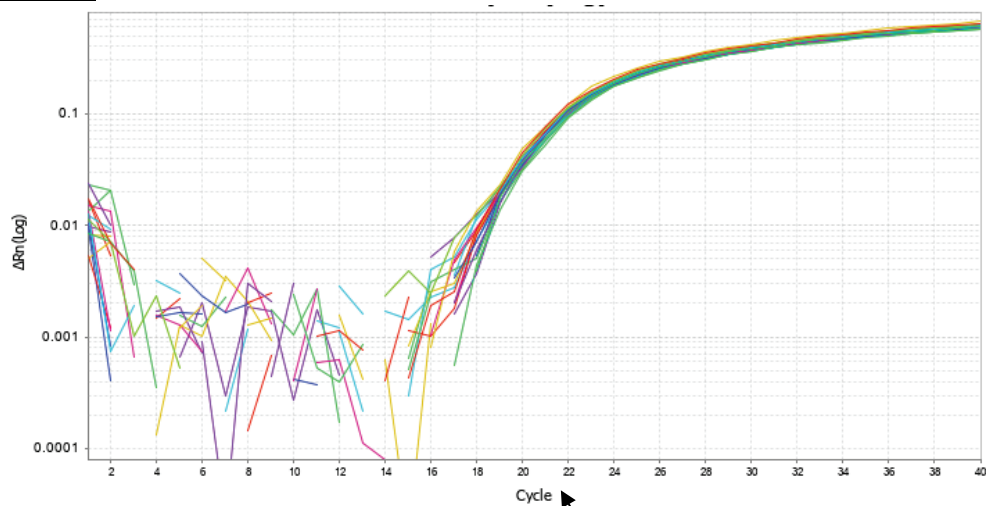
帶有灰色底色的第 148~290 個核苷酸：IPAC 擴增子(143 個鹼基對)

2 個目標序列被位於第 142~147 個核苷酸的 HindIII 限制性內切酶酶切位點分隔開。

C3. 以 SA 和 IPAC 測定法分析拷貝數為 450,000 的雙目標質體所得出的擴增曲線

政府中藥檢測中心在 4 次獨立的實時 PCR 檢測中，共完成了超過 20 組重複分析。SA 和 IPAC 測定法得出的平均 Ct 值分別為 20.4 ± 0.18 和 19.0 ± 0.27 。

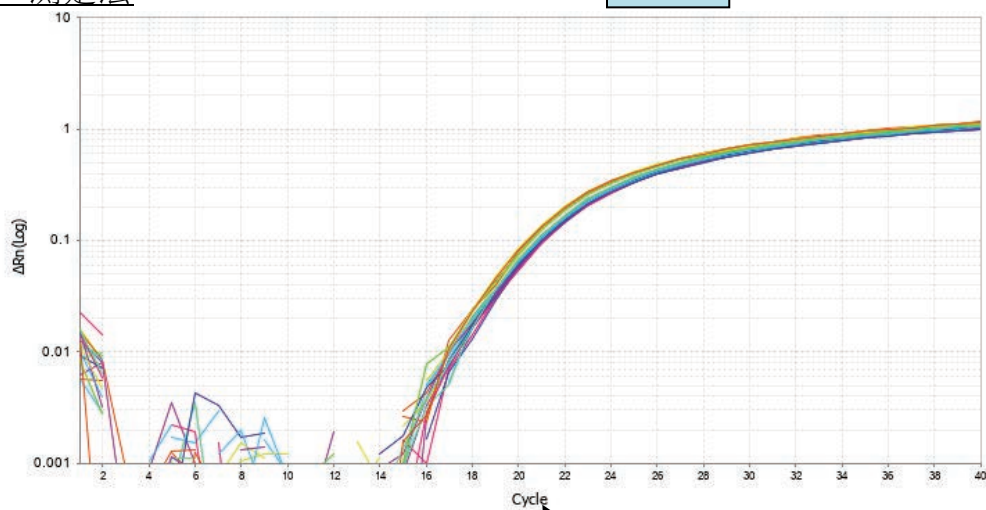
SA 測定法



Cycle

循環數

IPAC 測定法



Cycle

循環數