



GCMTI RD-4:2020

政府中藥檢測中心方法



利用特異性聚合酶鏈式反應區分兩種真品鹿茸的物種

利用特異性聚合酶鏈式反應區分兩種真品鹿茸的物種

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，戴上護眼及護手用具，並在需要時在抽氣櫃或生物安全櫃內進行檢測工作。

1. 簡介

特異性聚合酶鏈式反應(“特異性 PCR”)利用特異性引物來識別目標物種，無須像 DNA 測序法般(如 DNA 條形碼)進行脫氧核糖核酸(DNA)測序，操作流程較為簡單快捷，所以廣泛應用在快速篩選病原體、環境中的微生物、食物及草藥的物種來源。2015 年版《中國藥典》採用特異性 PCR 方法鑒別動物類的中藥材(CMM)物種，包括蕓蛇(*Deinagkistrodon acutus*)、烏梢蛇(*Zaocys dhumnades*)和金錢白花蛇(*Bungarus multicinctus*)。

本檢測方法闡釋一種利用特異性 PCR 作篩選鹿茸飲片正品品種梅花鹿(*Cervus nippon*)和馬鹿(*Cervus elaphus*)的方法。這方法適用於單一鹿茸物種的完整或粉狀樣品。

《補充資料》載列有關標準規程，以供進行檢測時參考。

本檢測方法的分析過程分為以下步驟：1. DNA 提取；2. 特異性 PCR 擴增目標特徵 DNA 區域區分物種；3. 電泳；4. 結果分析。

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。所用的水應經過雙重蒸餾或為 PCR 等級，並且不含核酸酶及核酸。在可行的情況下，有關化學品、試劑及水在使用前均應先進行高壓滅菌。操作人員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。

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，整個分析過程中的主要設備臚列如下：

- 3.1 層流櫃：在工作區提供經高效能空氣微粒子(HEPA)過濾的單向空氣，以防樣品受污染。
- 3.2 溫控培養箱：為提取核酸提供實驗條件。
- 3.3 分光光度計：用以評估雙鏈 DNA 的純度及產量。
- 3.4 PCR 熱循環儀：用於 PCR 中擴增 DNA。
- 3.5 電泳系統：檢查擴增的 PCR 產物。

4. 一般程序

為了確保測試結果準確有效，對照應按第 5 段所述與樣品同步進行檢測，以檢查試劑或樣品有否受到污染。

《補充資料》所述的規程、試劑、材料和儀器僅供參考；如對規程作出任何修改，包括但不限於使用其他試劑組合或更改程序，檢測人員應加以充分驗證，並有責任評估有關修改是否適用於測試項目。

4.1 樣品製備

負責製備樣品(如粒度減少、均質化和取樣)的操作人員應具有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，提取 DNA 的過程基本上可使用商業 DNA 分離試劑盒進行。試劑盒的質量由製造商控制及保證，DNA 提取過程的質量更為容易控制，亦可節省排解問題的時間。

4.2.2 應根據藥材的化學或細胞成分，選擇合適的 DNA 提取試劑盒或規程。為取得足夠的 DNA 提取物進行後續的 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 核糖核酸及／或蛋白質，可分別使用核糖核酸酶及蛋白酶進行酶解反應後去除。

4.2.2.2 含豐富角蛋白的組織部位，如鹿角、毛髮、鱗片等。這些部位可使用二硫代蘇糖醇來增加 DNA 提取效率。

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 擴增動物類羣的內源基因。

4.3 特異性 PCR 擴增目標特徵的 DNA 區域

4.3.1 本檢測方法提供三組引物對：

4.3.1.1 本檢測方法使用 CNIP-f/CNIP-r 作為檢測梅花鹿的特異性引物對，以擴增梅花鹿線粒體部分 DNA 區域，從而產生一條長度為 223 個鹼基對的 DNA 條帶；但此引物對對馬鹿無效，不會產生一條長度為 223 個鹼基對的 DNA 條帶。

4.3.1.2 本檢測方法使用 CELA-f/CELA-r 作為檢測馬鹿的特異

性引物對，以擴增馬鹿線粒體部分 DNA 區域，從而產生一條長度為 248 個鹼基對的 DNA 條帶；但此引物對對梅花鹿無效，不會產生一條長度為 248 個鹼基對的 DNA 條帶。

4.3.1.3 UnivP/UnivQ 為內對照引物對(ICPP)，能與動物線粒體基因組結合。這引物對用以確保樣品的 DNA 提取物可被擴增。在進行特異性 PCR 分析前，DNA 提取物應先以此引物對進行測試，而所有樣品也應以此引物對進行測試。

4.3.1.4 本檢測方法使用的所有引物對資料均載於附錄 A。

4.3.2 配製 PCR 預混液，並按照附錄 A 進行 PCR。

4.4 電泳

4.4.1 PCR 產物可藉手動瓊脂糖凝膠電泳系統或自動電泳系統解析。

4.4.2 攝取 DNA 條帶的影像，並參考 DNA 分子量標記來評估 DNA 條帶的長度。

4.5 結果分析

4.5.1 根據電泳圖中目標 DNA 條帶存在與否(第 4.3.1 段)區分梅花鹿和馬鹿。

5. 質量控制參數

檢測人員應檢查每次分析結果是否符合質量控制的接受準則，判斷分析結果可否接受，以及是否符合分析方法的目的。檢測人員應按操作人員進行 DNA 分析的合理處理能力，決定每批樣品的數量，以符合質量控制計劃的要求。

5.1 使用系統對照

本方法的系統對照表列如下，箭號(↓)表示有關分析步驟所應進行的對照。

分析步驟	提取空白對照 ¹	提取陽性對照 ²	樣品重複對照 ³	PCR 陰性對照 ⁴
DNA 提取	↓	↓	↓	
利用 PCR 擴增 DNA 目標特徵區域	↓	↓	↓	↓
電泳	↓	↓	↓	↓

1. 提取空白對照是 DNA 提取過程的陰性對照，當中不加入樣品。此對照的試管應時

刻放在該批次的最後位置，而且須進行平行雙樣分析。

2. 提取陽性對照是 DNA 提取過程的陽性對照，可檢查提取過程所用試劑及其間操作過程的欠妥之處。對照品為已知分類鑒定的參考材料，或是經過公認的博物館、國家主管部門、大學或研究機構等鑒別或核證其分類地位的生物。這個對照須進行平行雙樣分析。
3. 在整個分析過程中，樣品須進行平行雙樣分析，以確定檢測方法所得結果一致。
4. PCR 陰性對照為 PCR 過程的一種陰性對照，可檢查過程所用試劑或其間操作過程的欠妥之處，並證明所用的 PCR 試劑並無受到核酸污染。這個對照須進行平行雙樣分析。

5.2 所須達到的參數要求

5.2.1 系統對照藉電泳評估，並須符合下列參數要求：

	參數	可接受標準
A	提取空白對照	沒有出現目標 DNA 條帶
B	提取陽性對照	在內對照引物對中出現目標 DNA 條帶 在特異性引物對中出現對應物種的目標 DNA 條帶
C	樣品重複對照	重複樣品的結果一致
D	PCR 陰性對照	沒有出現目標 DNA 條帶

6. 參考資料

國家藥典委員會：《中華人民共和國藥典》2015 年版，北京：中國醫藥科技出版社。

附錄 A
(規範標準)

檢測方法的引物對及 PCR 條件

寡核苷酸引物資料詳見下表。引物可從專門合成寡核苷酸的供應商訂購，標準規格的脫鹽純化引物，已可用於特異性 PCR 分析。

A1. 引物資料

引物名稱	引物方向	寡核苷酸 DNA 序列(5'-3')	擴增子長度 (鹼基對)	目標位置
UnivP	正向	GGTTTACGACCTCGATGTTG	~104	動物線粒體 DNA
UnivQ	反向	CGGGTCTGAACTCAGATCAC		
CNIP-f	正向	CTTACACATGCAAGCATCCA	223	位於梅花鹿線粒體基因組(NCBI 登記號 DQ985076.1)第 110 至 332 個鹼基對
CNIP-r	反向	TTAATCGTATGACCGCGGC		
CELA-f	正向	GCAAGCATCCGCACYCCG	248	位於馬鹿線粒體基因組(NCBI 登記號 KT290948.1)第 119 至 366 個鹼基對
CELA-r	反向	AACACACTTTACGCCGTRKGC		

A2. 擴增目標特徵 DNA 區域的 PCR 條件

試劑	UnivP/UnivQ	CNIP-f/CNIP-r	CELA-f/CELA-r
模板 DNA	~20 奈克	~ 10 奈克	~10 奈克
10X PCR 緩衝液*	1 X	1 X	1 X
氯化鎂	2.0 毫摩爾每升	1.2 毫摩爾每升	1.2 毫摩爾每升
脫氧核糖核苷三磷酸 (dNTP)	0.2 毫摩爾每升 @dNTP	0.2 毫摩爾每升 @dNTP	0.2 毫摩爾每升 @dNTP
正向引物	0.4 微摩爾每升	0.2 微摩爾每升	0.2 微摩爾每升
反向引物	0.4 微摩爾每升	0.2 微摩爾每升	0.2 微摩爾每升
DNA 聚合酶	0.25 微升	0.2 微升	0.2 微升
無核酸酶水	加至最終體積為 25 微升	加至最終體積為 25 微升	加至最終體積為 25 微升

*10X PCR 緩衝液不含鎂離子

A3. 用於擴增目標特徵 DNA 區域的 PCR 循環條件

A. 動物類品質控制引物對 UnivP/UnivQ

溫度	時間	循環次數
95°C	5 分鐘	1
94°C 55°C 72°C	30 秒 30 秒 1 分鐘	30
72°C	7 分鐘	1
4°C	∞	--

B. 梅花鹿特異性 PCR 引物對 CNIP-f/CNIP-r

溫度	時間	循環次數
94°C	2 分鐘	1
94°C 63°C 72°C	30 秒 30 秒 30 秒	30
72°C	5 分鐘	1
4°C	∞	--

C. 馬鹿特異性 PCR 引物對 CELA-f/CELA-r

溫度	時間	循環次數
94°C	2 分鐘	1
94°C 63°C 72°C	30 秒 30 秒 30 秒	30
72°C	5 分鐘	1
4°C	∞	--