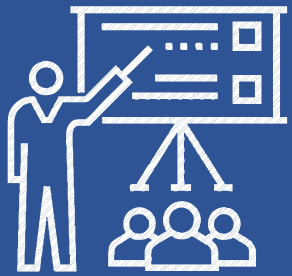
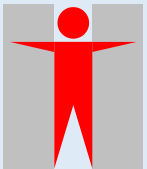


Chinese Medicine Regulatory Office Department of Health 衛生署中醫藥規管辦公室



Analysis of Cornu Cervi Pantotrichum by DNA method as
a complementary approach

以DNA技術作為鑒別鹿茸的互補檢測方法



內容

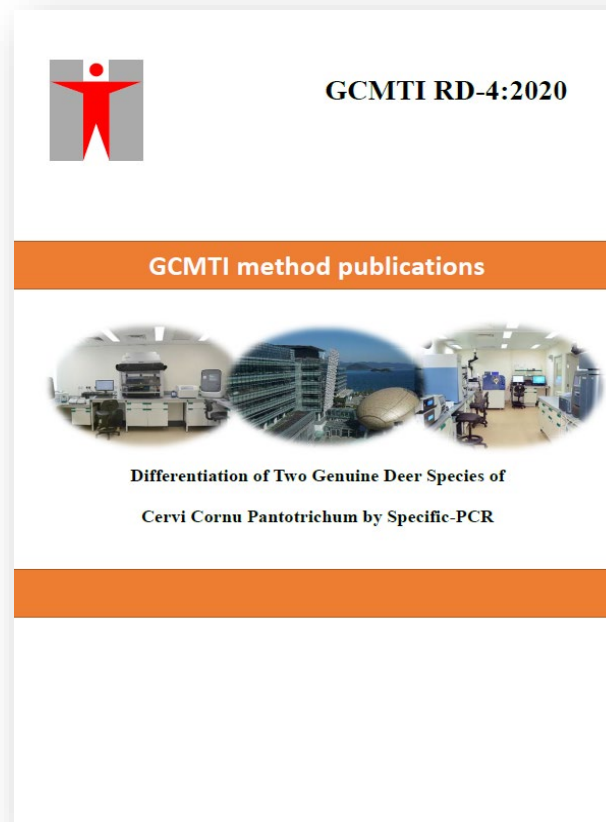
背景

原理

方法介紹

操作建議

Q & A



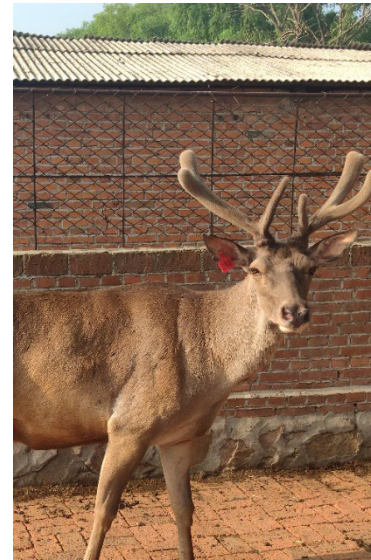
背景

鹿茸來源

- 根據《中國藥典》2020年版，鹿茸是鹿科梅花鹿和馬鹿雄鹿未骨化密生茸毛的幼角



梅花鹿
Cervus nippon Temminck



馬鹿
Cervus elaphus Linnaeus



背景

現有鹿茸鑒別方法

- 性狀；
- 化學方法



背景

DNA鑒別技術特點

- 分辨能力強；
- 基源品質管理；
- 多來源品種的中藥材；
- 品種混雜，不易區分；
- 無獨特化學成分標記

DNA鑒別技術短處

- 無法作中藥材的品質評估；
- 相對其他鑒別方法，操作較複雜

➔ 以DNA技術互補現有的中藥材鑒別方法



背景

政府中藥檢測中心 (GCMTI)

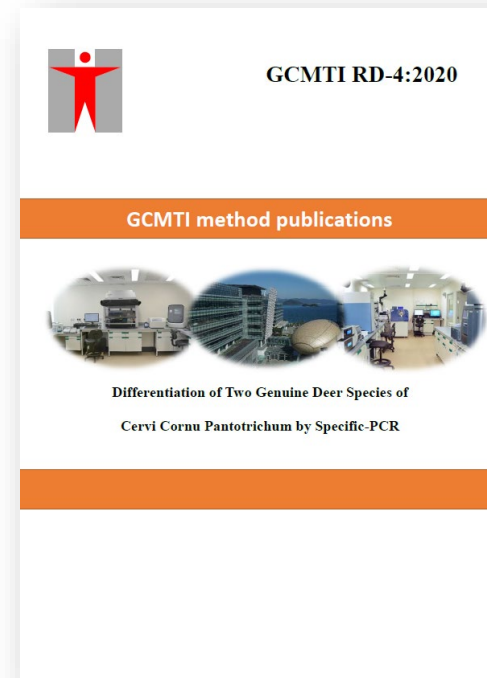
- 開展 “以DNA技術作為鑒別鹿茸的互補檢測方法” 研究計劃
- 計劃分成2部份
 - 第1部分，我們建立及確認一種採用特異性-聚合酶鏈式反應技術，區分鹿茸飲片正品品種梅花鹿(*Cervus nippon* Temminck)和馬鹿(*Cervus elaphus* Linnaeus)的篩選方法
 - 第2部份，我們根據香港實驗所認可計劃的要求進行方法學考察，建立及確認動物類藥材的DNA條形碼檢測法及品質控制系統



背景

計劃所開發的方法

- ➔ ✓ Differentiation of Two Genuine Deer Species of Cervi Cornu Pantotrichum by Specific-PCR (GCMTI RD-4:2020)
- ✓ Generating DNA Barcodes for Animal-derived Chinese Materia Medica (CMM) (GCMTI RD-6:2020)



GCMTI RD-4:2020



GCMTI RD-6:2020



- ▶ 主頁
- ▶ 重要資訊
- ▶ 關於我們
- ▶ 政府中藥檢測中心
- ▶ 世衛傳統醫藥合作中心
- ▶ 中成藥生產質量管理規範
網上資源
- ▶ 健康資訊及活動
- ▶ 相關網頁
- ▶ 聯絡我們



政府中藥檢測中心

測試方法

免責聲明

- **預防措施**

方法可能涉及使用有害物質及危險物品。在處理此類物質時，使用者有責任採取適當的預防措施。使用眼睛和手部保護的裝置，並必要時在通風櫥中進行工作。

- **方法與商業產品**

1) 採用檢測方法時，使用者有責任評估測試方法對其測試對象的適用性。

2) 出現於方法中的任何品牌，供應商和特定產品的名稱，只是反映了它們在方法開發過程中實際的使用情況。對於任何特定產品，沒有任何暗示，認可，證明和偏好去支持某一種品牌。使用者亦可選用其他品牌的同類型產品及自行評估該產品在方法上的表現和效用。

3) 使用者應具備足夠的實驗室知識和技術，了解測試方法涉及使用的危險化學品，查看化學品安全技術說明書，評估測試中可能產生的任何潛在危險，才使用測試方法進行分析。

4) 本方法內的資訊，可供發布或複製作非商業用途，但必須註明有關資訊是由衛生署政府中藥檢測中心提供的。除非事先得到衛生署政府中藥檢測中心的書面授權，否則嚴禁複製、改編、分發、發布或提供本方法內的資訊作商業用途。

目錄

- 外用藥油中中藥材指標成分的分析
- 以DNA技術作為鑒別鹿茸的互補檢測方法 ←
- 植物類藥材DNA條形碼檢測法
- 動物類藥材DNA條形碼檢測法 ←

(測試方法只提供英文版本)

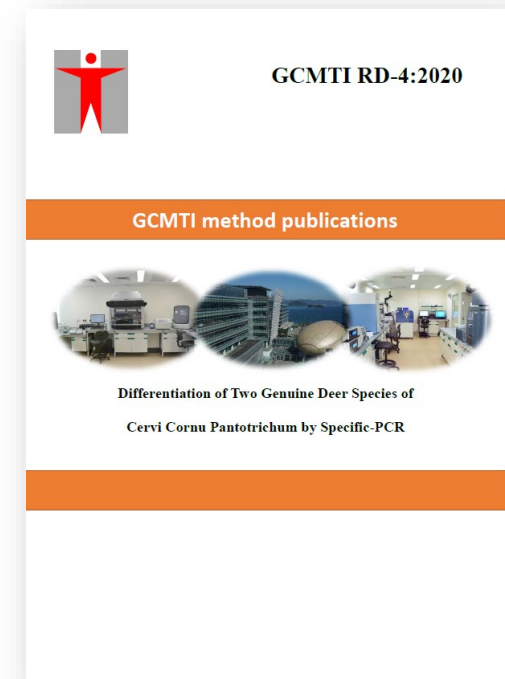
https://www.cmro.gov.hk/html/b5/GCMTI/testing_methods.html



方法簡介

特點

- ✓ 區分鹿茸飲片正品品種梅花鹿和馬鹿的篩選方法；
- ✓ 經驗證的篩選方法；
- ✓ 採用特異性-聚合酶鏈式反應技術；
- ✓ 操作較易無需進行DNA測序；
- ✓ 測試成本較低



GCMTI RD-4:2020



方法原理

中藥材DNA技術

- 中藥材來源自植物、動物、真菌和礦物
 - 除礦物類外，均屬於生物
- 生物含遺傳物質，如DNA；
- 不同生物品種，DNA排列存在差異；
- 透過DNA技術，檢出不同品種間的DNA差異，從而區分出不同的中藥材品種



DNA簡介

DNA

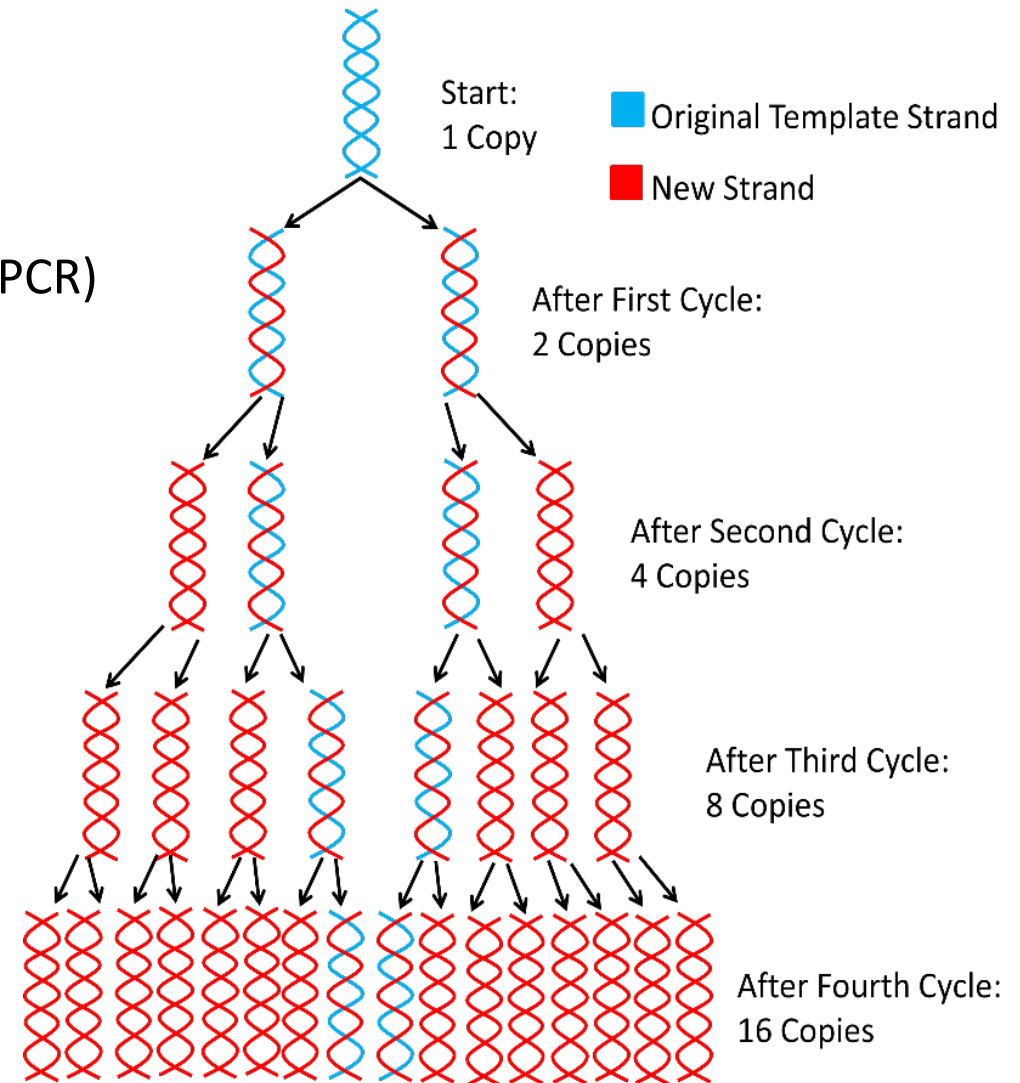
- 遺傳物質，生物的藍圖
- A, T, C, G 四種化合物組成
- A, T, C, G 按不同排列次序出現，稱為DNA序列
- 不同物種、甚至不同個體的DNA序列不相同
- 透過讀出或偵測這些不同的序列，可以對物種作出區分
- 細胞DNA含量低



DNA擴增技術

聚合酶鏈式反應

- 聚合酶鏈式反應 (Polymerase chain reaction, PCR)
- Taq DNA聚合酶
- 引物組合
- 能將特定DNA位置擴增，達至可檢測水平
- 現時DNA檢測方法的核心技術



聚合酶鏈式反應

引物組合

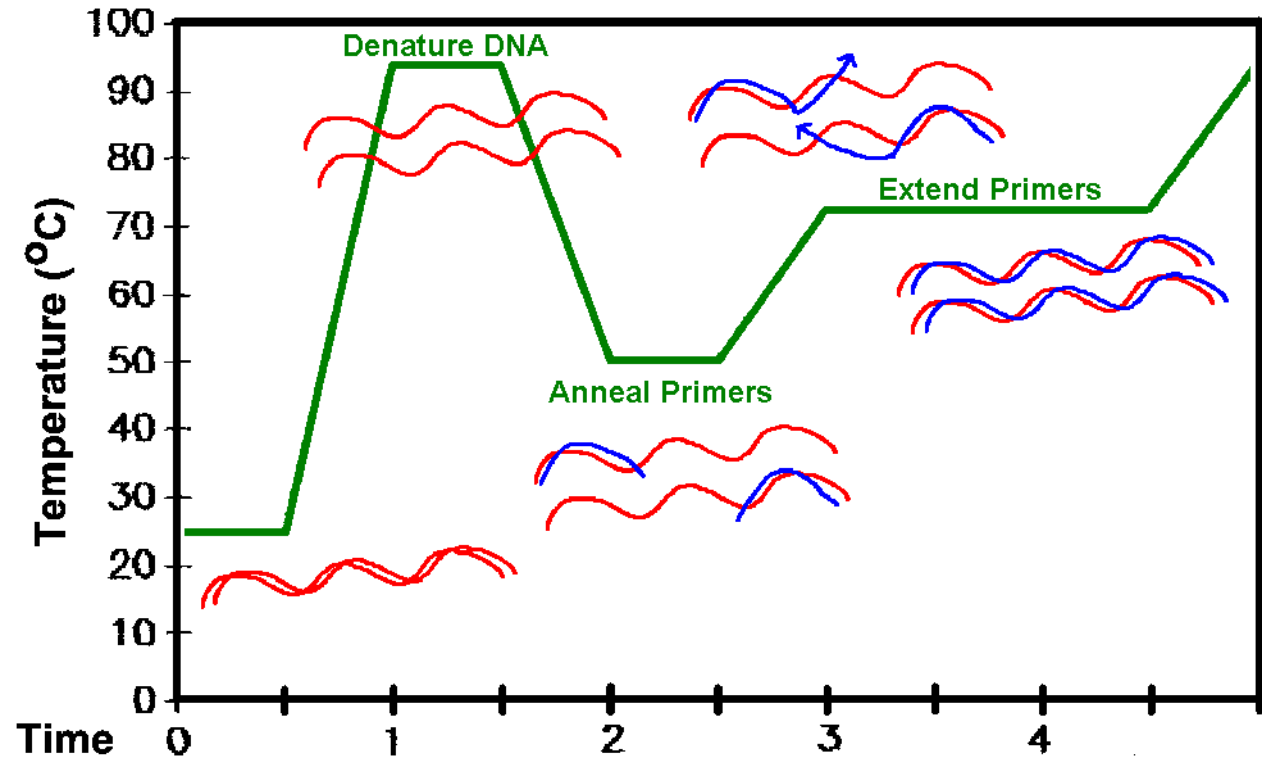
- PCR擴增技術的重要部份
- 一對約18-30個碱基(bp)的寡核苷酸
- 界定DNA擴增範圍
- 引物組合需跟DNA模板可互補(結合)，否則PCR無法進行



聚合酶鏈式反應

溫度升降循環

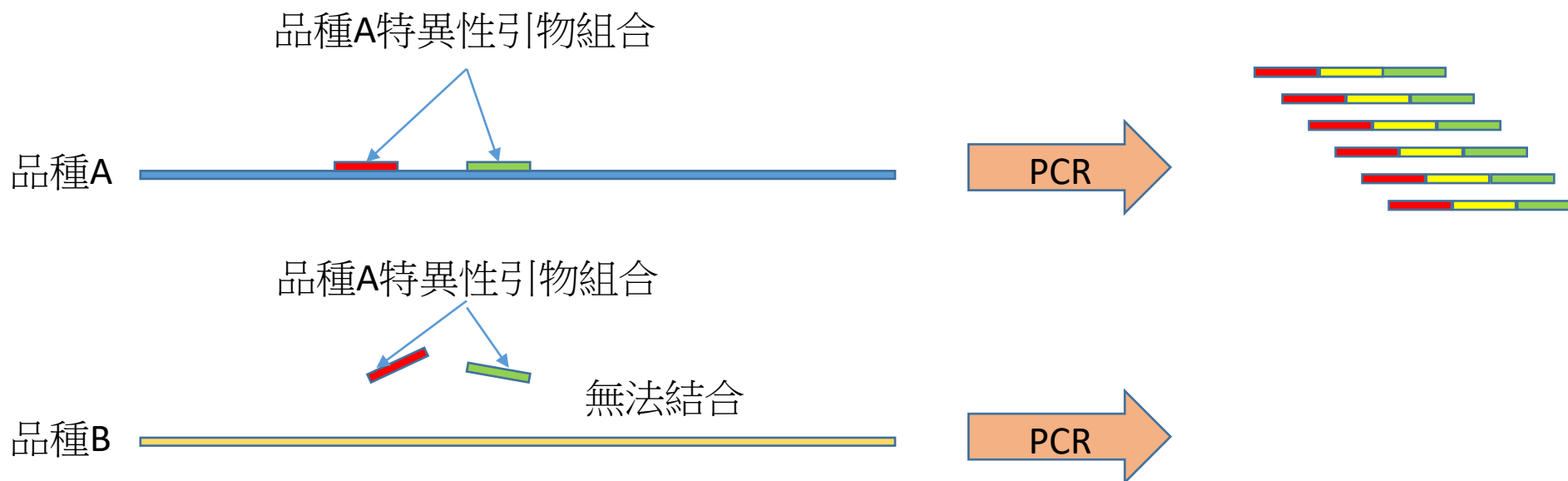
- 變性 (denature)
- 退火 (annealing)
- 延申 (extension)
- 退火溫度影響引物組合及模板
DNA的結合



特異性-聚合酶鏈式反應

品種特異性引物組 (SPP)

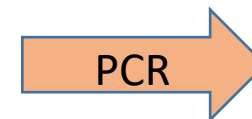
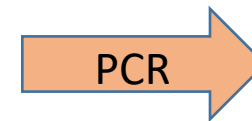
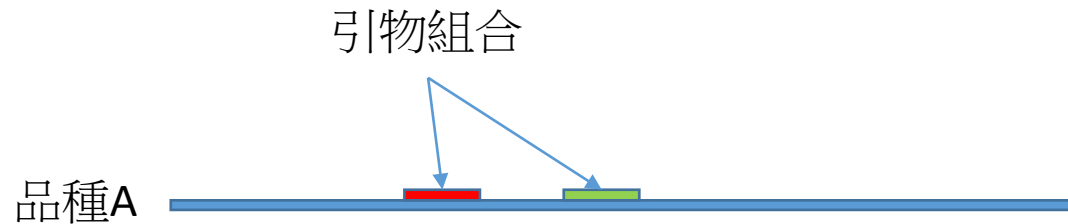
- 區分不同品種
- PCR條件嚴苛



特異性-聚合酶鏈式反應

動物類DNA模板的質量控制引物組合 (ICPP)

- 能與動物的DNA相結合
- 用以佐證能否成功提取動物類DNA



本方法的引物組合

動物類DNA模板的質量控制引物組合

- UnivP/UnivQ

梅花鹿特異性引物組合

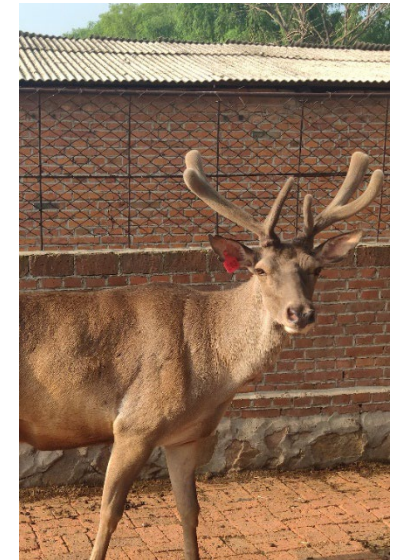
- CNIP-f/CNIP-r

馬鹿特異性引物組合

- CELA-f/CELA-r



梅花鹿 *C. nippon*



馬鹿 *C. elaphus*



方法介紹



方法步驟

提取DNA

PCR擴增

電泳及記錄

結果分析



儀器及設備

- 高壓斧
- 恆溫混勻儀
- 球磨儀、研磨球、研磨管
- 剪刀及鑷子
- 紫外-可見分光光度計
- 離心機
- 移液器
- PCR儀
- 電泳儀及電源供應
- 凝膠成像系統



試劑

- DNA提取、Proteinase K、DTT
- *Taq* 聚合酶套裝、dNTP
- CNIP-f / CNIP-r 引物組合
- CELA-f / CELA-r 引物組合
- UnivP/UnivQ 引物組合
- 純水
- TBE緩衝液、琼脂糖、Gel Red染色劑、上樣緩衝液、DNA LADDER



引物組合

引物名稱	引物方向	引物序列 (5'-3')	擴增物長度 (bp)	目標區域
UnivP	Forward	GGTTTACGACCTCGATGTTG	~104	Animal mitochondrial DNA
UnivQ	Reverse	CGGGTCTGAACTCAGATCAC		
CNIP-f	Forward	CTTACACATGCAAGCATCCA	223	Relative to <i>Cervus nippon</i> mitochondrion between bp 110 – 332 of DQ985076.1
CNIP-r	Reverse	TTAATCGTATGACCGCGGC		
CELA-f	Forward	GCAAGCATCCGCACYCCG	248	Relative to <i>Cervus elaphus</i> mitochondrion between bp 119 – 366 of KT290948.1
CELA-r	Reverse	AACACACTTTACGCCGTRKGC		



操作流程

樣品處理

- 約50 mg 樣品
- 將樣品磨碎，從而增加面積
- 鹿茸較硬，需研磨5分鐘
- 確定樣品磨成粉末狀



操作流程

DNA提取

- DNA提取試劑盒
- 去除核糖體(RNA)、蛋白質
- 加入二硫苏糖醇dithiothreitol (DTT)，加強提取如鹿角等含角蛋白的樣品



操作流程

DNA提取物

- 利用紫外-可見光分光光度計
- DNA提取物純度
 - A260/A280
 - A260/A230
- DNA提取物濃度均一化至10 ng/ μ L

Wavelength	Substance with maximum absorbance
215-230 nm	Commonly used buffer and solvent
260 nm	Nucleic acids
280 nm	Aromatic amino acids



PCR試劑條件

試劑	UnivP / UnivQ	CNIP-f / CNIP-r CELA-f / CELA-r
DNA範本	~20 ng	~ 10 ng
10X PCR緩衝液 (不含Mg ²⁺)	1 X	1 X
MgCl ₂	2.0 mM	1.2 mM
dNTPs	0.2 mM @ dNTP	0.2 mM @ dNTP
正向引物	0.4 μM	0.2 μM
反向引物	0.4 μM	0.2 μM
Taq DNA聚合酶	0.25 μL	0.2 μL
純水	加無菌超純水至25 μL	加無菌超純水至25 μL



PCR反應條件

UnivP/ UnivQ

CNIP-f / CNIP-r
CELA-f / CELA-r

Temperature	Time	No. of cycles
95°C	5 min	1
94°C 55°C 72°C	30 sec 30 sec 1 min	30
72°C	7 min	1
4°C	∞	--

Temperature	Time	No. of cycles
94°C	2 min	1
94°C 63°C 72°C	30 sec 30 sec 30 sec	30
72°C	5 mins	1
4°C	∞	--



操作流程

電泳

- 自動化電泳儀
- 傳統電泳儀
 - 1.5% 瓊脂糖
 - 0.5X TBE
 - 上樣量: 5 μ L of PCR擴增物
- 電泳圖記錄
 - 凝膠成像系統



操作流程

結果判定

- 根據電泳圖上，樣品和品質控制的訊號判斷
- 品質控制應符合本方法的規定

號碼	引物組合	電泳圖結果	
		梅花鹿	馬鹿
1	UnivP/UnivQ	+	+
2	CNIP-f/CNIP-r	+	-
3	CELA-f/CELA-r	-	+



品質控制

本方法的品質控制

- **Extraction negative control (ENC)**
 - 反映提取過程有否受到污染
 - 電泳圖上應為空白
 - 提取陰性對照，在DNA提取時，試管不加入任何樣品或對照品
 - 位於所有樣品和提取陽性對照之後
 - 每批樣品需進行重覆測試 (即最少2個測試)
- **Extraction positive control (EPC)**
 - 反映提取過程是否成功
 - 電泳圖上應出現陽性結果
 - 提取陽性對照，在DNA提取時，試管加入對照物
 - 陽性對照物的來源物種需已被鑒別
 - 每批樣品需進行重覆測試 (即最少2個測試)



品質控制

本方法的品質控制

- Sample duplicate control
 - 每個樣品需進行重覆測試，即最少2個測試
 - 電泳圖上，樣品和重覆樣品的結果應為一致
- PCR negative control (PNC)
 - 反映PCR試劑，以及進行PCR過程中，有否受到污染
 - 電泳圖上應為空白
 - 每次PCR需進行重覆測試 (即最少2個測試管)



品質控制

分析步驟	Extraction negative control (ENC)	Extraction positive control (EPC)	Sample duplicate control	PCR negative control (PNC)
DNA 提取	↓	↓	↓	
PCR擴增	↓	↓	↓	↓
電泳	↓	↓	↓	↓



電泳圖例子

UnivP / UnivQ

1-2: 梅花鹿樣品及重覆樣品

3-4: 馬鹿樣品及重覆樣品

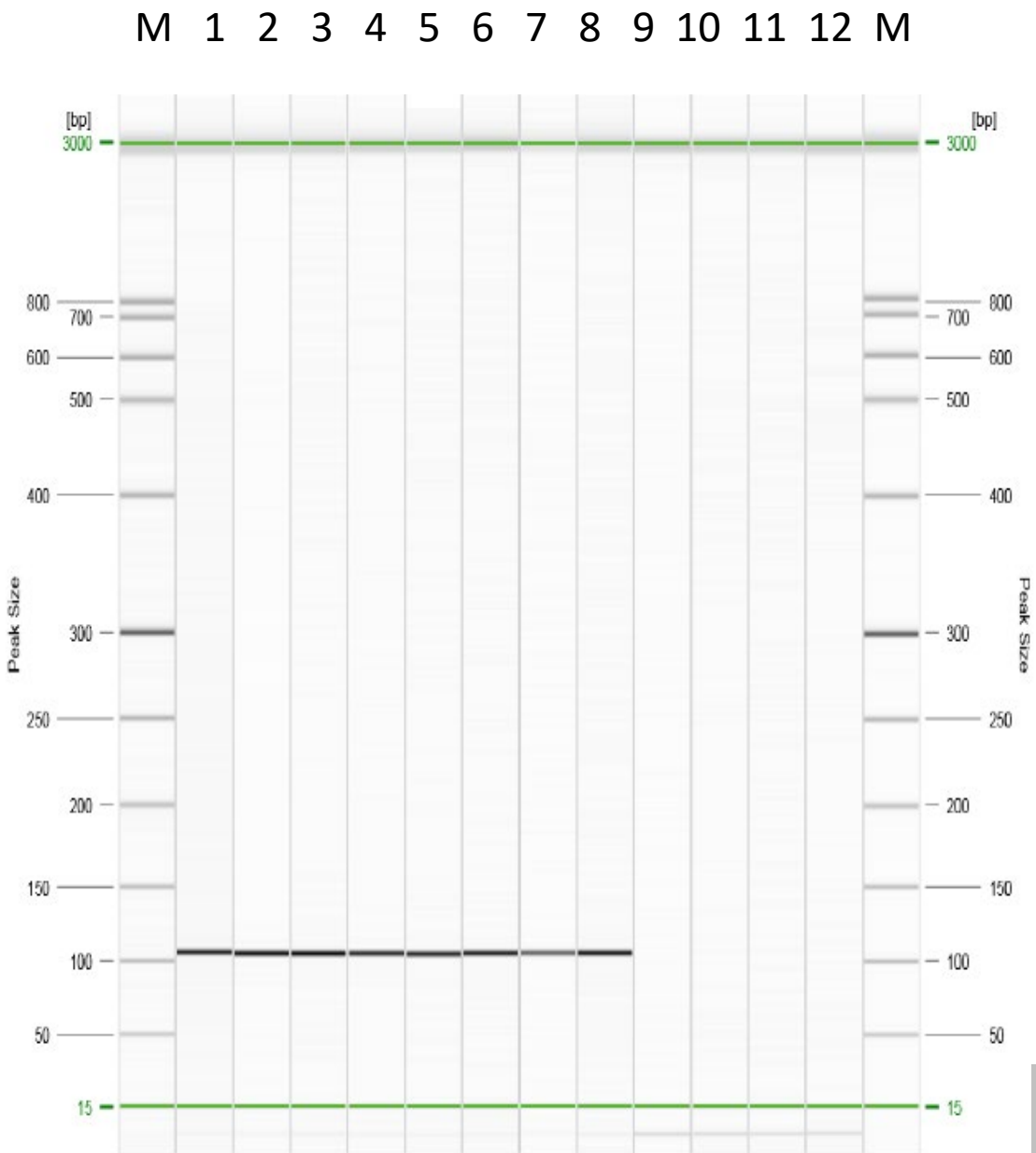
✓ 5-6: 梅花鹿提取陽性對照 (EPC)

✓ 7-8: 馬鹿提取陽性對照 (EPC)

✓ 9-10: 提取陰性對照 (ENC)

✓ 11-12: PCR陰性對照 (PNC)

M: DNA ladder



電泳圖例子

CNIP-f / CNIP-r

1-2: 梅花鹿樣品及重覆樣品

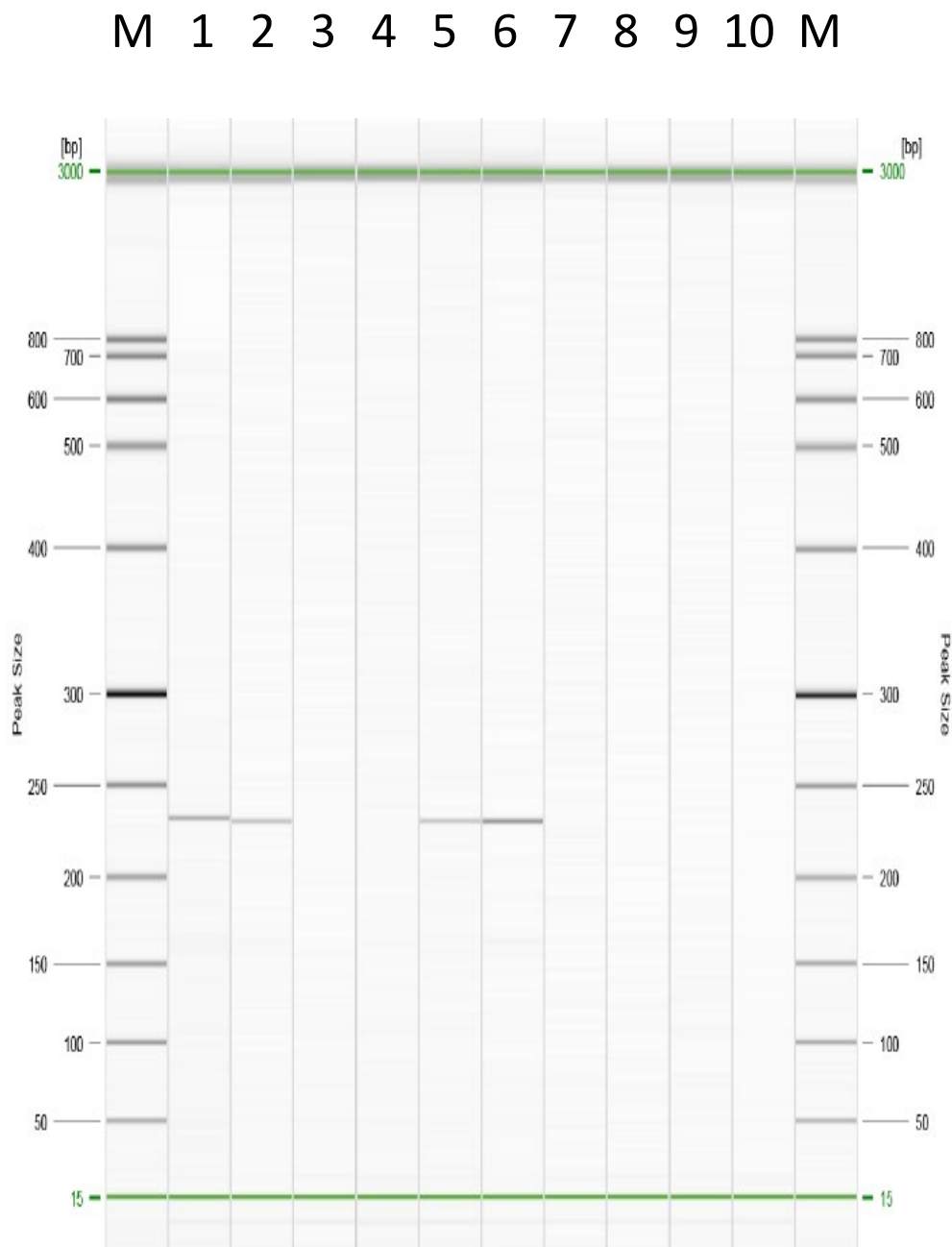
3-4: 馬鹿樣品及重覆樣品

✓ 5-6: 梅花鹿提取陽性對照 (EPC)

✓ 7-8: 提取陰性對照 (ENC)

✓ 9-10: PCR陰性對照 (PNC)

M: DNA ladder



電泳圖例子

CELA-f / CELA-r

1-2: 梅花鹿樣品及重覆樣品

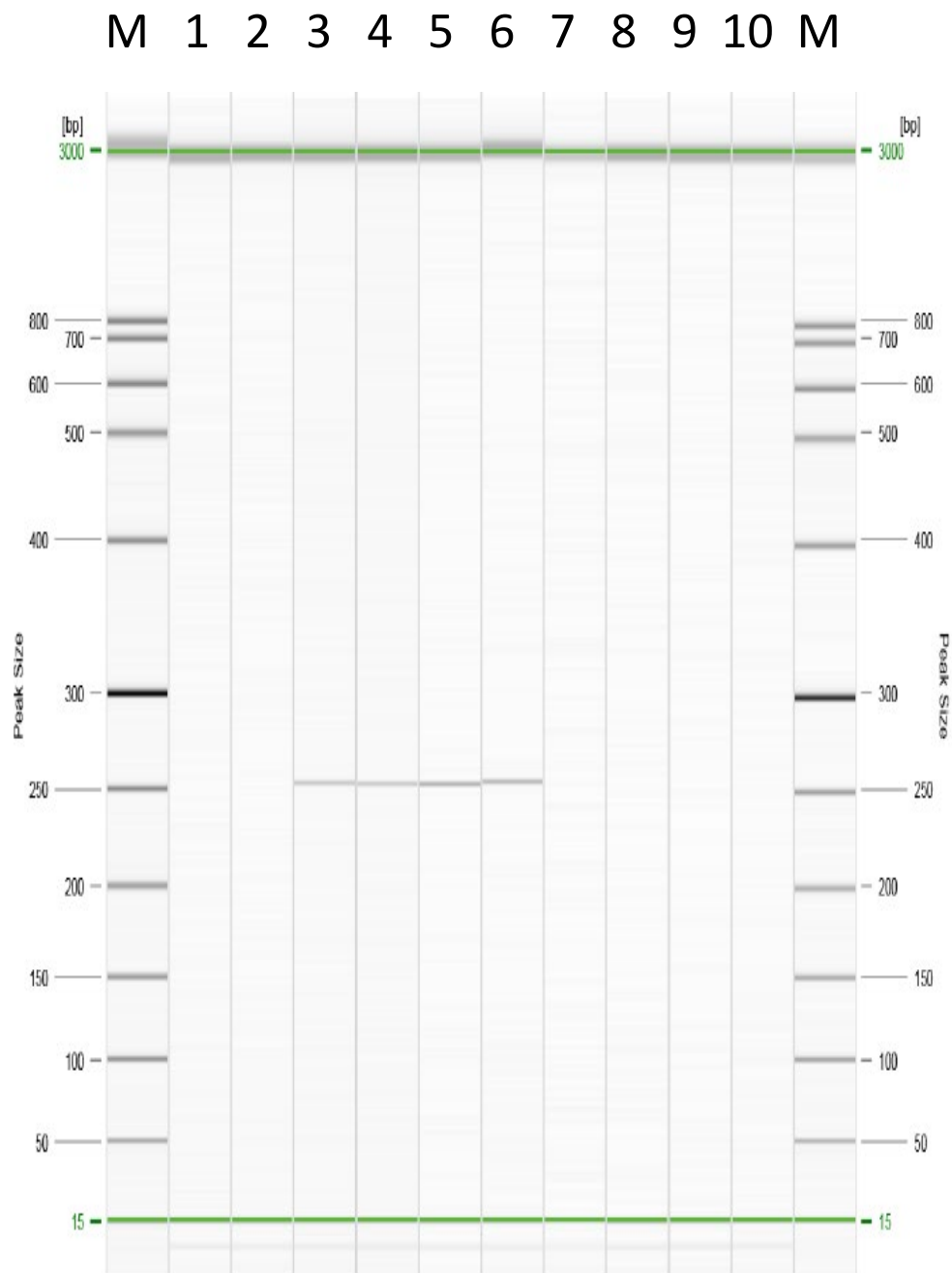
3-4: 馬鹿樣品及重覆樣品

✓ 5-6: 馬鹿提取陽性對照 (EPC)

✓ 7-8: 提取陰性對照 (ENC)

✓ 9-10: PCR陰性對照 (PNC)

M: DNA ladder



方法學考察-適用性



鹿茸



鹿角



鹿筋



鹿鞭



鹿腿肉



鹿成份湯包
(鹿筋)



方法學考察

類別	品種
其他鹿類	<i>Sambar unicolor</i>
	<i>Elaphus davidianus</i>
	<i>Rangifer tarandus</i>
	<i>Cervus albirostris</i>
其他動物	<i>Bubalus bubalis</i>
	<i>Bos taurus</i>
	<i>Ovis aries</i>
	<i>Sus scrofa</i>
	<i>Gallus gallus</i>
	<i>Gadus macrocephalus</i>
	<i>Merluccius merluccius</i>
	<i>Pollachius virens</i>
植物	<i>Gadus morhua</i>
	<i>Acanthopanax senticosus</i>
	<i>Verbena officinalis</i>
真菌	<i>Pueraria lobata</i>
	<i>Ganoderma lucidum</i>



方法學考察 - 檢測限

- CNIP-f/CNIP-r 和 CELA-f/CELA-r
 - 10 ng 模版DNA
- 需考慮樣品的DNA含量



操作建議



DNA檢測的考慮

污染來源

- 樣品交叉污染
- 樣品受環境污染
- 試劑污染
- PCR擴增物污染



污染途徑

PCR擴增物污染

- 最常見及主要原因
- 經PCR擴增後，濃度高
- PCR擴增物氣懸膠體
 - 打開盛載PCR擴增物的試管
 - 移液槍移液



操作流程

守則

- 根據所進行的測試，將操作環境分成前PCR區和後PCR區
- 採用單向流程處理樣品



實驗室環境

- 最理想的情況下，不同功能的工作區劃分在獨立工作室
 - 試劑儲存和準備區
 - 樣品製備區
 - 核酸提取區
 - 擴增區
 - 擴增產物分析區
- 試劑儲存和準備區為正壓，其餘區域為負壓
- 若受限制需在同一工作室，每個區應有適當設施，防止交叉污染



監測污染

方法的品質控制

- 陽性提取對照 (EPC)
- 陰性提取對照 (ENC)
- PCR陰性對照 (PNC)



防止污染措施

存放

- 樣品、對照物應與試劑應分開存放
- 試劑分裝儲存
- 存放測試中間產物在特定的位置
- 不能將PCR擴增物，帶到前PCR區域，污染源頭

位置

- 操作器材專用，不可隨意拿到其他區域
- 消毒儀器應在前PCR區
- 試劑的配製和存放在前PCR區



防止污染措施

保護裝備

- 戴手套和穿實驗袍

操作

- 樣品前處理時，每次只處理一份，避免交叉污染。處理下一份樣品前，更換手套
- 器具要高溫高壓消毒，或使用一次性已消毒用具
- 用有濾芯的吸頭
- 製備PCR混合液，分裝，最後才加入DNA模板
- 只可在後PCR區打開盛載PCR擴增物的試管
- 用70%酒精清理台面，BSC和PCR櫃用完後照射紫外光



防止污染措施

PCR操作台

- HEPA
- 紫外光燈
- Laminar flow，保護實驗樣品及試劑
- 配備 PCR master mix



防止污染措施

清潔

- 實驗枱面
- 離心機
- 混勻儀
- BSC和PCR櫃
- 電泳儀
- 紫外透射儀



總結

- 此項目是為中藥業界和檢測業界提供經驗證的篩選方法作參考
- 我們希望所開發的**DNA**檢測方法及品質控制系統，能與現行鹿茸鑒別法互補不足，讓業界識別及避免買賣貨源有問題的產品，保障業界聲譽和利益，切實地解決業界面對難辨貨源真偽的難題。



Thank You

