



GCMTI RD-5:2020

政府中藥檢測中心方法



植物類中藥材的 **DNA** 條形碼檢測方法

植物類中藥材的 DNA 條形碼檢測方法

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，如戴上護眼及護手用具，並在需要時在抽氣櫃或生物安全櫃進行檢測工作。

1. 簡介

為具系統分類意義的 DNA 標記進行 DNA 序列分析，是鑒別生物材料的一種有效方法，當中稱為 DNA 條形碼的 DNA 標準短序列，在國際上獲廣泛認可用於鑒別物種。

本檢測方法闡釋如何利用通用引物對為植物類中藥材產生 DNA 條形碼。藉選擇中藥材合適的 DNA 標記，便可與已知生物的參考 DNA 序列比對來確認其分類地位，或將之從特定類別的生物組羣區分。

附件 A、附件 B 和《補充資料》載列有關檢測規程，以供進行檢測時參考。本檢測方法適用於未經處理或經適度處理的中草藥，單一物種的原藥材或藥材粉末均可。

本檢測方法的分析過程分為以下步驟：(1)樣品製備；(2) DNA 提取及其質量評估；(3) 聚合酶鏈式反應(PCR)及其檢查與純化；(4) DNA 測序（桑格法）；以及(5) 測序後分析。

本檢測方法載述手動和自動檢測流程，前者投資成本相對較低，後者使用自動化的工具協助進行提取 DNA、DNA 濃度歸一、PCR 程序及電泳等常規步驟，盡量減少人手操作，以應對中至高檢測通量要求。

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。

3.6 自動化液體處理工作台

3.7 自動毛細管電泳系統：用以進行 DNA 測序，解讀 DNA 條形碼的序列。

4. 一般程序

附件 A 和《補充資料》所述的檢測規程僅供參考，實際程序應根據操作人員的經驗，再結合測試範圍和樣品性質，才決定使用的方法及其適用性。操作人員宜參考相關的國際／國家標準(如適用)。為了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進行檢測，以檢查分析純試劑或樣品之間的 DNA 有否受到污染。

4.1 樣品製備

負責製備樣品(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，而商業 DNA 分離試劑盒或實驗室配製的試劑均可用以提取 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管控及保證，可更為容易管控提取過程的質量，亦可節省自行提取 DNA 所需排解問題的時間。檢測人員如使用其他試劑盒，或對附件 A 的 A1 或 A2 所載程序作出任何修改，均應加以充分驗證，並有責任評估有關修改是否適用於測試項目。

4.2.2 應根據藥材的化學或細胞成分，選擇合適 DNA 提取規程。為取得足夠質量達後續的 PCR 擴增要求的 DNA 提取物，在情況適用下，應除去藥材中下列成分：

4.2.2.1 多糖部分可以使用合適的酶進行酶解處理後去除，例如果膠、纖維素、半纖維素及澱粉等多糖，可以使用果膠酶、纖維素酶、 α -澱粉酶；

- 4.2.2.2 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；
- 4.2.2.3 脂質部分，可進行酶解反應或使用溶劑提取法(如正己烷)來去除；
- 4.2.2.4 色素如酚類化合物、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。

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 PCR 擴增 DNA 條形碼

4.3.1 本檢測方法有 3 個陸生植物的 DNA 條形碼可供選擇，包括核糖體 DNA 第二內部轉錄間隔區(ITS2)、葉綠體 *psbA-trnH* 基因間隔區 (*psbA-trnH*)和葉綠體二磷酸核酮糖羧化酶大鏈(*rbcL*)。本方法所選 DNA 條形碼的位置如下：

DNA 條形碼	DNA 條形碼的位置
ITS2	ITS2 位於 5.8S 與 28S 核糖體核糖核酸之間。
<i>psbA-trnH</i>	<i>psbA-trnH</i> 基因間區位於葉綠體光系統 II 蛋白 D1 (<i>psbA</i>)基因與組氨酸運轉核糖核酸 (<i>trnH</i>)基因之間。
<i>rbcL</i>	位於擬南芥(<i>Arabidopsis thaliana</i>)葉綠體基因組(NCBI 登記號 NC_000932)二磷酸核酮糖羧化酶大鏈的 5 端方向第 1 至 599 個鹼基對(排除引物區後則位於第 27 至 579 個鹼基對)。

4.3.2 總括而言，擴增 DNA 條形碼、檢查及純化 PCR 產物的程序如下：

- 4.3.2.1 選擇 DNA 條形碼，然後進行 PCR 擴增。建議的陸生植物引物和 PCR 擴增條件載於附件 B。
- 4.3.2.2 使用電泳方法檢查 PCR 產物，然後純化產物，以進行後續的 DNA 測序。

4.4 DNA 測序

4.4.1 對已純化的 PCR 產物進行循環測序反應。

4.4.2 純化循環測序反應的產物。

4.4.3 利用 DNA 測序儀取得 DNA 條形碼的 DNA 序列。

4.5 測序後分析

4.5.1 使用適合的序列編輯軟件，檢查雙向序列的質量。

4.5.1.1 除去低質量信號和引物區，以進行序列拼接；

4.5.1.2 將正向和反向序列拼接成 FASTA 格式的一致序列；

4.5.1.3 其中一個測序方向中的任何核苷酸(“N”)，可用另一測序方向的相同位置而高質量的鹼基來互補，並繼續識別另一序列同方向的高質量鹼基，以替代低質量的鹼基。

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，以及是否符合分析的目的。考慮方法是否符合質量控制計劃時，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，如每批或每 15 個樣品均應進行一組系統對照，以較少者為準。

5.1 使用系統對照

檢測 DNA 的系統對照表列如下，箭號(↓)表示相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	隨機樣品重複對照 ³	PCR 陰性對照 ⁴	循環測序陰性對照 ⁴	循環測序陽性對照 ⁵
DNA 提取	↓	↓	↓			
利用 PCR 擴增 DNA 條形碼	↓	↓	↓	↓		
DNA 測序		↓	↓		↓	↓

1. 每批 DNA 提取應包括最少 1 個提取空白對照(最好 2 個)。此對照的試管應時刻放在該批次的最後位置。
2. 提取陽性對照是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。每批 DNA 提取應包括最少 1 個提取陽性對照(最好 2 個)。此對照可測試所用試劑及提取規程的效用。

3. 每批 DNA 提取應包括最少 1 個隨機樣品重複對照。檢測方法的整個分析程序都應該包括此對照，而且所得結果應該一致。
4. PCR 陰性對照和循環測序陰性對照分別證明 PCR 試劑和循環測序試劑並無受到核酸污染。每批 PCR 擴增或循環測序反應均應加入陰性對照，對照數量以 2 個為佳。
5. 每批循環測序反應應包括循環測序陽性對照，通常為循環測序試劑盒內的 pGEM™-3Zf(+)雙鏈 DNA 對照模板，而對照數量以 2 個為佳。此對照證明循環測序反應和電泳分離能準確辨別目標擴增子鹼基對的排列。

5.2 所須達到的參數要求：

	參數	可接受標準
A	提取空白對照	PCR 分析中所有目標擴增子的結果均為陰性
B	提取陽性對照	<ul style="list-style-type: none"> ● 整個分析過程由 DNA 提取、PCR 擴增至 DNA 測序，所有目標擴增子的結果均為陽性 ● PCR 系統可檢測出預期大小的擴增子條帶 ● 在 DNA 序列分析中，數據與參考 DNA 序列的相似度達 98%或以上
C	隨機樣品重複對照	整個分析過程的 DNA 檢測結果一致
D	PCR 陰性對照(即不加入 DNA 模板的 PCR 預混液或 DNA 測序預混液)	電泳分析結果為陰性
E	測序陽性照(即 pGEM® - 3Zf(+))對照模板或同等對照模板)	測序數據為陽性

6. 參考資料

國家藥典委員會. 9107 中藥材 DNA 條形碼分子鑒定法指導原則. 中華人民共和國藥典：四部(2015). 北京：中國醫藥科技出版社

PCR Amplification for Plants and Fungi (n.d.). CCDB protocols.
http://ccdb.ca/site/wp-content/uploads/2016/09/CCDB_Amplification-Plants.pdf

Primer Sets for Plants and Fungi. (n.d.). CCDB protocols.
http://ccdb.ca/site/wp-content/uploads/2016/09/CCDB_PrimerSets-Plants.pdf

Watanabe T; Akiyama, H; Maleki S; Yamakawa H; Iijima K; Yamazaki F; Matsumoto T; Futo, S; Arakawa, F. ; Watai, M. and Maitani, T. (2006).

A specific qualitative detection method for peanut (*Arachis hypogaea*) in foods using polymerase chain reaction *Journal of Food Biochemistry*, 30, pp. 215-233.

附件 A (規範標準)

DNA 提取方法

本檢測規程經政府中藥檢測中心的內部驗證，用於產生植物類中藥材的 DNA 條形碼。如本附件所訂方法的程序有任何修改，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。

A1 利用自動化液體處理工作台以磁珠法製備 PCR 質量的 DNA

A1.1 盛載樣品粉末的研磨管或微型管打開前，應先進行短時間的瞬時離心。

A1.2 在每個樣品及對照中加入 960 微升的 ATL 緩衝液、40 微升蛋白酶 K 和 25 微升 α -澱粉酶，渦流振蕩至漿液狀。

註：應確保裂解混合物中的組織微粒可自由流動，避免沉積在試管底部，並按需要添加緩衝液。

A1.3 把管置於恆溫混勻儀或迴轉式恆溫培養箱內，溫度設定為 56°C，以每分鐘 2,000 轉的轉速培養至少 3 小時或過夜。

A1.4 樣品經培養後，在最高速下離心 15 分鐘，沉澱細胞碎片。若呈鬆散狀，則須延長離心時間。

A1.5 小心地把上清液轉移至與自動化液體處理工作台相容的 2 毫升微型管中，應轉移最少 600 微升的樣品裂解物。

A1.6 參考 CW_500_ADV_HE_V8 所列標準方法，選擇適用於樣品體積為 500 微升和 DNA 回收量為 80 微升的提取方法。

A1.7 所提取的 DNA 可用於後續的 PCR 擴增，或冷藏於 -20°C 長期保存。

A2 利用離心柱法提取達 PCR 質量的 DNA

- A2.1 盛載樣品粉末的研磨管或微型管打開前，應先進行短暫的瞬時離心。
- A2.2 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。
- A2.3 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。
- A2.4 關上管蓋，然後渦漩振蕩混勻樣品。

註：應確保裂解混合物中的組織微粒可自由流動，避免在管底沉積，並可按需要加入額外份量的緩衝液。

- A2.5 如認為適當，把微型管或研磨管放在組織研磨儀的適配器，振動頻率設定為 28 赫茲，為時 30 秒，然後拆開適配器並轉動 180°，再以 28 赫茲振動 30 秒。
- A2.6 培養前，用手搖勻每個樣品。
- A2.7 把樣品置於恆溫混勻儀，以 56°C 培養 30 分鐘，再以 65°C 培養 1 小時。
- A2.8 樣品經培養後，在最高速下離心 1 分鐘，將細胞碎片沉澱。若呈鬆散狀，則須延長離心時間。
- A2.9 把 350 微升的裂解物轉移至一個潔淨的 1.5 毫升微型管，然後在每個樣品加入 350 微升的提取結合緩衝液(EBB)。

註：若提取結合緩衝液再結晶，應以 56°C 預熱提取結合緩衝液溶解結晶，再在混勻後使用。若樣品的 DNA 產量低，有需要時可增加溶解產物的體積，但提取結合緩衝液也應按比例增加。

- A2.10 充分混合微型管中的溶解產物和提取結合緩衝液。
- A2.11 把離心柱放在收集管上，然後把微型管內所有混合液轉移至離心柱。
- A2.12 離心柱以 5,000 至 6,000 x g 離心 2 分鐘，讓 DNA 吸附到離心柱膜。完成後，將離心柱置於新的收集管上。
- A2.13 第一次清洗步驟：把 180 微升提取漂洗液(EWB)加進離心柱，以 5,000 至 6,000 x g 離心 2 分鐘。
- A2.14 第二次清洗步驟：把 600 微升提取漂洗液加進離心柱，以 5,000 至 6,000 x g 離心 4 分鐘，將離心柱置於新的收集管上，並重覆清洗步驟一次。
- 註：**樣品如含大量色素，或於第 A2.9 段所述步驟加入了額外的溶解產物，

或須再次進行清洗步驟。

- A2.15 完成後，將離心柱置於新的收集管上，並以最高速離心 4 分鐘，把離心柱膜轉乾。
- A2.16 將離心柱置於新的 1.5 毫升微型管，打開離心柱蓋，以 56°C 培養 30 分鐘，去除離心柱膜殘留的乙醇。
- A2.17 把已預熱的 80 微升純水直接加在離心柱膜上，在室溫培養 1 分鐘。
註：如要增加 DNA 的濃度，可加入較建議體積小的純水，但 DNA 產量會有所下降。
- A2.18 在最高速下離心 4 分鐘，洗脫 DNA。
- A2.19 DNA 提取物可進行歸一化及 PCR，或冷藏於 -20°C 下保存。

附件 B (規範標準)

檢測方法的引物對及 PCR 條件

B1. 引物資料

寡核苷酸引物詳見下表。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 DNA 條形碼分析。

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)	目標擴增子
CP03F	正向	5' – CGG ACG AGA ATA AAG ATA GAG T – 3'	約 123	植物葉綠體 DNA
CP03R	反向	5' – TTT TGG GGA TAG AGG GAC TTG A – 3'		
ITS2F	正向	5' – ATG CGA TAC TTG GTG TGA AT – 3'	約 500	植物核糖體 DNA 第二內部轉錄間 隔區(ITS2)
ITS3R	反向	5' – GAC GCT TCT CCA GAC TAC AAT – 3'		
psbAF	正向	5' – GTT ATG CAT GAA CGT AAT GCT C – 3'	約 500	植物葉綠體 <i>psbA-trnH</i> 基因間隔區 (<i>psbA-trnH</i>)
trnHR	反向	5' – CGC GCA TGG TGG ATT CAC AAT CC – 3'		
rbcLaF	正向	5' – ATG TCA CCA CAA ACA GAG ACT AAA GC – 3'	約 600	植物葉綠體二磷酸 核酮糖羧化酶大鏈 (<i>rbcL</i>)
rbcLaR	反向	5' – GTA AAA TCA AGT CCA CCR CG – 3'		

B2. 引物對的 PCR 條件

PCR 組分 ¹	CP03F/CP03R	ITS2F/ITS3R	psbAF/trnHR	rbcLaF/rbcLaR
模板 DNA ²	約 20 奈克	約 30 奈克	約 30 奈克	約 30 奈克
10X 高保真 PCR 緩衝液 (不含鎂離子)	1 X	1 X	1 X	1 X
硫酸鎂	1.5 毫摩爾每升	2.0 毫摩爾每升	2.0 毫摩爾每升	2.5 毫摩爾每升
海藻糖	-	-	-	5%
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	0.05 毫摩爾每升 @ dNTP
正向引物	0.2 微摩爾每升	0.1 微摩爾每升	0.1 微摩爾每升	0.1 微摩爾每升
反向引物	0.2 微摩爾每升	0.1 微摩爾每升	0.1 微摩爾每升	0.1 微摩爾每升
高保真 <i>Taq</i> DNA 聚合酶	每反應 0.625 U	每反應 1.0 U	每反應 1.0 U	每反應 0.6 U
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	加至最終體積為 25 微升

1. 列出每種引物組合的 PCR 組分的最終濃度。
2. 在大多數情況下，建議的模板 DNA 投入量足以取得良好的 PCR 結果，用於後續的 DNA 測序。PCR 擴增若受抑制或干擾，DNA 的投入量須因應樣品性質而定。

B3. 擴增目標擴增子的 PCR 循環條件**A. 植物類品質控制引物對 CP03F/CP03R**

溫度	時間	循環次數
95°C	10 分鐘	1
94°C 55°C 72°C	30 秒 30 秒 30 秒	40
72°C	7 分鐘	1
4°C	∞	-

B. 葉綠體二磷酸核酮糖羧化酶大鏈(*rbcL*)的通用引物 rbcLaF/rbcLaR

溫度	時間	循環次數
94°C	4 分鐘	1
94°C 55°C 72°C	30 秒 30 秒 1 分鐘	35
72°C	10 分鐘	1
4°C	∞	-

C. 核糖體 DNA 第二內部轉錄間隔區(ITS2)的通用引物 ITS2F/ITS3R

溫度	時間	循環次數
94°C	5 分鐘	1
94°C 56°C 72°C	30 秒 30 秒 45 秒	40
72°C	10 分鐘	1
4°C	∞	-

D. 葉綠體 *psbA-trnH* 基因間隔區(*psbA-trnH*)的通用引物 psbAF/trnHR

溫度	時間	循環次數
94°C	5 分鐘	1
94°C 56°C 72°C	1 分鐘 1 分鐘 1.5 分鐘	30
72°C	7 分鐘	1
4°C	∞	-