



GCMTI RD-6:2020

政府中藥檢測中心方法



動物類中藥材的 DNA 條形碼檢測方法

動物類中藥材的 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動物類中藥材產生 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。

《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。

本檢測方法可讓中至高量 DNA 的處理流程更具彈性，當中包括使用自動化的工具，協助進行提取 DNA、DNA 濃度歸一、PCR 程序、純化及電泳等常規步驟，盡量減少人手操作。

2. 試劑及材料

所有使用的化學品或試劑通常須為分子生物或 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

《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。

《補充資料》所述規程、試劑、材料和設備僅供參考。如對規程有任何修改，包括但不限於使用其他試劑盒或更改程序，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，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。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。

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 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 脂質部分，可進行酶解反應或使用溶劑提取法(如正己烷)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 擴增動物類羣的內源基因。

4.3 利用 PCR 擴增 DNA 條形碼

4.3.1 本檢測方法有 3 個動物類 DNA 條形碼可供選擇，包括線粒體細胞色素 C 氧化酶亞基 I (mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I, COI)、線粒體細胞色素 b (mitochondrial cytochrome b, CYTB)和線粒體 16S 核糖體核糖核酸(16S ribosomal ribonucleic acid, 16SrRNA)。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
COI	位於小家鼠(<i>Mus musculus</i>)線粒體基因組(NCBI 登記號 AP013031)細胞色素 C 氧化酶亞基 I 的 5 端方向第 23 至 731 個鹼基對(排除引物區後則位於第 48 至 705 個鹼基對)。
CYTB	位於小家鼠(<i>Mus musculus</i>)線粒體基因組(NCBI 登記號 AP013031)細胞色素 b 基因的 5 端方向第 398 至 869 個鹼基對(排除引物區後則位於第 423 至 843 個鹼基對)。
16SrRNA	位於小家鼠(<i>Mus musculus</i>)線粒體基因組(NCBI 登記號 AP013031)16S 核糖體核糖核酸基因的 5 端方向第 923 至 1434 個鹼基對(排除引物區後則位於第 951 至 1407 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。建議的動物引物和 PCR 擴增條件載於附件 A。

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 除去低質量信號和引物區，以進行序列拼接；
- 4.5.2 將正向和反向序列拼接成 FASTA 格式的一致序列；
- 4.5.3 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，以及是否符合分析方法的目的。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 參考序列的相似度達 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	測序陽性對照(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

Hedges SB. (1994). Molecular evidence for the origin of birds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, pp. 2621-2624.

Sawyer J; Wood C; Shanahan D; Gout S and McDowell D. (2003). Real-time PCR for quantitative meat species testing. *Food Control*, 14, pp. 579-583.

Verma SK and Singh L. (2003). Novel universal primers establish identity of an enormous number of animal species for forensic application. *Molecular Ecology Notes*, 3, pp. 28-31.

附件 A
(規範標準)

檢測方法的引物對及 PCR 條件

A1. 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
UnivP	正向	GGTTTACGACCTCGATGTTG	約 104	動物線粒體 DNA
UnivQ	反向	CGGGTCTGAACTCAGATCAC		
Invertebrate COI-F	正向	GGTCAACAAATCATAAAGAT ATTGG	約 709	動物線粒體細胞色素 C 氧化酶亞基 I (COI)
Invertebrate COI-R	反向	TAAACTTCAGGGTGACCAAA AAATCA		
MCB398	正向	TACCATGAGGACAAATATCAT TCTG	約 472	動物線粒體細胞色素 b (CYTB)
MCB869	反向	CCTCCTAGTTTGTTAGGGATT GATCG		
16L1	正向	CTGACCGTGCAAAGGTAGCG TAATCACT	約 505	動物線粒體 16S 核糖體核糖核酸 (16SrRNA)
16H1	反向	CTCCGGTCTGAACTCAGATC ACGTAGG		

A2. 引物對的 PCR 條件

PCR 組分 ¹	UnivP/UnivQ	InvertebrateCOI-F/ InvertebrateCOI-R	MCB398/ MCB869	16L1/16H1
模板 DNA ²	最少 20 奈克	最少 30 奈克	最少 20 奈克	最少 20 奈克
10X 高保真 度 PCR 緩衝 液(不含鎂離 子)	1 X	1 X	1 X	1 X
硫酸鎂	2.0 毫摩爾每 升	2.0 毫摩爾每升	2.0 毫摩爾每 升	1.5 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	0.1 毫摩爾每 升@dNTP
正向引物	0.4 微摩爾每 升	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	0.4 微摩爾每升	0.2 微摩爾每 升	0.2 微摩爾每升
高保真 <i>Taq</i> DNA 聚合酶	每反應 1.25U	每反應 1.0U	每反應 1.0U	每反應 1.25U
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. 列出每種引物對的 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。

A3. 擴增目標擴增子的 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	30 秒	30
55°C	30 秒	
72°C	1 分鐘	
72°C	7 分鐘	1
4°C	∞	-

B. 線粒體細胞色素 C 氧化酶亞基 I(COI)的通用引物 Invertebrate COI-F/ Invertebrate COI-R

溫度	時間	循環次數
94°C	1 分鐘	1
94°C	1 分鐘	5
45°C	1.5 分鐘	
72°C	1.5 分鐘	
94°C	1 分鐘	35
50°C	1.5 分鐘	
72°C	1 分鐘	
72°C	5 分鐘	1
4°C	∞	-

C. 線粒體細胞色素 b 的通用引物 MCB398/MCB869

溫度	時間	循環次數
95°C	5 分鐘	1
94°C	30 秒	35
52°C	30 秒	
72°C	1 分鐘	
72°C	7 分鐘	1
4°C	∞	-

D. 線粒體 16S 核糖體核糖核酸的通用引物 16L1/16H1

溫度	時間	循環次數
94°C	5 分鐘	1
94°C	45 秒	35
50°C	45 秒	
72°C	1 分鐘	
72°C	5 分鐘	1
4°C	∞	-