

GCMTI RD-1:2022

政府中药检测中心方法



川贝母中常见掺杂物 –
平贝母的实时定性聚合酶链式反应检测方法

川贝母中常见掺杂品 – 平贝母的实时定性聚合酶链式反应检测方法

安全预防措施：本检测方法涉及危险物品。处理有关物品时，检测人员应采取适当的防护措施，戴上护眼及护手装备，如有需要可在抽气柜或生物安全柜进行检测工作。

1. 简介

- 1.1 本检测方法阐述如何利用实时定性聚合酶链式反应(PCR)测定法，从川贝母(*Bulbus Fritillariae Cirrhosae*)中鉴别出平贝母(*Bulbus Fritillariae Ussuriensis*)。平贝母是川贝母中常见的掺杂品。据《中华人民共和国药典》(2020年版)所载，平贝母源自植物平贝母(*Fritillaria ussuriensis* Maxim.)的干燥鳞茎，而川贝母的来源则是6种贝母属植物的干燥鳞茎，分别是川贝母(*Fritillaria cirrhosa* D. Don)、暗紫贝母(*Fritillaria unibracteata* Hsiao et K.C. Hsia)、甘肃贝母(*Fritillaria przewalskii* Maxim)、梭砂贝母(*Fritillaria delavayi* Franch)、太白贝母(*Fritillaria taipaiensis* P. Y. Li)和瓦布贝母(*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 本检测方法和附件载列有关检测规程，以供进行检测时参考。本检测方法的分析过程包括以下步骤：1. 提取脱氧核糖核酸(DNA)；2. 利用实时 PCR 进行扩增和检出目标 DNA 区域，以作区分；以及 3. 数据分析。

2. 试剂及材料

所有使用的化学品或试剂须为分子生物或 PCR 等级，并适用于 DNA 分析。分析时所用的水须经过双重蒸馏或属于 PCR 等级，并且不含核酸酶及核酸。在可行的情况下，在使用有关化学品、试剂及水前须先进行高压灭菌。操作人员在进行任何程序时均须戴上无粉手套，并建议使用含滤芯的移液管吸嘴，避免交叉污染。

《补充资料》载有本检测方法所使用的检测试剂及材料，以供参考。

3. 设备

《补充资料》列出本检测方法所使用的实验室设备及仪器，整个分析过程中主要使用的设备如下：

- 3.1 **层流柜：**为工作区提供经高效能空气微粒子(HEPA)过滤的单向空气，以防样品受到污染。
- 3.2 **温控培养箱：**为提取核酸提供实验条件。

- 3.3 桌上型微量离心机：透过高速旋转样品提取核酸。
- 3.4 分光光度计：用以评估双链 DNA 的纯度及产量。
- 3.5 实时 PCR 分析系统：利用 PCR 扩增 DNA 及检出扩增所得的 PCR 产物。

4. 一般程序

附件 A 和《补充资料》所述的检测规程仅供参考。操作人员应按其经验，并考虑测试范围和样品性质，以衡量有关方法是否合适，继而决定所使用的方法。操作人员应参考相关的国际 / 国家标准(如适用)。为确保测试结果准确有效，在情况适用下，对照应按第 5 段所述与检测样品同步接受检测，以检查分析纯试剂中或样品之间的 DNA 有否受到污染。

4.1 样品制备

负责制备样品(例如进行粒度减少、均质化和取样等程序)的操作人员应具备良好的实验室操作水平，能防止实验室内出现交叉污染，以免致使检测结果无效。

4.2 DNA 提取

4.2.1 DNA 检测方法的先决条件是取得可扩增的 DNA。一般而言，商业的 DNA 分离试剂盒或实验室配制的试剂均可用以提取可扩增的 DNA。经政府中药检测中心验证的提取方法载于附件 A，以供参考。商业试剂盒的质量由制造商妥为管控及保证，可更容易管控提取过程的质量，亦可节省排解问题的时间。检测人员如使用其他试剂盒，或对附件 A 所载程序作出任何修改，均须加以充分验证，并有责任评估检测中选用的测试项目是否合适。

4.2.2 应根据药材的化学 / 细胞成分，选用合适的 DNA 提取试剂盒或规程。为取得质量够好且分量充足的 DNA 提取物用于后续的 PCR 扩增程序，在情况适用下，应除去药材中下列成分：

4.2.2.1 多糖部分(例如果胶、纤维素、半纤维素及淀粉等)：可使用合适的酶(例如果胶酶、纤维素酶、 α -淀粉酶等)进行酶解处理去除。

4.2.2.2 核糖核酸(RNA)及 / 或蛋白质：可分别使用核糖核酸酶及蛋白酶进行酶解处理后去除。

4.2.2.3 脂质部分：可进行酶解处理或使用溶剂提取法(如正己烷)来去除。

4.2.2.4 色素(例如酚类化合物、鞣质及其他次级代谢物)：可使用聚乙烯吡咯烷酮(PVP)及 / 或 2-巯基乙醇来去除。

4.2.3 DNA 提取物的质量可通过以下方法评估：

- 4.2.3.1 分光光度分析；以及
- 4.2.3.2 扩增植物类群的内源基因。

4.3 利用实时 PCR 进行扩增

- 4.3.1 本检测方法涉及 2 种分别使用不同引物 / 探针的测定法，适用于下列用途：
 - 4.3.1.1 本检测方法中的特异性扩增测定法(**specific amplification assay**, 简称 SA)利用特异的引物 / 探针组检出平贝母的特征 DNA 区域。SA 能辨识平贝母的叶绿体 DNA 区域并与之结合，呈现阳性扩增。反之，在对川贝母、暗紫贝母、甘肃贝母、梭砂贝母、太白贝母、瓦布贝母及其他植物材料进行测定时，不会出现扩增现象。
 - 4.3.1.2 内部阳性扩增对照测定法(**internal positive amplification control assay**, 简称 IPAC)则利用质控引物 / 探针组，确保所测试样品的基因组 DNA 是可扩增的。IPAC 能辨识所检测植物(包括平贝母、川贝母、暗紫贝母、甘肃贝母、梭砂贝母、太白贝母、瓦布贝母)的部分叶绿体 DNA 区域并与之结合，呈现阳性扩增。
 - 4.3.1.3 每个检测样品均须同时以上述 2 种测定法分析。有关本检测方法中使用的所有引物 / 探针组的资料载于附件 B 的表 B1。
- 4.3.2 建议对每个检测样品进行重复分析，并且以 2 个不同的模板 DNA 量进行，配制样品时以第 4.2.3.1 段所述方法量度得出的浓度为依据：
 - 4.3.2.1 浓度归一的 DNA 提取物：以分子级水将 DNA 提取物的浓度稀释至每微升 10 纳克。
 - 4.3.2.2 稀释的 DNA 提取物：以分子级水将浓度归一的 DNA 提取物进一步稀释 5 倍。
- 4.3.3 检测人员须利用实时 PCR 同步分析浓度归一的 DNA 提取物、稀释的 DNA 提取物，以及第 5.1 段所列的合适对照。
- 4.3.4 分别按照附件 B 的表 B2 和 B3 配制 PCR 预混液及进行 PCR 分析。

4.4 数据分析

- 4.4.1 使用下列设定分析数据：
 - 4.4.1.1 手动设定阈值(**manual threshold**): 进行 SA 分析时把阈值设定为 0.05，进行 IPAC 分析时则设定为 0.04。
 - 4.4.1.2 手动设定基线(**manual baseline**): 把基线设定为第 3 至第 15 个循环。

注：

- a) 数据评估须根据实时 PCR 仪器生产商建议的一般分析程序进行。此设定适用于经政府中药检测中心内部验证的规程及指定的实时系统。
- b) 使用此检测规程分析带有 SA 和 IPAC 的单拷贝序列的双目标质体，在进行实时 PCR 分析时加入拷贝数为 450,000 的质体 DNA，SA 和 IPAC 测定法得出的平均循环数阈值(Ct 值)结果分别为 20.4 ± 0.18 和 19.0 ± 0.27 。阈值须设定在扩增曲线的线性期。有关质体图谱和实时 PCR 检测的结果载于附件 C。

4.4.2 将数据(包括但不限于 Ct 值)输出至试算表程式，以作进一步分析。

4.5 结果分析

4.5.1 判定检测结果的基准是循环数阈值，亦即是 Ct 值。Ct 值是指反应萤光强度与指定阈值的交叉点上所对应的循环数；阈值则是可与背景区分开的讯号水平。SA 和 IPAC 测定法的结果判定如下：

Ct 值	结果判定
Undetermined (不确定)	阴性
≤ 37	阳性
> 37 (高 Ct 值)	弱阳性

如检测得出 Ct 值高的阳性结果，即代表反应中的目标物质含量低，而且有关分析数值或与检测限差距不大。检测人员须重复进行整个分析过程，以确认检测得出的是阳性结果。

4.5.2 下列是各项系统对照预计应得出的结果。每项对照均须得出有效值，倘若任何一项对照的观测结果与相应的有效值之间存在差距，则须重新进行分析。

系统对照	测定法	有效 Ct 值
环境对照 (EC)	SA	Undetermined (不确定)
	IPAC	Undetermined (不确定)
提取阳性对照 (EPC)	SA	Ct 值 ≤ 37
	IPAC	Ct 值 ≤ 37
提取阴性对照 (ENC)	SA	Undetermined (不确定)
	IPAC	Undetermined (不确定)
目标 DNA 阳性对照 (P)	SA	Ct 值 ≤ 37
	IPAC	Ct 值 ≤ 37
目标 DNA 阴性对照 (N)*	SA	Undetermined (不确定)
	IPAC	Ct 值 ≤ 37
无模板对照	SA	Undetermined (不确定)

(NTC)	IPAC	Undetermined (不确定)
-------	------	--------------------

* 建议进行目标 DNA 阴性对照。此项对照可证明核酸扩增程序有效进行，并排除在没有代表目标物种的核酸情况下仍得出假阳性扩增的可能。川贝母的 DNA 可用作进行目标 DNA 阴性对照。

5. 质量控制参数

检测人员检查每次分析结果是否符合质量控制的接受准则，从而判断分析结果是否可予接受，以及能否达到有关检测方法的目的。衡量检测方法是否符合质量控制计划时，检测人员应按操作人员处理 DNA 分析的合理能力范围，决定每批样品的数量。

5.1 使用系统对照

本检测方法的系统对照表列如下，箭号(↓)表示各分析步骤中应该进行的对照。

分析步骤	环境对照 ^a	提取阴性对照 ^b	提取阳性对照 ^c	样品重复对照 ^d	目标 DNA 阳性对照 ^e	目标 DNA 阴性对照 ^f	PCR 阴性对照 ^g
均质化	↓						
DNA 提取	↓	↓	↓	↓			
核酸的扩增及检测	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓

备注：

- 实验室如使用环境对照，便能在早期阶段找出污染源头及受污染的工作区。进行此项对照时，须在试管内注入适当分量且不含核酸的水，并在整个研磨过程中让试管口保持打开状态，让空气自由进出试管。
- 提取阴性对照是 DNA 提取过程的阴性对照，当中不加入任何样品。此项对照用于证明提取过程中没有出现会污染样品的核酸，用于进行此对照的试管须放在最后一个 DNA 提取样品的后面位置。每当要从一个或多个样品中提取 DNA 时，均须包括最少 1 个提取阴性对照。
- 提取阳性对照的作用是证明有关 DNA 提取程序能够提取出目标 DNA。进行此项对照时须使用经认证参考材料或已知阳性样品，而有关材料或样品须含有所研究的序列。就此项对照进行平行双样分析为佳。
- 在整个分析过程中，须对样品进行平行双样分析，以证明检测结果一致。
- 目标 DNA 阳性对照可以是参考 DNA、从经认证参考材料提取的 DNA，或从已知的阳性样品提取的 DNA，而此等 DNA 须能代表本测试方法所研究的 DNA 序列或生物。此项对照的作用是展示 PCR 测定法的特异分析效果。合适的提取阳性对照也可满足这项条件。
- 进行目标 DNA 阴性对照所使用的是从经认证参考材料或已知阴性样品提取的 DNA，而两者均不可含有本测试方法所研究的 DNA 序列。此项对照可用于显示，如检测样品不含目标 DNA 序列，分析结果便会呈阴性。

- g) PCR 阴性对照的作用是检查 PCR 过程中所用试剂及其间操作过程有否欠妥之处。此项对照可用于证明所使用的 PCR 试剂不含任何会污染样品的核酸。就此项对照，须进行平行双样分析。

5.2 系统对照是以实时 PCR 评估的，所须达到的参数要求如下：

	参数	可接受标准
A	环境对照	IPAC 和 SA 均得出阴性结果
B	提取阴性对照	IPAC 和 SA 均得出阴性结果
C	提取阳性对照	IPAC 和 SA 均得出阳性结果
D	样品重复对照	重复分析检测样品均得出一致结果
E	目标 DNA 阳性对照	IPAC 和 SA 均得出阳性结果
F	目标 DNA 阴性对照	IPAC 得出阳性结果 SA 得出阴性结果
G	PCR 阴性对照	IPAC 和 SA 均得出阴性结果

6. 参考资料

- 6.1 国家药典委员会(无日期)：《中华人民共和国药典》(2020 年版)。北京：中国医药科技出版社。
- 6.2 《植物类中药材的 DNA 条形码检测方法》(GCMTI RD-5:2020)。
此文件可于互联网上浏览：
https://www.cmro.gov.hk/html/b5/useful_information/gcmti/research/testing_methods/plant_derived.html (取览日期：2021 年 4 月 13 日)

附件 A (规范标准)

离心柱式 DNA 提取规程

本规程经政府中药检测中心的内部验证，可于利用实时定性 PCR 检测方法鉴别平贝母(川贝母中常见掺杂品)时使用。如对附件 A 所载方法的程序作出任何修改，检测人员应加以充分验证，并有责任评估检测中选用的测试项目是否合适。

- A1. 在打开盛载着样品粉末的研磨管或微型管前，应先对其进行短时间的瞬时离心。
- A2. 把裂解缓冲液(LB)与蛋白酶 K(20 毫克 / 毫升)按 10 比 1 的比例混合，配制蛋白酶 K-裂解缓冲液(PLB)。例如，把 2 毫升蛋白酶 K 与 20 毫升的裂解缓冲液混合。
- A3. 把 1 毫升的蛋白酶 K-裂解缓冲液、25 微升的 α -淀粉酶和 5 微升的核糖核酸酶 A 放进研磨管或微型管。
- A4. 关上管盖，然后涡漩振荡管子以混匀样品。

注：应确保裂解混合物中的组织微粒可自由流动，而非沉积于管底。如有需要，可多加缓冲液。

- A5. 如情况合适，把微型管或研磨管放在组织研磨仪的适配器，把振动频率设定为 28 赫兹，时间则设定为 30 秒，然后拆开适配器并转动 180 度，再以 28 赫兹振动 30 秒。
- A6. 进行培养程序前，用手摇匀每个样品。
- A7. 把样品置于恒温混匀仪，以 56℃ 进行为时 30 分钟的样品培养，再以 65℃ 进行 1 小时的样品培养。
- A8. 以最高速度对经过培养的样品进行 1 分钟的离心处理，使细胞碎片沉淀。离心时间或须延长以把上澄液和松散的细胞碎片分隔开来。
- A9. 把 350 微升的裂解物转移至容量为 1.5 毫升的洁净微型管，然后往每个样品中加入 350 微升的提取结合缓冲液(EBB)。

注：若提取结合缓冲液再有结晶情况出现，须经 56℃ 预热以溶解其中的结晶体，再经混匀后方可使用。另一方面，若样品的 DNA 产量低，有需要时可增加裂解物的分量，但同时要按比例多加提取结合缓冲液。

- A10. 充分混合微型管中的裂解物和提取结合缓冲液。
- A11. 把离心柱放在收集管上，然后把微型管内所有混合液倒进离心柱。

- A12. 离心柱以 5,000 至 6,000xg 离心 2 分钟，让 DNA 吸附于离心柱膜。完成后，将离心柱置于新的收集管上。
- A13. 第一次清洗步骤：把 180 微升提取漂洗液(EWB)注入离心柱，以 5,000 至 6,000xg 进行 2 分钟的离心处理。
- A14. 第二次清洗步骤：把 600 微升提取漂洗液注入离心柱，以 5,000 至 6,000xg 进行 4 分钟的离心处理，将离心柱置于新的收集管上，并重复此清洗步骤一次。
- 注：如样品含大量色素，或于第 A9 段所述步骤加入了额外的裂解物，则或须再清洗一次。
- A15. 完成后，将离心柱置于新的收集管上，并以最高速度进行 4 分钟的离心处理，把离心柱膜转干。
- A16. 将离心柱置于新的微型管(容量为 1.5 毫升)，打开离心柱盖，以 56℃进行 30 分钟的培养程序，以除去残留于离心柱膜上的乙醇。
- A17. 把 80 微升已预热的纯水直接加在离心柱膜上，在室温下进行 1 分钟的培养程序。
- 注：如要增加 DNA 的浓度，可加入较建议分量少的纯水，但 DNA 产量会有所下降。
- A18. 以最高速度进行 4 分钟的离心处理，洗脱 DNA。
- A19. 可即时对 DNA 提取物进行归一化处理以作实时 PCR 分析，否则须先将 DNA 提取物贮存于-20℃下待用。

附件 B
(规范标准)

实时 PCR 测定法

表 B1. 引物 / 探针组

本检测方法中使用的引物 / 探针组表列如下。未标记 PCR 引物和 TaqMan 探针可从专门合成寡核苷酸的供应商订购。

测定法 ¹	引物 / 探针	寡核苷酸 DNA 序列(5'-3')	最终浓度	目标位置
特异性扩增(SA)	正向引物	TCCTTAATGTTTACTTCTGC TTTATCCTTGT	900 纳摩尔每升	位于平贝母叶绿体基因组(NCBI 登记号 KY646166.1)第 118239 至 118357 个碱基对。 探针辨识第 118284 至 118306 个碱基对。
	反向引物	GTCGATGAGTTAAACCAGA TAGTTATATGAGT	900 纳摩尔每升	
	探针 ²	ATGTGTAGTAAAAAGAGAA AATC	250 纳摩尔每升	
内部阳性扩增对照(IPAC)	正向引物	CGGACGAGAATAAAGAGA GAGT	900 纳摩尔每升	位于平贝母叶绿体基因组(NCBI 登记号 KY646166.1)第 45480 至 45602 个碱基对。 探针辨识第 45544 至 45558 个碱基对。
	反向引物	TATTGGGGATAGAGGGACT TGA	900 纳摩尔每升	
	探针 ²	AAAAGGAAAATCCGT	250 纳摩尔每升	

备注：

- SA 和 IPAC 的检测试剂盒 ID 分别为 APGZHAC 和 APNKWA7。
- TaqMan 探针的 5'端带有荧光标记(FAM)，3'端则带有小沟结合物(MGB)和非荧光淬灭剂(NFQ)。

表 B2. 扩增目标扩增子所须的 PCR 条件

组分	SA	IPAC
含有 TaqMan 探针(5 微摩尔每升)和引物(18 微摩尔每升)的 20X 检测试剂盒(20X assay) ¹	0.5 微升	0.5 微升
2X PCR 预混液 ³	5.0 微升	5.0 微升
模板 DNA ⁴	4.5 微升	4.5 微升
每个反应的总体积	10.0 微升	10.0 微升

- 使用了经优化的即用型 2X PCR 预混液，当中包含了模板 DNA、引物和探针以外的所有组分。2X PCR 预混液含有热稳定 DNA 聚合酶、混有脱氧尿苷三磷酸(dUTP)和尿嘧啶-N-糖基化酶(UNG)的脱氧核糖核苷三磷酸(dNTP)混合物(用于尽量减少 PCR 残留污染)，以及被动参比染料“ROX”和经优化的缓冲液组分(用于快速实时 PCR 分析)。
- 应利用实时 PCR 同步分析浓度归一至每微升 10 纳克的 DNA 提取物和稀释 5 倍的 DNA 提取物。

表 B3. SA 和 IPAC 的实时 PCR 循环条件

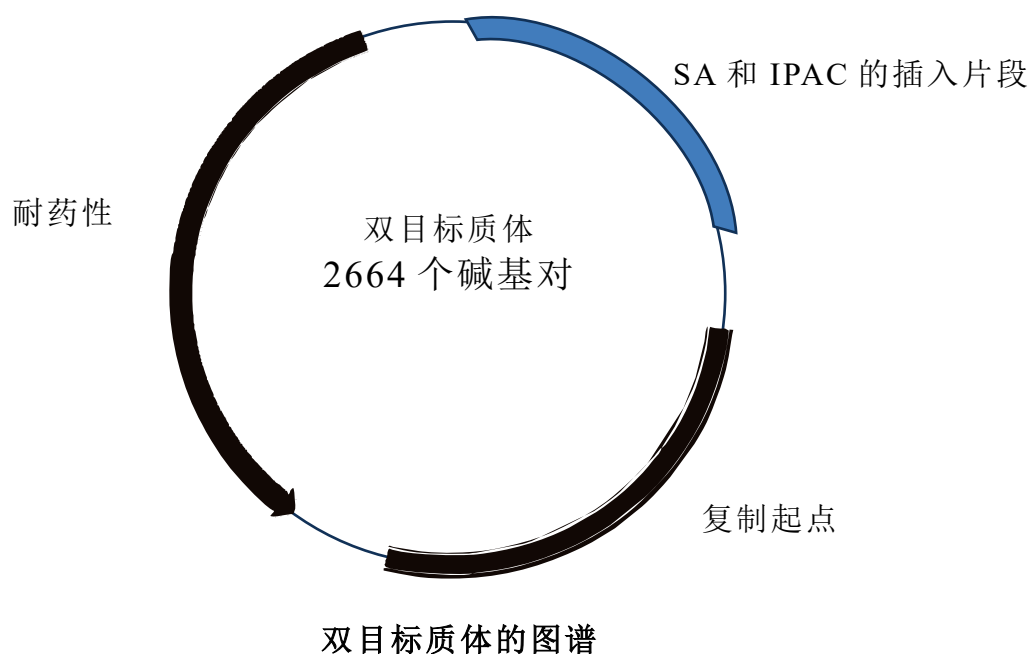
温度	时间	循环次数
50℃	120 秒	1
95℃	120 秒	1
95℃	1 秒	40
65℃	20 秒	

附件 C
(资讯性)

有关双目标质体 DNA 的资讯

C1. 有关质体 DNA 的描述及质体图谱

合成的双目标质体由 SA 和 IPAC 的合成寡核苷酸组合而成。有关片段插入 pMA-T 质体(一种类 pUC18 的质体)中。质体 DNA 由转化菌纯化所得，其浓度是以紫外线光谱法测定的。最终构建体已通过定序验证。插入位点内的序列一致性为 100%。



C2. 核苷酸的完整序列及质体中插入片段的注解

```

1   GAGTTTATACTCCTTAATGTTTACTTCTGCTTTATCCTTGTATATAGGGAATGAGATTTT 60

61  CTCTTTTACTACACATTGATAAGCTGTTTTGTTTTACTCATATAACTATCTGGTTTAAC 120

                                     HindIII
                                     |
121  TCATCGACCTGAATAACTCTGAAGCTTACTGATTATTCGGACGAGAATAAAGAGAGAGTC 180

181  CCATTCTACGTGTCAATACCGACAACAATGAAATTTATAGTAAAAGGAAAATCCGTCGAC 240

241  TTTATAAGTCGTGAGGGTTCAAGTCCCTCTATCCCAATAAAAGCCATT 290

```

图例

划有单行底线的第 1~141 个核苷酸：SA 扩增子(141 个碱基对)

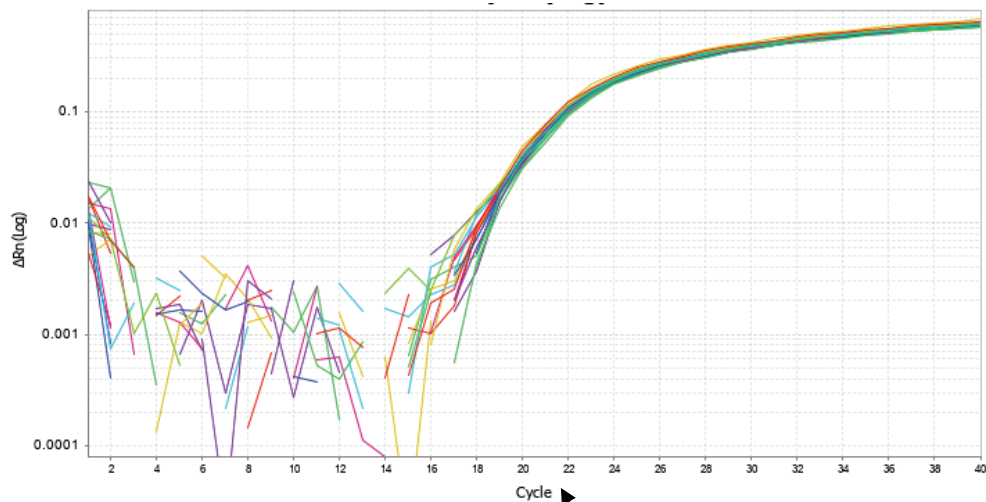
带有灰色底色的第 148~290 个核苷酸：IPAC 扩增子(143 个碱基对)

2 个目标序列被位于第 142~147 个核苷酸的 HindIII 限制性内切酶酶切位点分隔开。

C3. 以 SA 和 IPAC 测定法分析拷贝数为 450,000 的双目标质体所得出的扩增曲线

政府中药检测中心在 4 次独立的实时 PCR 检测中，共完成了超过 20 组重复分析。SA 和 IPAC 测定法得出的平均 Ct 值分别为 20.4 ± 0.18 和 19.0 ± 0.27 。

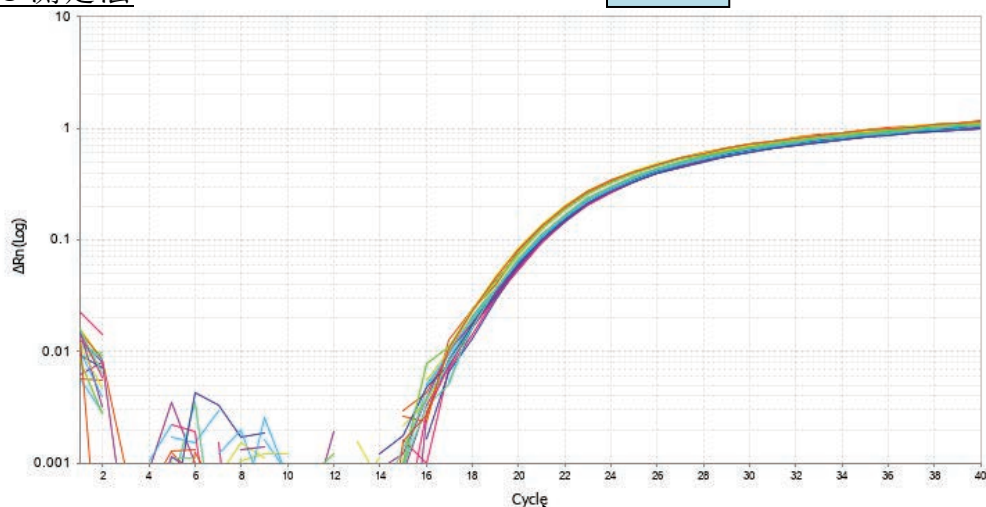
SA 测定法



Cycle

循环数

IPAC 测定法



Cycle

循环数