



GCMTI RD-6:2020

政府中药检测中心方法



动物类中药材的 DNA 条形码检测方法

动物类中药材的 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动物类中药材产生 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。

《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。

本检测方法可让中至高量 DNA 的处理流程更具弹性，当中包括使用自动化的工具，协助进行提取 DNA、DNA 浓度归一、PCR 程序、纯化及电泳等常规步骤，尽量减少人手操作。

2. 试剂及材料

所有使用的化学品或试剂通常须为分子生物或 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

《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。

《补充资料》所述规程、试剂、材料和设备仅供参考。如对规程有任何修改，包括但不限于使用其他试剂盒或更改程序，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。

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。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。
- 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 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；
 - 4.2.2.2 脂质部分，可进行酶解反应或使用溶剂提取法(如正己烷)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 扩增动物类群的内源基因。

4.3 利用 PCR 扩增 DNA 条形码

4.3.1 本检测方法有 3 个动物类 DNA 条形码可供选择，包括线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 I (mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I, COI)、线粒体细胞色素 b (mitochondrial cytochrome b, CYTB)和线粒体 16S 核糖体核糖核酸(16S ribosomal ribonucleic acid, 16SrRNA)。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
COI	位于小家鼠(<i>Mus musculus</i>)线粒体基因组(NCBI 登记号 AP013031)细胞色素 C 氧化酶亚基 I 的 5 端方向第 23 至 731 个碱基对(排除引物区后则位于第 48 至 705 个碱基对)。
CYTB	位于小家鼠(<i>Mus musculus</i>)线粒体基因组(NCBI 登记号 AP013031)细胞色素 b 基因的 5 端方向第 398 至 869 个碱基对(排除引物区后则位于第 423 至 843 个碱基对)。
16SrRNA	位于小家鼠(<i>Mus musculus</i>)线粒体基因组(NCBI 登记号 AP013031)16S 核糖体核糖核酸基因的 5 端方向第 923 至 1434 个碱基对(排除引物区后则位于第 951 至 1407 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。建议的动物引物和 PCR 扩增条件载于附件 A。

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 除去低质量信号和引物区，以进行序列拼接；

4.5.2 将正向和反向序列拼接成 FASTA 格式的一致序列；

4.5.3 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 ¹	提取阳性对照 ²	随机样品重复对照 ³	PCR 阴性对照 ⁴	循环测序阴性对照 ⁴	循环测序阳性对照 ⁵
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"> ● 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 ● PCR 系统可检测出预期大小的扩增子条带 ● 在 DNA 序列分析中，数据与参考 DNA 参考序列的相似度达 98%或以上
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

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
(规范标准)

检测方法的引物对及 PCR 条件

A1. 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
UnivP	正向	GGTTTACGACCTCGATGTTG	约 104	动物线粒体 DNA
UnivQ	反向	CGGGTCTGAACTCAGATCAC		
Invertebrate COI-F	正向	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	约 709	动物线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 I (COI)
Invertebrate COI-R	反向	TAAACTTCAGGGTGACCAAA AAATCA		
MCB398	正向	TACCATGAGGACAAATATCAT TCTG	约 472	动物线粒体细胞色素 b (CYTB)
MCB869	反向	CCTCCTAGTTTGTAGGGATT GATCG		
16L1	正向	CTGACCGTGCAAAGGTAGCG TAATCACT	约 505	动物线粒体 16S 核糖体核糖核酸 (16SrRNA)
16H1	反向	CTCCGGTCTGAACTCAGATC ACGTAGG		

A2. 引物对的 PCR 条件

PCR 组分 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 缓冲液(不含镁离子)	1 X	1 X	1 X	1 X
硫酸镁	2.0 毫摩尔每升	2.0 毫摩尔每升	2.0 毫摩尔每升	1.5 毫摩尔每升
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	0.1 毫摩尔每升@dNTP
正向引物	0.4 微摩尔每升	0.4 微摩尔每升	0.2 微摩尔每升	0.2 微摩尔每升
反向引物	0.4 微摩尔每升	0.4 微摩尔每升	0.2 微摩尔每升	0.2 微摩尔每升
高保真 <i>Taq</i> DNA 聚合酶	每反应 1.25U	每反应 1.0U	每反应 1.0U	每反应 1.25U
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. 列出每种引物对的 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。

A3. 扩增目标扩增子的 PCR 循环条件**A. 动物类质量控制引物对 UnivP / UnivQ**

温度	时间	循环次数
95°C	5 分钟	1
94°C	30 秒	30
55°C	30 秒	
72°C	1 分钟	
72°C	7 分钟	1
4°C	∞	-

B. 线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 I(COI)的通用引物 Invertebrate COI-F / Invertebrate COI-R

温度	时间	循环次数
94°C	1 分钟	1
94°C	1 分钟	5
45°C	1.5 分钟	
72°C	1.5 分钟	
94°C	1 分钟	35
50°C	1.5 分钟	
72°C	1 分钟	
72°C	5 分钟	1
4°C	∞	-

C. 线粒体细胞色素 b 的通用引物 MCB398 / MCB869

温度	时间	循环次数
95°C	5 分钟	1
94°C	30 秒	35
52°C	30 秒	
72°C	1 分钟	
72°C	7 分钟	1
4°C	∞	-

D. 线粒体 16S 核糖体核糖核酸的通用引物 16L1 / 16H1

温度	时间	循环次数
94°C	5 分钟	1
94°C	45 秒	35
50°C	45 秒	
72°C	1 分钟	
72°C	5 分钟	1
4°C	∞	-