



**GCMTI RD-5:2020**

## 政府中药检测中心方法



植物类中药材的 **DNA** 条形码检测方法

## 植物类中药材的 DNA 条形码检测方法

**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，如戴上护眼及护手用具，并在需要在抽气柜或生物安全柜进行检测工作。

### 1. 简介

为具系统分类意义的 DNA 标记进行 DNA 序列分析，是鉴别生物材料的一种有效方法，当中称为 DNA 条形码的 DNA 标准短序列，在国际上获广泛认可用于鉴别物种。

本检测方法阐释如何利用通用引物对为植物类中药材产生 DNA 条形码。藉选择中药材合适的 DNA 标记，便可与已知生物的参考 DNA 序列比对来确认其分类地位，或将之从特定类别的生物组群区分。

附件 A、附件 B 和《补充资料》载列有关检测规程，以供进行检测时参考。本检测方法适用于未经处理或经适度处理的中草药，单一物种的原药材或药材粉末均可。

本检测方法的分析过程分为以下步骤：(1)样品制备；(2) DNA 提取及其质量评估；(3) 聚合酶链式反应(PCR)及其检查与纯化；(4) DNA 测序（桑格法）；以及(5) 测序后分析。

本检测方法载述手动和自动检测流程，前者投资成本相对较低，后者使用自动化的工具协助进行提取 DNA、DNA 浓度归一、PCR 程序及电泳等常规步骤，尽量减少人手操作，以应对中至高检测通量要求。

### 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。所用的水应经过双重蒸馏或为 PCR 等级，并且不含核酸酶及核酸。在可行的情况下，有关化学品、试剂及水在使用前均应先进行高压灭菌。操作人员进行任何程序时须戴上无粉手套，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，整个分析过程中的主要设备列如下：

**3.1 层流柜：**在工作区提供经高效能空气微粒子(HEPA)过滤的单向空气，

以防样品受污染。

- 3.2 温控培养箱：为提取核酸提供实验条件。
- 3.3 分光光度计：用以评估双链 DNA 的纯度及产量。
- 3.4 PCR 热循环仪：用于 PCR 中扩增 DNA。
- 3.5 电泳系统：检查扩增的 PCR 产物。
- 3.6 自动化液体处理工作台
- 3.7 自动毛细管电泳系统：用以进行 DNA 测序，解读 DNA 条形码的序列。

## 4. 一般程序

附件 A 和《补充资料》所述的检测规程仅供参考，实际程序应根据操作人员的经验，再结合测试范围和样品性质，才决定使用的方法及其适用性。操作人员宜参考相关的国际 / 国家标准(如适用)。为了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进行检测，以检查分析纯试剂或样品之间的 DNA 有否受到污染。

### 4.1 样品制备

负责制备样品(如粒度减少、均质化和取样)的操作人员应具有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，而商业 DNA 分离试剂盒或实验室配制的试剂均可用以提取 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管控及保证，可更为容易管控提取过程的质量，亦可节省自行提取 DNA 所需排解问题的时间。检测人员如使用其他试剂盒，或对附件 A 的 A1 或 A2 所载程序作出任何修改，均应加以充分验证，并有责任评估有关修改是否适用于测试项目。

4.2.2 应根据药材的化学或细胞成分，选择合适 DNA 提取规程。为取得足够质量达后续的 PCR 扩增要求的 DNA 提取物，在情况适用下，应除去药材中下列成分：

4.2.2.1 多糖部分可以使用合适的酶进行酶解处理后去除，例如果胶、纤维素、半纤维素及淀粉等多糖，可以使用果胶酶、纤维素酶、 $\alpha$ -淀粉酶；

- 4.2.2.2 核糖核酸及 / 或蛋白质，可分别使用核糖核酸酶及蛋白酶进行酶解反应后去除；
- 4.2.2.3 脂质部分，可进行酶解反应或使用溶剂提取法(如正己烷)来去除；
- 4.2.2.4 色素如酚类化合物、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。

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 PCR 扩增 DNA 条形码

4.3.1 本检测方法有 3 个陆生植物的 DNA 条形码可供选择，包括核糖体 DNA 第二内部转录间隔区(ITS2)、叶绿体 *psbA-trnH* 基因间隔区 (*psbA-trnH*)和叶绿体二磷酸核酮糖羧化酶大链(*rbcL*)。本方法所选 DNA 条形码的位置如下：

DNA 条形码	DNA 条形码的位置
ITS2	ITS2 位于 5.8S 与 28S 核糖体核糖核酸之间。
<i>psbA-trnH</i>	<i>psbA-trnH</i> 基因间区位于叶绿体光系统 II 蛋白 D1 ( <i>psbA</i> )基因与组氨酸运转核糖核酸 ( <i>trnH</i> )基因之间。
<i>rbcL</i>	位于拟南芥( <i>Arabidopsis thaliana</i> )叶绿体基因组(NCBI 登记号 NC_000932)二磷酸核酮糖羧化酶大链的 5 端方向第 1 至 599 个碱基对(排除引物区后则位于第 27 至 579 个碱基对)。

4.3.2 总而言之，扩增 DNA 条形码、检查及纯化 PCR 产物的程序如下：

- 4.3.2.1 选择 DNA 条形码，然后进行 PCR 扩增。建议的陆生植物引物和 PCR 扩增条件载于附件 B。
- 4.3.2.2 使用电泳方法检查 PCR 产物，然后纯化产物，以进行后续的 DNA 测序。

### 4.4 DNA 测序

4.4.1 对已纯化的 PCR 产物进行循环测序反应。

4.4.2 纯化循环测序反应的产物。

4.4.3 利用 DNA 测序仪取得 DNA 条形码的 DNA 序列。

#### 4.5 测序后分析

4.5.1 使用适合的序列编辑软件，检查双向序列的质量。

4.5.1.1 除去低质量信号和引物区，以进行序列拼接；

4.5.1.2 将正向和反向序列拼接成 FASTA 格式的一致序列；

4.5.1.3 其中一个测序方向中的任何核苷酸(“N”)，可用另一测序方向的相同位置而高质量的碱基来互补，并继续识别另一序列同方向的高质量碱基，以替代低质量的碱基。

### 5. 质量控制参数

检测人员应检查每次分析结果是否符合质量控制的接受准则，判断分析结果可否接受，以及是否符合分析方法的的目的。考虑方法是否符合质量控制计划时，检测人员应按操作人员进行 DNA 分析的合理处理能力，决定每批样品的数量，如每批或每 15 个样品均应进行一组系统对照，以较少者为准。

#### 5.1 使用系统对照

检测 DNA 的系统对照表列如下，箭号(↓)表示相关分析步骤所应进行的对照。

分析步骤	提取空白对照 <sup>1</sup>	提取阳性对照 <sup>2</sup>	随机样品重复对照 <sup>3</sup>	PCR 阴性对照 <sup>4</sup>	循环测序阴性对照 <sup>4</sup>	循环测序阳性对照 <sup>5</sup>
DNA 提取	↓	↓	↓			
利用 PCR 扩增 DNA 条形码	↓	↓	↓	↓		
DNA 测序		↓	↓		↓	↓

1. 每批 DNA 提取应包括最少 1 个提取空白对照(最好 2 个)。此对照的试管应时刻放在该批次的最后位置。
2. 提取阳性对照是已知分类鉴定的参考材料，或是经过公认的博物馆、国家主管部门、大学或研究机构等鉴别或核证其分类地位的生物。每批 DNA 提取应包括最少 1 个

提取阳性对照(最好 2 个)。此对照可测试所用试剂及提取规程的效用。

3. 每批 DNA 提取应包括最少 1 个随机样品重复对照。检测方法的整个分析程序都应该包括此对照，而且所得结果应该一致。
4. PCR 阴性对照和循环测序阴性对照分别证明 PCR 试剂和循环测序试剂并无受到核酸污染。每批 PCR 扩增或循环测序反应均应加入阴性对照，对照数量以 2 个为佳。
5. 每批循环测序反应应包括循环测序阳性对照，通常为循环测序试剂盒内的 pGEM™-3Zf(+)双链 DNA 对照模板，而对照数量以 2 个为佳。此对照证明循环测序反应和电泳分离能准确辨别目标扩增子碱基对的排列。

## 5.2 所须达到的参数要求：

	参数	可接受标准
A	提取空白对照	PCR 分析中所有目标扩增子的结果均为阴性
B	提取阳性对照	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 整个分析过程由 DNA 提取、PCR 扩增至 DNA 测序，所有目标扩增子的结果均为阳性</li> <li>● PCR 系统可检测出预期大小的扩增子条带</li> <li>● 在 DNA 序列分析中，数据与参考 DNA 序列的相似度达 98%或以上</li> </ul>
C	随机样品重复对照	整个分析过程的 DNA 检测结果一致
D	PCR 阴性对照(即不加入 DNA 模板的 PCR 预混液或 DNA 测序预混液)	电泳分析结果为阴性
E	测序阳性对照(即 pGEM® - 3Zf(+))对照模板或同等对照模板)	测序数据为阳性

## 6. 参考资料

国家药典委员会. 9107 中药材 DNA 条形码分子鉴定法指导原则. 中华人民共和国药典：四部(2015). 北京：中国医药科技出版社

PCR Amplification for Plants and Fungi (n.d.). CCDB protocols.  
[http://ccdb.ca/site/wp-content/uploads/2016/09/CCDB\\_Amplification-Plants.pdf](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](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 (规范标准)

### DNA 提取方法

本检测规程经政府中药检测中心的内部验证，用于产生植物类中药材的 DNA 条形码。如本附件所订方法的程序有任何修改，检测人员应加以充分验证，并有责任评估有关修改是否适用于测试项目。

#### A1 利用自动化液体处理工作台以磁珠法制备 PCR 质量的 DNA

A1.1 盛载样品粉末的研磨管或微型管打开前，应先进行短时间的瞬时离心。

A1.2 在每个样品及对照中加入 960 微升的 ATL 缓冲液、40 微升蛋白酶 K 和 25 微升  $\alpha$ -淀粉酶，涡漩振荡至浆液状。

**注：**应确保裂解混合物中的组织微粒可自由流动，避免沉积在试管底部，并按需要添加缓冲液。

A1.3 把管置于恒温混匀仪或回转式恒温培养箱内，温度设定为 56°C，以每分钟 2,000 转的转速培养至少 3 小时或过夜。

A1.4 样品经培养后，在最高速下离心 15 分钟，沉淀细胞碎片。若呈松散状，则须延长离心时间。

A1.5 小心地把上清液转移至与自动化液体处理工作台兼容的 2 毫升微型管中，应转移最少 600 微升的样品裂解物。

A1.6 参考 CW\_500\_ADV\_HE\_V8 所列标准方法，选择适用于样品体积为 500 微升和 DNA 回收量为 80 微升的提取方法。

A1.7 所提取的 DNA 可用于后续的 PCR 扩增，或冷藏于 -20°C 长期保存。

## A2 利用离心柱法提取达 PCR 质量的 DNA

A2.1 盛载样品粉末的研磨管或微型管打开前，应先进行短暂的瞬时离心。

A2.2 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，配制成蛋白酶 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。

A2.3 把 1 毫升的蛋白酶 K-裂解缓冲液、25 微升的  $\alpha$ -淀粉酶和 5 微升的核糖核酸酶 A 放进研磨管或微型管。

A2.4 关上管盖，然后涡漩振荡混匀样品。

**注：**应确保裂解混合物中的组织微粒可自由流动，避免在管底沉积，并可按需要加入额外份量的缓冲液。

A2.5 如认为适当，把微型管或研磨管放在组织研磨仪的适配器，振动频率设定为 28 赫兹，为时 30 秒，然后拆开适配器并转动 180°，再以 28 赫兹振动 30 秒。

A2.6 培养前，用手摇匀每个样品。

A2.7 把样品置于恒温混匀仪，以 56°C 培养 30 分钟，再以 65°C 培养 1 小时。

A2.8 样品经培养后，在最高速下离心 1 分钟，将细胞碎片沉淀。若呈松散状，则须延长离心时间。

A2.9 把 350 微升的裂解物转移至一个洁净的 1.5 毫升微型管，然后在每个样品加入 350 微升的提取结合缓冲液(EBB)。

**注：**若提取结合缓冲液再结晶，应以 56°C 预热提取结合缓冲液溶解结晶，再在混匀后使用。若样品的 DNA 产量低，有需要时可增加溶解产物的体积，但提取结合缓冲液也应按比例增加。

A2.10 充分混合微型管中的溶解产物和提取结合缓冲液。

A2.11 把离心柱放在收集管上，然后把微型管内所有混合液转移至离心柱。

A2.12 离心柱以 5,000 至 6,000 x g 离心 2 分钟，让 DNA 吸附到离心柱膜。完成后，将离心柱置于新的收集管上。

A2.13 第一次清洗步骤：把 180 微升提取漂洗液(EWB)加进离心柱，以 5,000 至 6,000 x g 离心 2 分钟。

A2.14 第二次清洗步骤：把 600 微升提取漂洗液加进离心柱，以 5,000 至 6,000 x g 离心 4 分钟，将离置于新的收集管上，并重复清洗步骤一次。

**注：**样品如含大量色素，或于第 A2.9 段所述步骤加入了额外的溶解产物，

或须再次进行清洗步骤。

A2.15 完成后，将离心柱置于新的收集管上，并以最高速离心 4 分钟，把离心柱膜转干。

A2.16 将离心柱置于新的 1.5 毫升微型管，打开离心柱盖，以 56°C 培养 30 分钟，去除离心柱膜残留的乙醇。

A2.17 把已预热的 80 微升纯水直接加在离心柱膜上，在室温培养 1 分钟。

**注：**如要增加 DNA 的浓度，可加入较建议体积小的纯水，但 DNA 产量会有所下降。

A2.18 在最高速下离心 4 分钟，洗脱 DNA。

A2.19 DNA 提取物可进行归一化及 PCR，或冷藏于 -20°C 下保存。

## 附件 B

(规范标准)

### 检测方法的引物对及 PCR 条件

#### B1. 引物资料

寡核苷酸引物详见下表。引物可从专门合成寡核苷酸的供应商订购，标准规格的脱盐纯化引物，已可用于 DNA 条形码分析。

引物名称	引物方向	寡核苷酸 DNA 序列 (5'-3')	扩增子长度(碱基对)	目标扩增子
CP03F	正向	5' - CGG ACG AGA ATA AAG ATA GAG T - 3'	约 123	植物叶绿体 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'	约 500	植物核糖体 DNA 第二内部转录间隔区(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'	约 500	植物叶绿体 <i>psbA-trnH</i> 基因间隔区( <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'	约 600	植物叶绿体二磷酸 核酮糖羧化酶大链( <i>rbcL</i> )
rbcLaR	反向	5' - GTA AAA TCA AGT CCA CCR CG - 3'		

**B2. 引物对的 PCR 条件**

PCR 组分 <sup>1</sup>	CP03F/CP03R	ITS2F/ITS3R	psbAF/trnHR	rbcLaF/rbcLaR
模板 DNA <sup>2</sup>	约 20 奈克	约 30 奈克	约 30 奈克	约 30 奈克
10X 高保真 PCR 缓冲液 (不含镁离子)	1 X	1 X	1 X	1 X
硫酸镁	1.5 毫摩尔每升	2.0 毫摩尔每升	2.0 毫摩尔每升	2.5 毫摩尔每升
海藻糖	-	-	-	5%
脱氧核糖核苷三磷酸 (dNTP)	0.2 毫摩尔每升 @ dNTP	0.2 毫摩尔每升 @ dNTP	0.2 毫摩尔每升 @ dNTP	0.05 毫摩尔每升 @ dNTP
正向引物	0.2 微摩尔每升	0.1 微摩尔每升	0.1 微摩尔每升	0.1 微摩尔每升
反向引物	0.2 微摩尔每升	0.1 微摩尔每升	0.1 微摩尔每升	0.1 微摩尔每升
高保真 <i>Taq</i> DNA 聚合酶	每反应 0.625 U	每反应 1.0 U	每反应 1.0 U	每反应 0.6 U
无核酸酶水	加至最终体积为 25 微升	加至最终体积为 25 微升	加至最终体积为 25 微升	加至最终体积为 25 微升

1. 列出每种引物组合的 PCR 组分的最终浓度。
2. 在大多数情况下，建议的模板 DNA 投入量足以取得良好的 PCR 结果，用于后续的 DNA 测序。PCR 扩增若受抑制或干扰，DNA 的投入量须因应样品性质而定。

**B3. 扩增目标扩增子的 PCR 循环条件****A. 植物类质量控制引物对 CP03F/CP03R**

温度	时间	循环次数
95°C	10 分钟	1
94°C 55°C 72°C	30 秒 30 秒 30 秒	40
72°C	7 分钟	1
4°C	∞	-

**B. 叶绿体二磷酸核酮糖羧化酶大链(*rbcL*)的通用引物 *rbcLaF/rbcLaR***

温度	时间	循环次数
94°C	4 分钟	1
94°C 55°C 72°C	30 秒 30 秒 1 分钟	35
72°C	10 分钟	1
4°C	∞	-

**C. 核糖体 DNA 第二内部转录间隔区(ITS2)的通用引物 ITS2F/ITS3R**

温度	时间	循环次数
94°C	5 分钟	1
94°C 56°C 72°C	30 秒 30 秒 45 秒	40
72°C	10 分钟	1
4°C	∞	-

**D. 叶绿体 *psbA-trnH* 基因间隔区(*psbA-trnH*)的通用引物 *psbAF/trnHR***

温度	时间	循环次数
94°C	5 分钟	1
94°C 56°C 72°C	1 分钟 1 分钟 1.5 分钟	30
72°C	7 分钟	1
4°C	∞	-