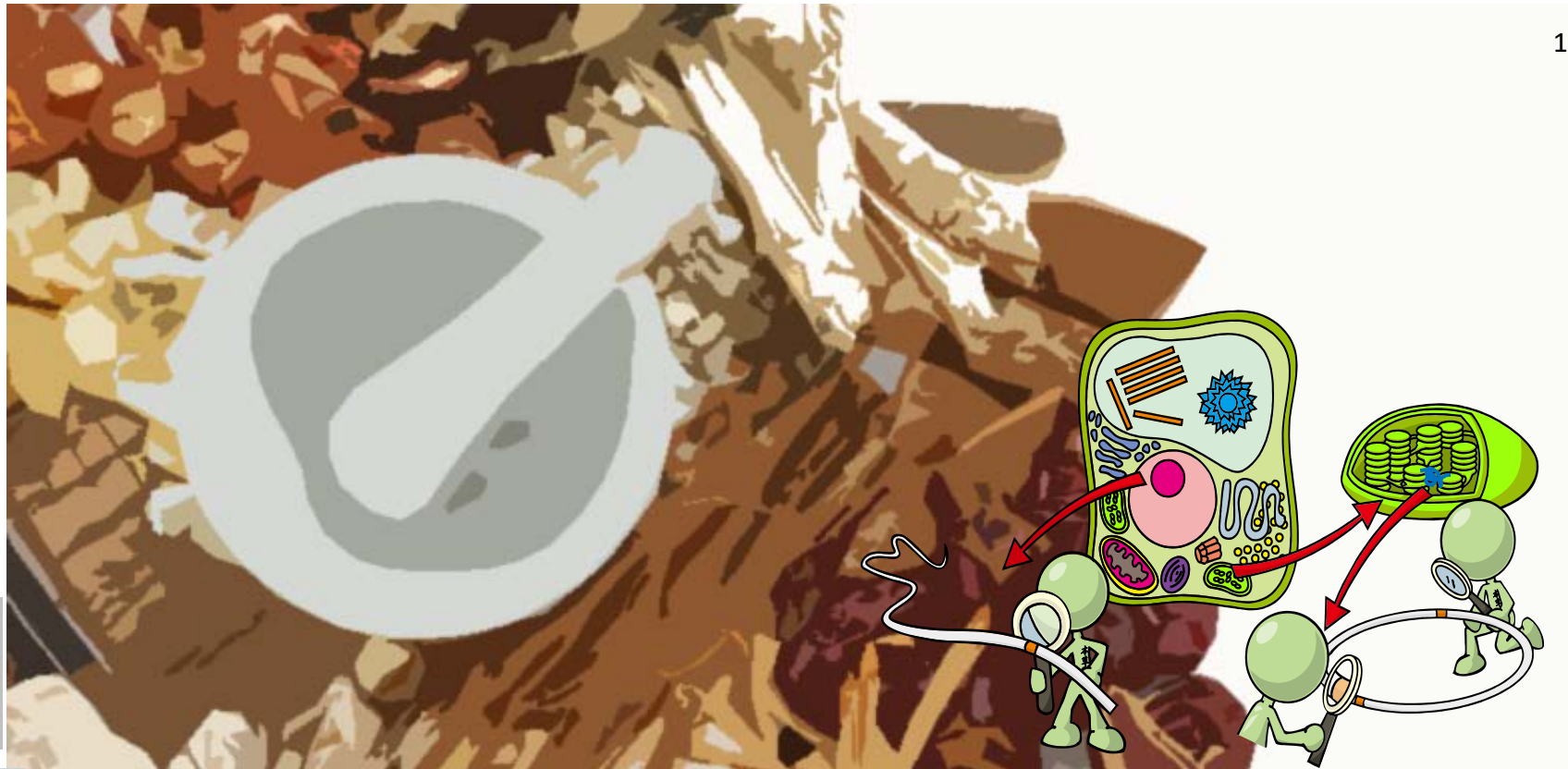


Chinese Medicine Regulatory Office Department of Health

衛生署中醫藥規管辦公室

https://www.cmro.gov.hk/html/b5/useful_information/gcmti/index.html



Online sharing session

Generating DNA Barcodes for Plant-derived Chinese Materia Medica (CMM)

植物類藥材DNA條形碼檢測法

23 July 2021



內容

01 背景

02 原理

03 方法介紹

04 操作建議

05 Q & A



GCMTI RD-5:2020

GCMTI method publications

Generating DNA Barcodes for Plant-derived Chinese Materia Medica (CMM)

GCMTI FS:2020-1

Reference DNA Sequence

Plant Specimen

Reference Detail	
Description of reference material	Plant specimen
Scientific name	<i>Panax ginseng</i> C. A. Mey
Laboratory number	RD88
Sample mark	RD88-A
Locality	Fusong, Jilin Province, China
Corresponding CMM	RD80
Authenticated	Yes

Image

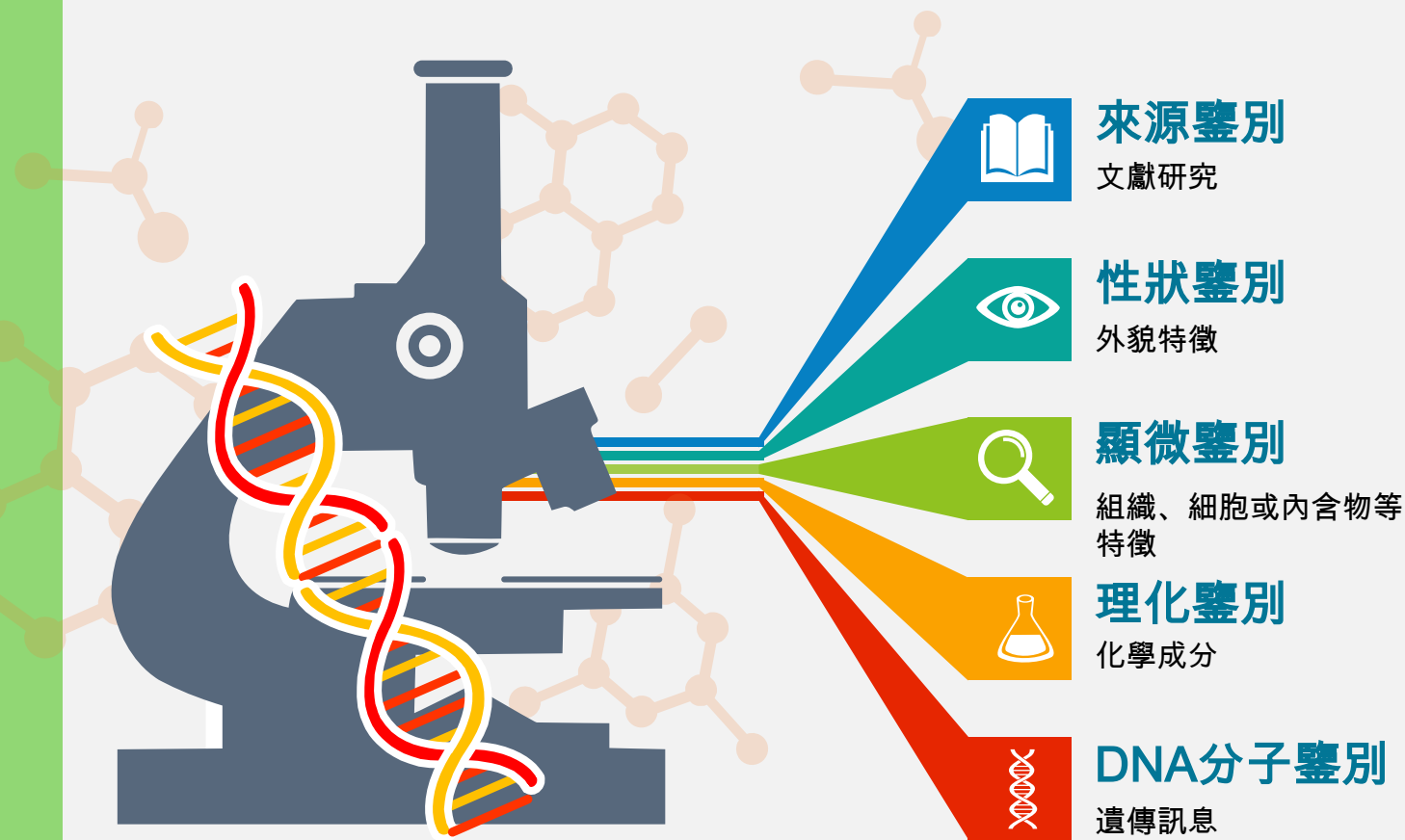
Internal transcribed spacer 2 of nuclear ribosomal RNA (ITS2)
Batch ID: B1180918

Chloroplast psbA-trnH intergenic spacer (psbA-trnH)
Batch ID: B1180918

Chloroplast ribulose biphosphate carboxylase large chain (rbcL)
Batch ID: B1180918

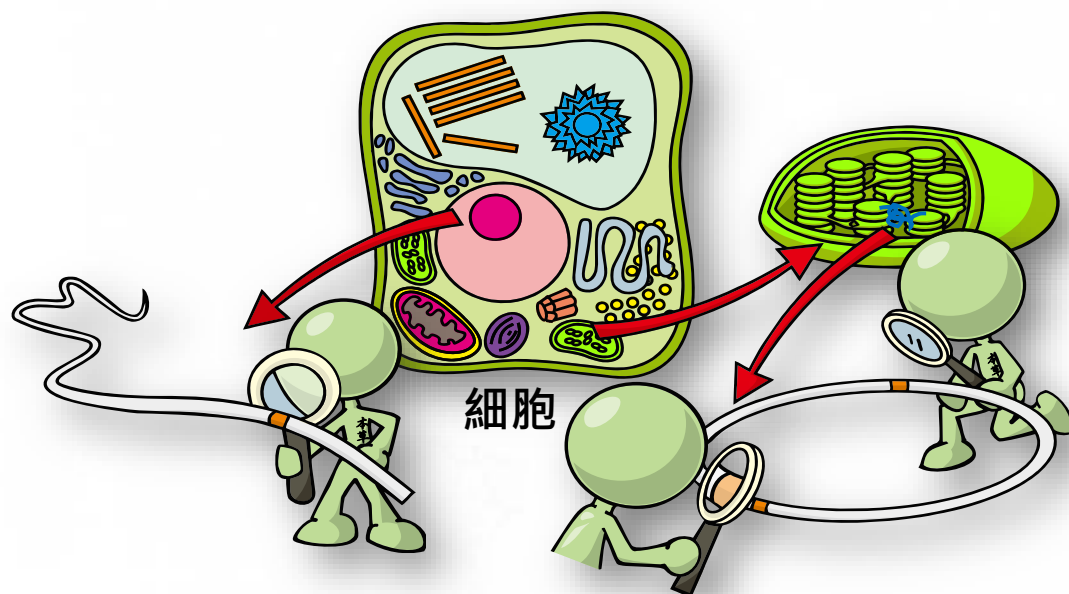
利用多學科的鑒別手段來識別

中藥材
中成藥分析

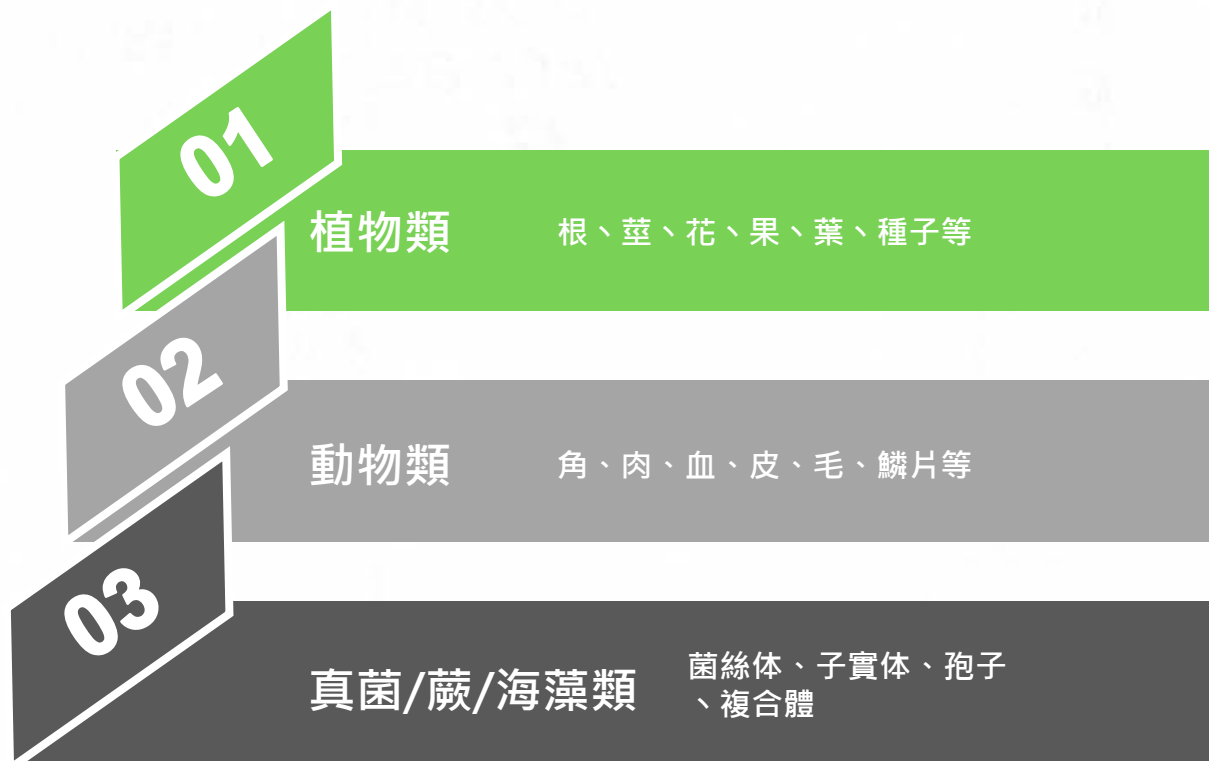


何謂DNA分子鑒別

根據遺傳物質DNA在不同生物之間的差異來鑒別**生物物種 (物種來源)**



含有鑒別特徵的遺傳密碼



以DNA技術互補現有的中藥材鑒別方法

DNA鑒別技術特點

分辨能力強

生物各部位的DNA訊息一致

品種混雜、多來源品種的中藥材

無獨特化學成分標記

基源品質管理

DNA鑒別技術短處

無法作中藥材的品質評估

不適用於礦物類中藥材

不能分別藥用部位

相對其他鑒別方法，操作步驟較多



DNA技術在中藥基源品質管理上可發揮的作用



01

作為起始物料作的鑒別手段

- 鑒別半加工原料 (失去外型特徵、藥材粉末)更顯優勢
- 磨粉後製成的膠囊劑

02

鑒別多基源的中藥材，有助符合國外的註冊要求

多基源中藥材含有多於一個植物品種，例如黃連(*Coptis chinensis*)，三角葉黃連(*Coptis deltoidea*)

03

品種混雜、容易混淆

洋金花(*Datura metel*) vs 鬧羊花(*Rhododendron molle*)

04

有效成分無法確定的問題 (無獨特化學成分標記的中藥材)

動物藥，例如鹿茸



全球及內地對DNA 測試的新發展趨勢

確保中藥材臨床應用的安全和效用

中藥材存在多基原物種及同名異物、同物異名等問題，鑒於傳統基原鑒定、性狀鑒定、顯微鑒定和理化鑒定方法存在局限性，為保證中藥材臨床應用安全、準確、有效，有必要增加中藥材DNA分子鑒定法。

中國藥典2010版

首次發佈烏梢蛇、蕪蛇、川貝母的DNA指紋圖譜方法作為中藥鑒別的有效補充方案

2015, 2020 版第四部

<< 9107 中藥材DNA條碼分子鑒定法指導原則 >>

英國藥典2017版補充章節

利用DNA條形碼方法作為草藥鑒別的工具
鑒別聖羅勒 (*Ocimum tenuiflorum*)

分別黃柏 (*Phellodendron chinense*) 及其替代品或攙雜品關黃柏 (*Phellodendron amurense*)

美國藥典2014

指導原則作為補充方法鑒別植物藥

FDA 2016業界指引

接授DNA條形碼方法可用於原材料物種鑒別

HOKLAS

Supplementary criteria No 43. "Chinese Medicine" and "Food" - Species Identification by DNA Sequencing for Authentication Purpose





GCMTI RD-5:2020

GCMTI method publications



Generating DNA Barcodes

for Plant-derived Chinese Materia Medica (CMM)

政府中藥檢測中心

- 開展“建立中藥材參考DNA序列庫”研究計劃
- 研究計劃旨在制訂中藥材的「DNA條形碼檢測法」和建立一個中藥材參考「DNA序列庫」作鑒別用途
- 透過「DNA條形碼檢測法」建立中藥材和基原動/植物物種之間的遺傳可溯源性，保障中藥材臨床應用的安全和效用
- 以《中華人民共和國藥典》(2015年版)的《中藥材DNA條形碼分子鑒定法指導原則》作為技術藍本，並根據香港實驗所認可計劃的品質管理規定，驗證及建立了「DNA條形碼檢測法」及一套可獲認可的DNA測試方法及品質管理系統



最新消息
關於我們
規管法例
表格及申請須知
有用資料

香港特別行政區政府
衛生署

香港中醫藥管理委員會
Chinese Medicine Council of Hong Kong

政府中藥檢測中心
Government Chinese Medicines Testing Institute

世界衛生組織
傳統醫藥合作中心
WHO Collaborating Centre for Traditional Medicine

中成藥生產質量管理規範
網上資源
Good Manufacturing Practice for Proprietary Chinese Medicines Web Resources

GMP

安全使用中藥材
煎藥前
用清水沖洗中藥材

香港中藥材標準
Hong Kong Chinese Materia Medica Standards

HP 衛生防護中心
Centre for Health Protection

支持器官捐贈
立即網上登記!

主頁 > 有用資料 > 政府中藥檢測中心 > 研究成果 > 測試方法

測試方法

簡介 組織架構 諮詢委員會 中藥標本館 我們的實驗室 香港中藥材標準 研究成果

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

- 外用藥油中藥材指標成分的分析(測試方法只提供英文版本)
- 以DNA技術作為鑒別應查的互補檢測方法(測試方法只提供英文版本)
- 植物類藥材DNA條形碼檢測法(測試方法只提供英文版本) ←
- 動物類藥材DNA條形碼檢測法(測試方法只提供英文版本)
- 內服中成藥中藥材指標成分的分析(併批置)(測試方法只提供英文版本)

香港特別行政區政府
衛生署
衛生署中醫藥管理委員會

GovHK 香港政府一站通 詳情 ENGLISH 我的自訂色彩 A A 搜尋

給市民的資訊 給中醫藥界的資訊 給中藥

最新消息
關於我們
規管法例
表格及申請須知
有用資料

主頁 > 有用資料 > 政府中藥檢測中心 > 研究成果 > 測試方法 > 植物類藥材DNA條形碼檢測法

植物類藥材DNA條形碼檢測法 (只提供英文版本)

GCMTI RD-5:2020
Generating DNA Barcodes for Plant-derived Chinese Materia Medica (CMM)

GCMTI RD-5:2020
Supplementary information for GCMTI RD-5:2020

世界衛生組織
傳統醫藥合作中心
WHO Collaborating Centre for Traditional Medicine

中成藥生產質量管理規範
網上資源
Good Manufacturing Practice for Proprietary Chinese Medicines Web Resources

GMP

安全使用中藥材
煎藥前
用清水沖洗中藥材

GCMTI RD-5:2020

GCMTI method publications

Generating DNA Barcodes for Plant-derived Chinese Materia Medica (CMM)

植物類藥材DNA條形碼檢測法

GCMTI RD-5: 2020

https://www.cmro.gov.hk/html/b5/useful_information/gcmti/research/testing_methods/index.html



簡介



試劑及材料



儀器



一般程序

(試樣製備、DNA 提取、PCR 擴增DNA條形碼、DNA 測序、測序後分析)



品質控制參數



香港特別行政區政府
衛生署

香港中藥管理委員會
Chinese Medicine Council of Hong Kong

政府中藥檢測中心
Government Chinese Medicines Testing Institute

世界衛生組織
傳統醫藥合作中心
WHO Collaborating Centre for Traditional Medicine

中成藥生產質量管理規範
網上資源
Good Manufacturing Practice for Proprietary Chinese Medicines
Web Resources

GMP

安全使用中藥材
避免過於鮮艷潔白或有刺鼻酸味的中藥材

香港中藥材標準
Hong Kong Chinese Materia Medica Standards

HP 衛生防護中心
Center for Health Protection

支持器官捐贈
立即網上登記!

同心抗疫

中藥材參考DNA序列庫

傳統上，性狀及顯微鑒別是中藥材鑒別的常用手段，透過觀察藥材的外型和組織特徵，從而明確判斷其身份。近年，開發DNA方法作為互補手段漸受關注，尤其應用於區分近緣物種之上。國際權威機構亦公佈了相關DNA測試方法和技術指引，例如中華人民共和國藥典、美國藥典和英國藥典。

此研究計劃旨在制訂中藥材的標準脫氧核糖核酸條形碼檢測方法（「DNA條形碼檢測法」）和建立一個中藥材參考DNA序列庫（「DNA序列庫」），透過「DNA條形碼檢測法」建立中藥材和基原動植物物種之間的遺傳可溯源性，保障中藥材臨床應用的安全和效用。研究計劃中，我們根據香港實驗所認可計劃的要求進行方法學考察，建立及確認植物及動物類藥材的DNA條形碼檢測法和品質控制系統，目前已完成人參、西洋參、三七、梅花鹿和馬鹿的參考DNA條形碼序列，並會持續擴充「DNA序列庫」內容。

特點

- 廣泛授性：多國藥典認定「DNA條形碼檢測法」是物種鑒別的直接及有效方法；
- 多選擇性：提供多個供物種鑒別用的DNA條形碼的檢測方法及參考DNA序列；
- 高追溯性及可靠性：「DNA序列庫」數據源於憑證樣本(包括臘葉標本、中藥材樣本等)，具良好資料記錄，提高「DNA序列庫」之遺傳可追溯性及真確性；
- 可轉移性：根據香港實驗所認可計劃的要求進行方法學考察，測試方法經驗證。

測試方法及「DNA序列庫」

測試方法及「DNA序列庫」供免費參考使用，有助香港檢測及認證界掌握新的檢測技術和應用，提高實驗所專業水平及國際認受性以開拓新的經濟機遇，為中藥業界或海外買家提供多元化測試服務，更可推動中藥檢測認證產業的發展。

測試方法 (只提供英文版本)

- 測試方法

參考DNA序列庫

- 目錄
- 凡例 (只提供英文版本)

GCMTI FS.2020-1

Reference DNA Sequence
Plant Specimen

DNA Information

Internal transcribed spacer 2 of nuclear ribosomal RNA (ITS2)
Batch ID: B1180918

Reference Detail

Description of reference material	Plant specimen
Scientific name	<i>Panax ginseng</i> C.A. Mey.
Laboratory number	RD92
Sample mark	RD92-A
Locality	Aun, Hun Province, China
Corresponding plant voucher specimen	RD92 and RD 99
Authenticated	Yes

Image

GCMTI FS.2020-1

Reference DNA Sequence
Chinese Materia Medica (CMM)

DNA Information

Internal transcribed spacer 2 of nuclear ribosomal RNA (ITS2)
Batch ID: B1180911

Reference Detail

Description of reference material	Radix Ginseng
Scientific name	<i>Panax ginseng</i>
Laboratory number	RD92
Sample mark	RD92-1A
Locality	Aun, Hun Province, China
Corresponding plant voucher specimen	RD92 and RD 99
Authenticated	Yes

Image

Front view

Back view

中藥材參考DNA序列庫

https://www.cmro.gov.hk/html/b5/useful_information/gcmti/research/dna_sequences/CMMR_SL.html

01 樣本資訊

GCMTI館藏實驗室編號、產地、相對應臘葉標本或中藥材樣本編號

02 樣本圖片

憑證樣本(包括臘葉標本、經鑒別中藥材樣本)

03 三個DNA條形碼

核糖體內部轉錄間隔區2 (internal transcribed spacer 2 of nuclear ribosomal RNA, ITS2)、葉綠體 *psbA-trnH* 基因間區 (chloroplast intergenic *psbA-trnH* spacer (*psbA-trnH*)) 葉綠體二磷酸核酮糖羧化酶大鏈 (chloroplast ribulose biphosphate carboxylase large chain, *rbcL*)

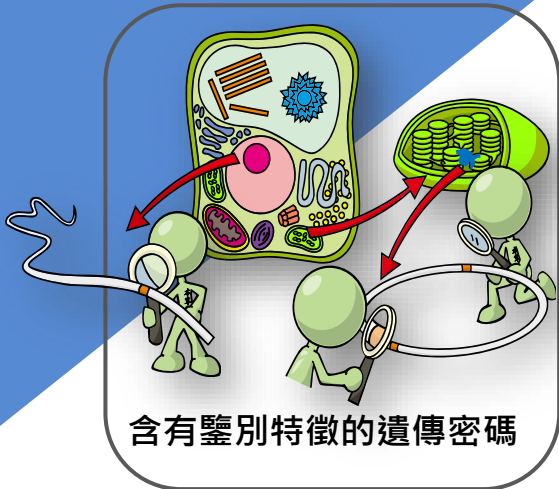


研究計劃特點

廣認授性

測試方法

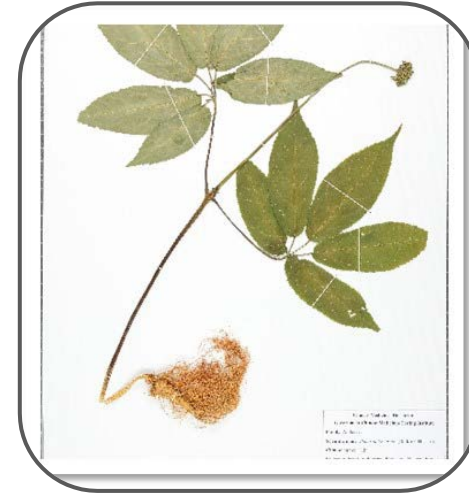
多國藥典認定「DNA條形碼檢測法」是物種鑒別的直接及有效方法；研究題材切合業界需要



多選擇性

供物種鑒別用的DNA區域

提供3個供物種鑒別用的DNA條形碼的檢測方法及DNA參考序列



高追溯性及高可靠性

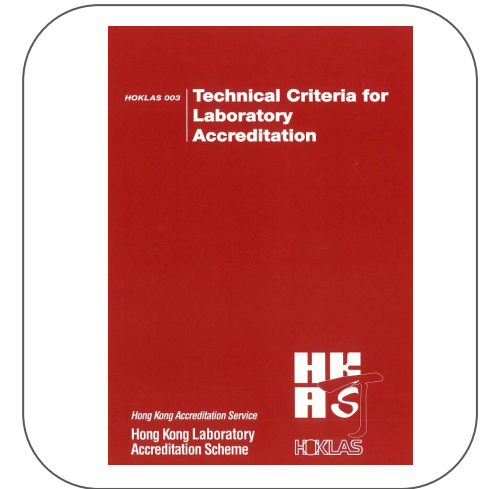
DNA數據庫源於憑証樣本

憑証樣本(臘葉標本和中藥材樣本)具良好資料記錄，提高「DNA序列庫」之遺傳可追溯性及真確性

可轉移性

測試質控

設計配合本地測試認可要求；測試方法及「DNA序列庫」供免費參考使用，讓中藥及檢測業界掌握新的知識和測試技術，從而提高檢測業界的專業水準及國際認受性以開拓新的經濟機遇；更可推動中藥檢測認證產業的發展



DNA數據庫源於憑証樣本

高追溯性及真確性

現有GCMTI館藏、獨立編號、良好資料記錄

01

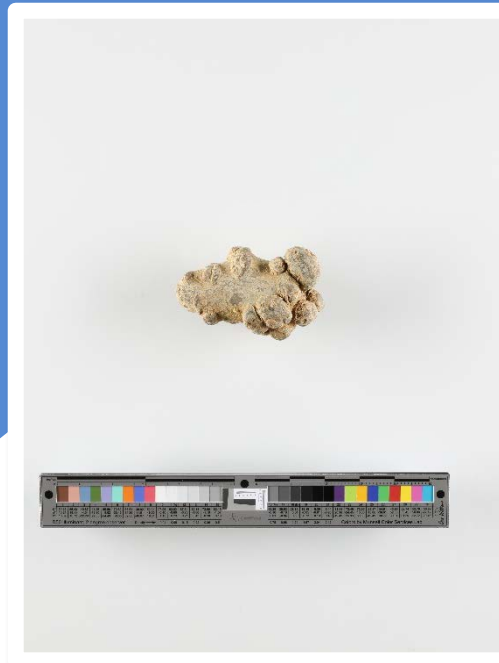
臘葉標本

- “香港中藥材標準”蒐集的葉標本
- 專家鑒別及附鑒定標籤

02

中藥材樣本

- “香港中藥材標準”蒐集的
中藥材樣本，已驗證：
- 性狀分析
- 顯微分析
- 理化分析



[鑒定報告]

藥材三七的鑒定結果

样品序号: ZYC2002-106

样品名称	三七	样品数量	2.5 kg
商品名	三七	收到日期	2003/1/10
编号	SQ3-01	鉴别数量	2.5 kg
产地或采集地	云南省文山县	鉴别包装	双层塑袋
鉴定项目	植物来源	备注	采集栽培品
鉴定依据	《中国植物志》及《中国药典》2000版一部		

鉴定结果

经鉴定，本品为五加科植物五加科植物三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 的干燥根。

鉴定人	任蕊 (药师)	复核人	张维 (副主任药师)
鉴定日期	2003/2/10	复核日期	2003/2/17
鉴定部门	中国药品生物制品检定所中药室	技术负责人	林瑞超 (印)

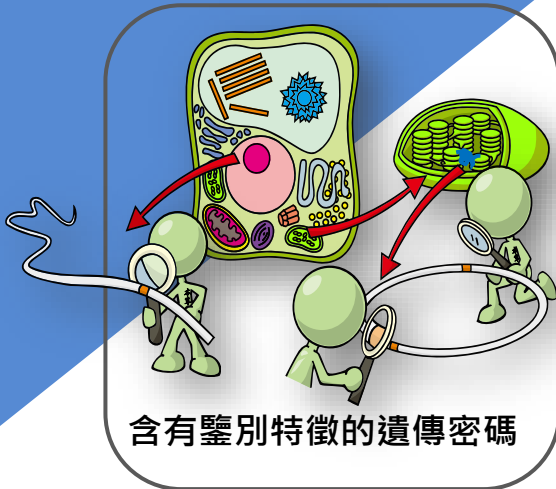


研究計劃特點

廣認授性

測試方法

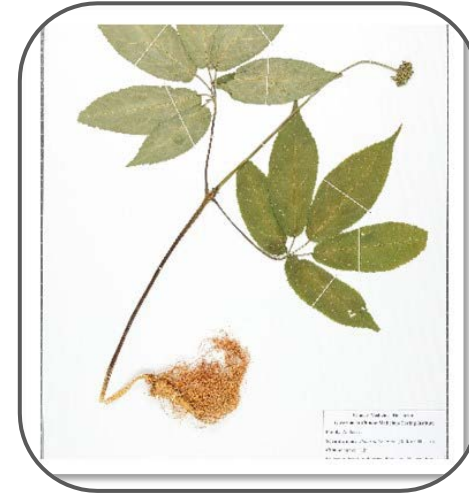
多國藥典認定「DNA條形碼檢測法」是物種鑒別的直接及有效方法；研究題材切合業界需要



多選擇性

供物種鑒別用的DNA區域

提供3個供物種鑒別用的DNA條形碼的檢測方法及DNA參考序列



高追溯性及高可靠性

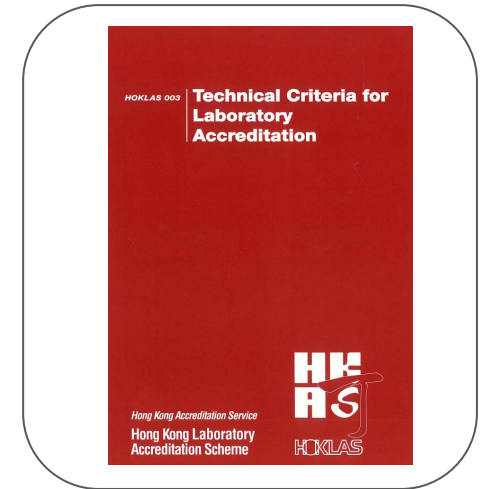
DNA數據庫源於憑証樣本

憑証樣本(臘葉標本和中藥材樣本)具良好資料記錄，提高「DNA序列庫」之遺傳可追溯性及真確性

可轉移性

測試質控

設計配合本地測試認可要求；測試方法及「DNA序列庫」供免費參考使用，讓中藥及檢測業界掌握新的知識和測試技術，從而提高檢測業界的專業水準及國際認受性以開拓新的經濟機遇；更可推動中藥檢測認證產業的發展



原理

遺傳物質

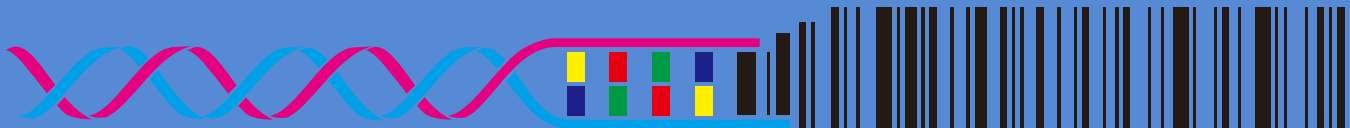
- 生物的藍圖
- 腺嘌呤(A)、鳥嘌呤(G)、胞嘧啶(C)、胸腺嘧啶(T)四種化合物組成
- A, T, C, G 按不同排列次序組成，稱為DNA序列
- 不同物種、甚至不同個體的DNA序列不相同

核酸擴增技術

核酸測序技術

DNA條形碼分子鑒定法

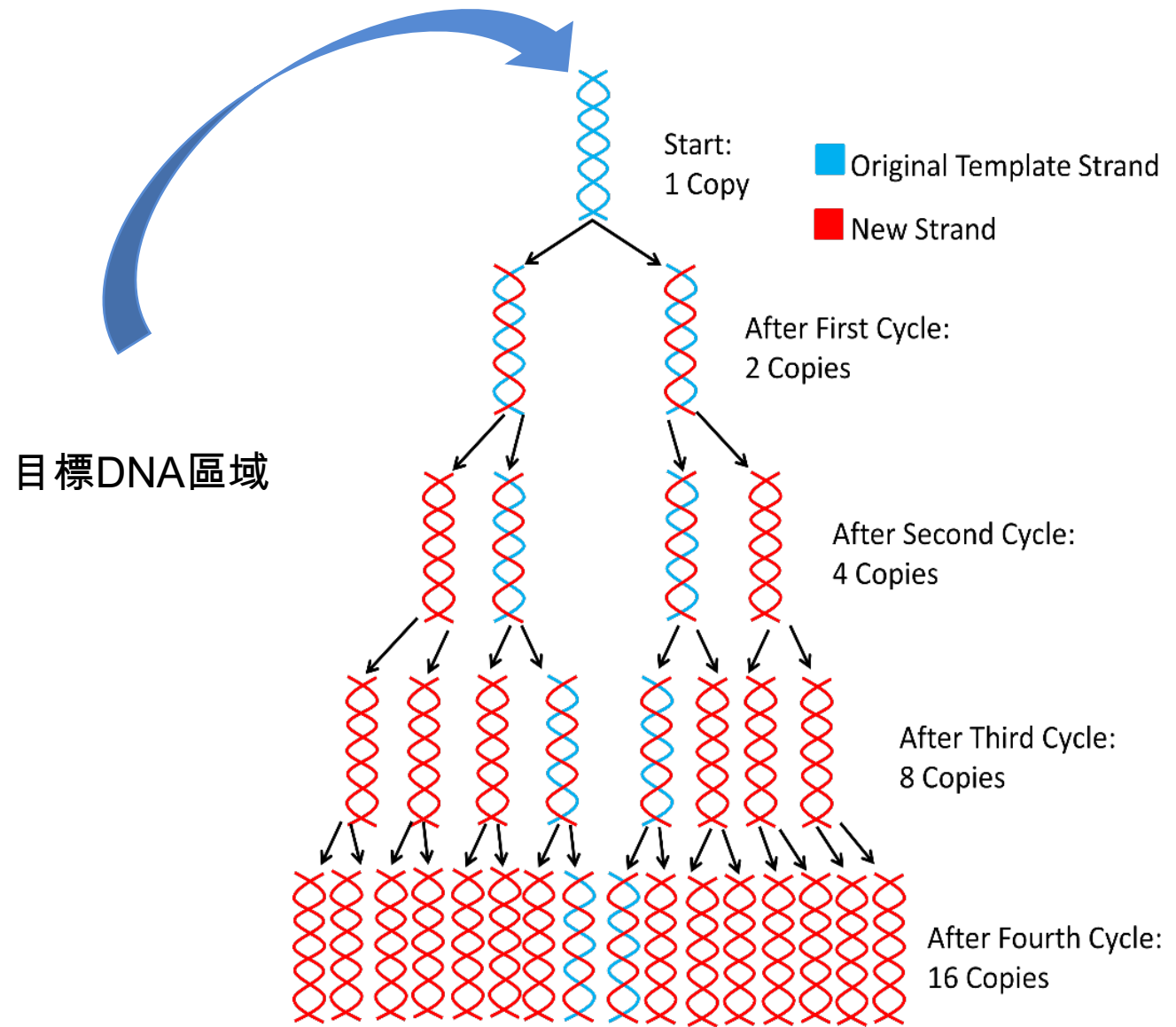
- DNA條形碼分子鑒定法是利用基因組中一段公認的、相對較短的DNA序列來進行物種鑒定的一種分子生物學技術，是傳統形態鑒別方法的有效補充
- 透過讀出或偵測這些不同的序列，可以對物種作出區分
- 鑒別有明確的判斷標準，測試結果具高重複性，不同實驗室得出的數據可進行比對



核酸擴增技術

聚合酶鏈式反應 (Polymerase chain reaction, PCR)

- 是一種用於擴增特定DNA片段的分子生物學技術，而至細胞低含量DNA可達到檢測的水平
- 特異性依賴於與目的DNA片段兩端互補的寡核苷酸引物組合 (Oligonucleotide primer pair)
- 現時DNA檢測方法的核心技術





核酸擴增技術

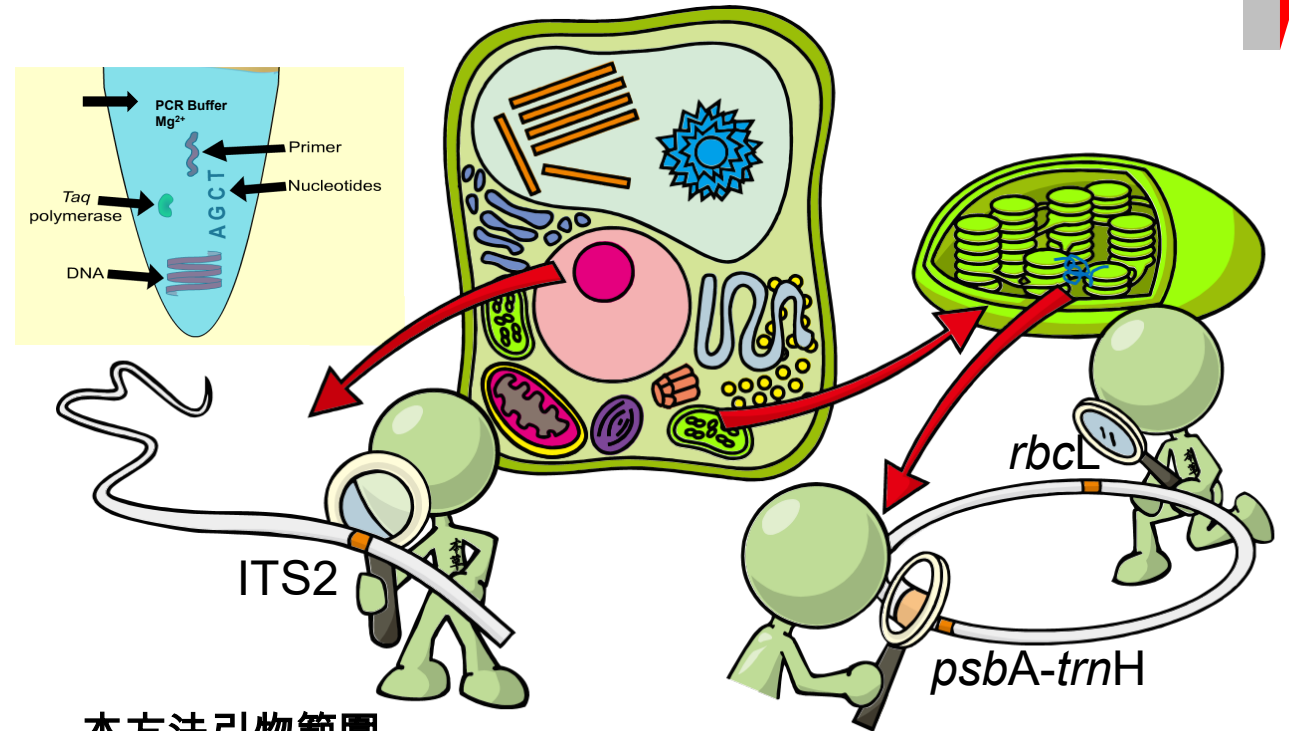
聚合酶鏈式反應 (Polymerase chain reaction, PCR)

構建反應系統

- 模板DNA (Template DNA)
- 引物組合 (Primer pair)
- PCR緩沖液 (其中需要Mg²⁺) (PCR master mix included Mg²⁺)
- DNA聚合酶 (*Taq* DNA Polymerase)
- dNTP混合物 (dNTP mix)

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



本方法引物範圍

DNA條形碼	DNA條形碼的位置
ITS2	<ul style="list-style-type: none"> • 位於植物5.8S和28S核糖體核糖核酸(ribosomal RNA)之間的內部轉錄間隔區 2 (ITS2)，是核糖體 RNA (rRNA)基因非轉錄區的一部分。 • 進化速率較快，一般用於研究屬間、種間甚至居群間等較低分類等級的系統關係
<i>psbA-trnH</i>	<ul style="list-style-type: none"> • 位於葉綠體基因組光系統II反應中心蛋白D1(<i>psbA</i>)和組氨酸運轉核糖核酸(<i>trnH</i>)之間的一段非編碼區區域 • 該間區進化速率較快，常用於植物屬間、種間的系統發育研究
<i>rbcL</i>	<ul style="list-style-type: none"> • 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(<i>rbcL</i>)的5端方向第1至599個鹼基(除去引物結合位點後，則位於第27至579個鹼基) • 進化速率較慢，常用於探討科級和科級以上等級的系統發育問題

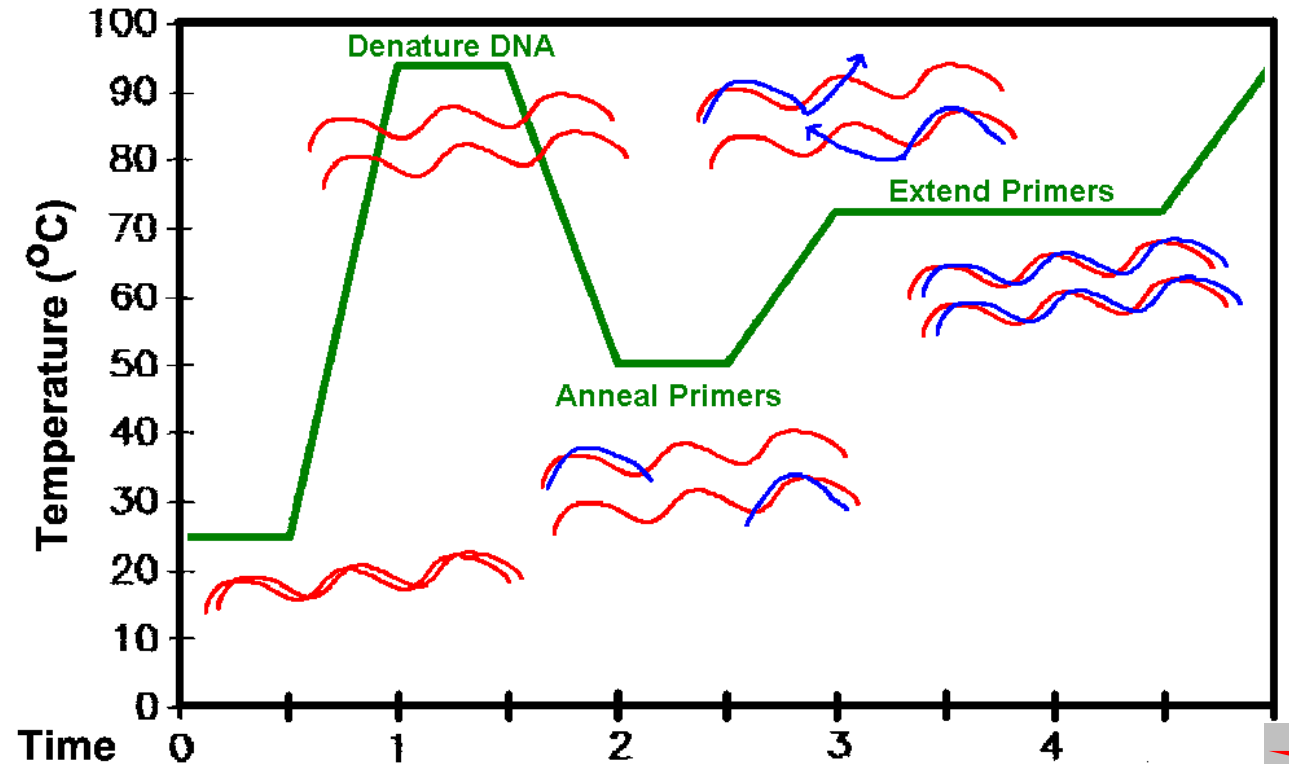
核酸擴增技術

聚合酶鏈式反應
(Polymerase chain
reaction, PCR)

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

PCR 熱循環儀

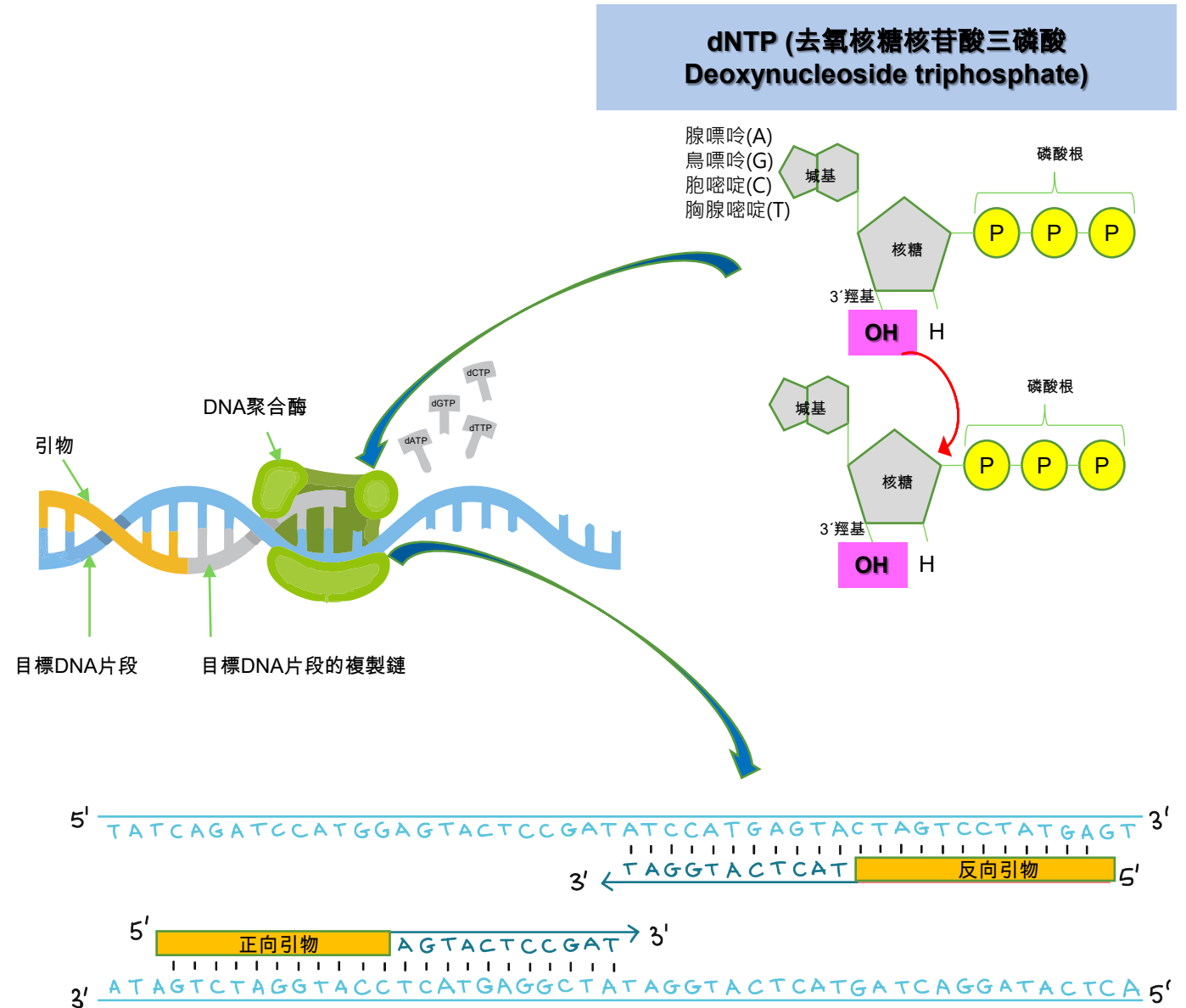


核酸擴增技術

聚合酶鏈式反應 (Polymerase chain reaction, PCR)

核酸序列形成的基礎

- 核酸是由許多核苷酸單位通過3',5' - 磷酸二酯鍵(3',5' -phosphodiester linkage)連接
- 即由前一核苷酸的3' -OH與下一位核苷酸的5' 位磷酸間形成，構成一個線性大分子
- 核酸是具方向性的長鏈狀化合物,多核苷鏈的兩端,一端稱為5'端,另一端稱為3'端

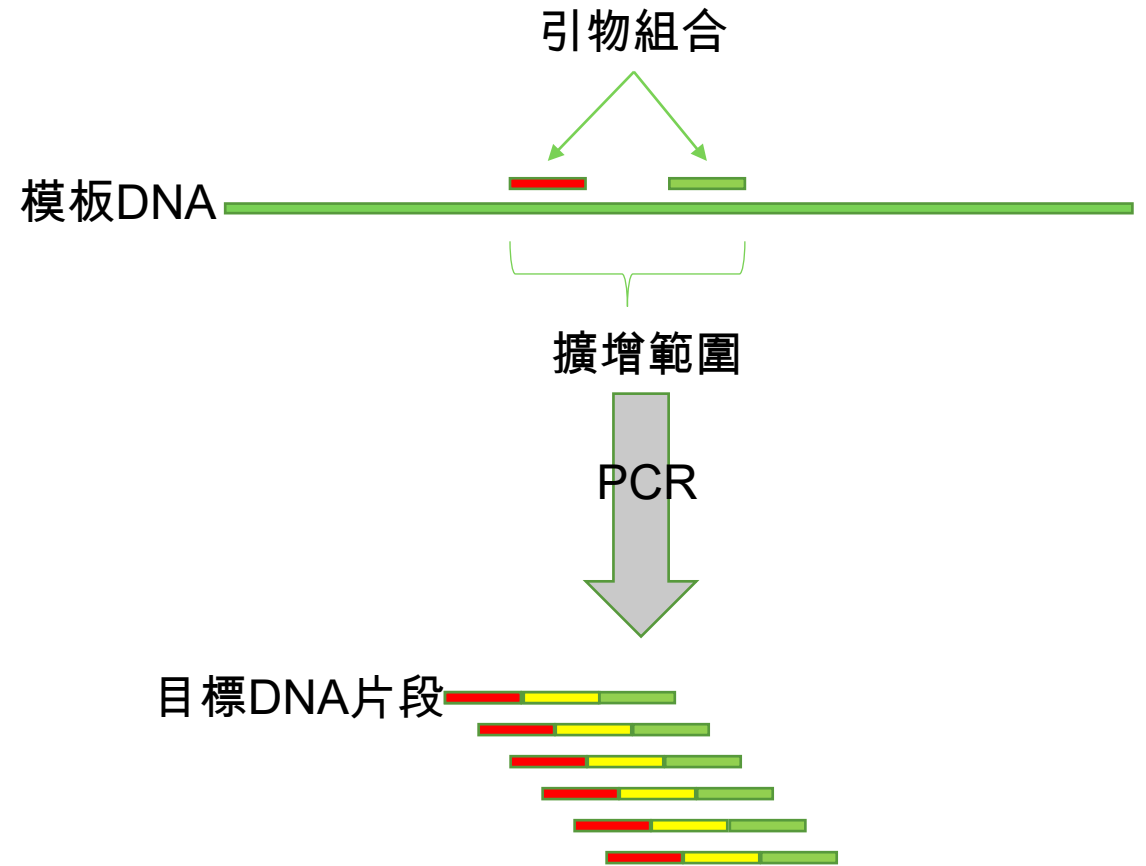


核酸擴增技術

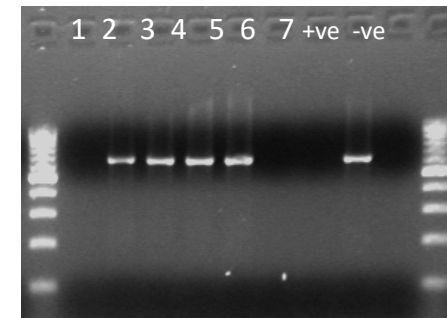
聚合酶鏈式反應
(Polymerase chain
reaction, PCR)

瓊脂糖凝膠電泳法 (Agarose gel
electrophoresis)

- 根據DNA分子大小來分離和識別目的DNA片段的技術
- 檢測DNA依賴於所使用的螢光染色方法
- 一般可檢測出及分離數納克 20bp-10kb長度DNA



瓊脂糖凝膠電泳法



核酸測序技術

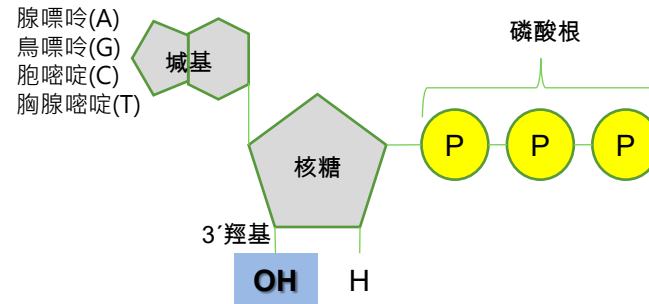
桑格測序 (Sanger sequencing)

- 也被稱作雙脫氧終止法

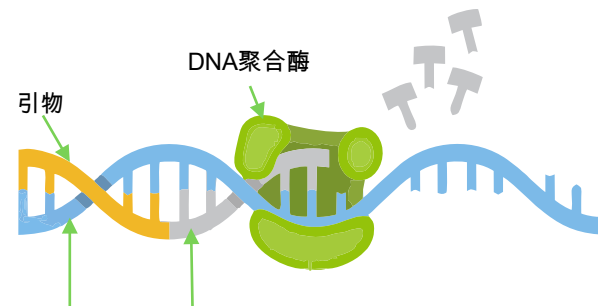
構建反應系統

- 目標DNA片段
- 反應體系緩沖液
- 使用單一引物
 - 樣本分別進行正向及反向引物分析
- DNA聚合酶
- dNTP/ddNTP 螢光混合物
 - dNTP 與 ddNTP 相對濃度的調節，使反應擴增得到一組長幾百至幾千城基的鏈終止產物

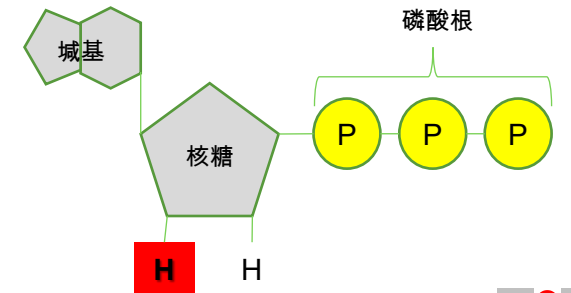
dNTP (去氧核糖核苷酸三磷酸 Deoxynucleoside triphosphate)



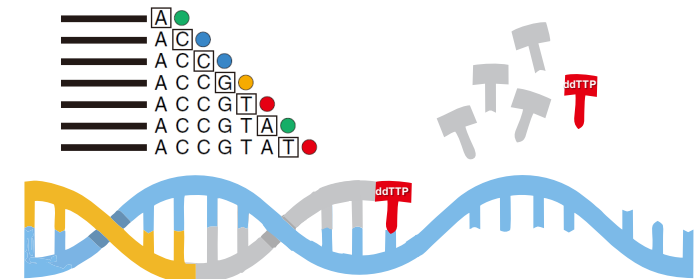
延申



ddNTP (雙脫氧核苷三磷酸 Dideoxy nucleoside triphosphate)



終止延申



當遇到ddNTP時，由於ddNTP缺乏延伸所需要的3-OH基團，使延長的寡聚核苷酸選擇性地在G、A、T或C處終止

測序與PCR的區別

PCR	測序
要兩條引物	只用一條引物
只要dNTP	需要dNTP和ddNTP
產物只有一條片段	產物是系列片段

核酸測序技術

桑格測序 (Sanger sequencing)

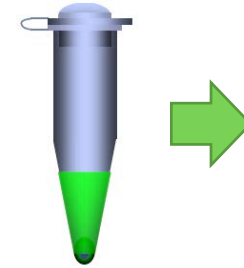
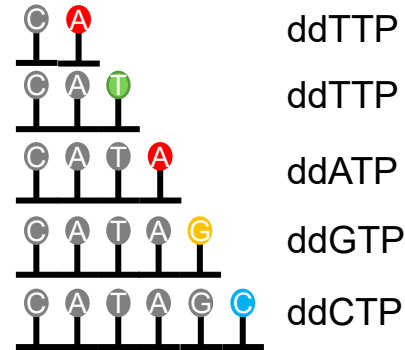
毛細管電泳法

- 測序PCR的產物是一系列長短不等的片段，片段之間依次只相差一個碱基
- 通過電泳，將測序產物按長短排列，根據螢光的顏色讀出每個片段的最後一個碱基，得到DNA序列

基因分析儀 - 毛細管電泳

原DNA序列

C A T A G C T G T T T C C T G N



因為ddNTP分別螢光標致了4個不同顏色，所以4種終止物可以在一起進行循環測序反應

毛細管陣列 (聚合物及電緩衝液)



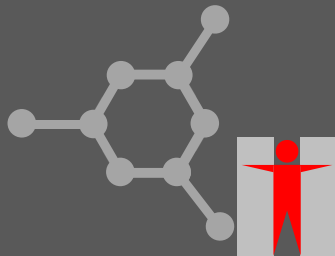
雷射光束

螢光探測器



方法介紹

- 方法步驟
- 品質控制
- 方法學考察

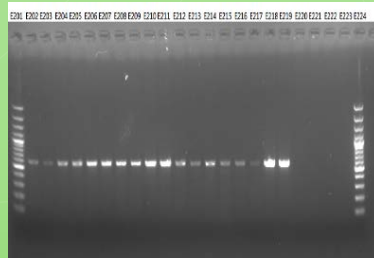


方法步驟



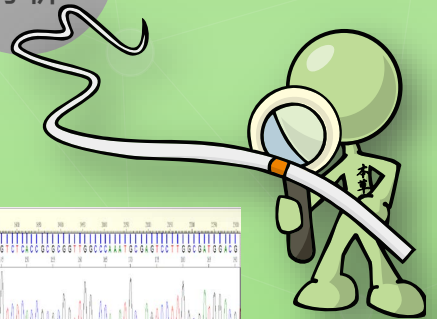
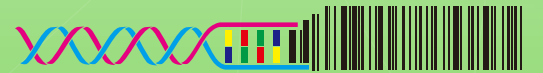
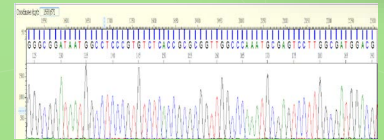
- 研磨

- 自動化DNA提取工作站
- 離心柱 DNA 提取法

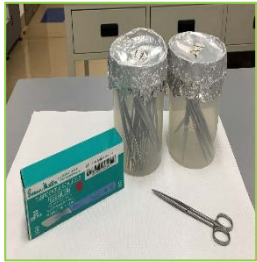


- PCR 擴增 3 個條形碼
- PCR 產物檢測
- PCR 產物純化

- DNA 循環測序反應
- DNA 測序產物純化
- 電泳純化 DNA 測序產物



儀器及設備



剪刀及鑷子



金屬研鉢和研杵



不銹鋼研磨器



球磨儀、研磨球、研磨管

試樣製備



離心機



恒溫混勻儀



自動化DNA提取工作站



紫外/可見光分光光度計

DNA提取



層流櫃

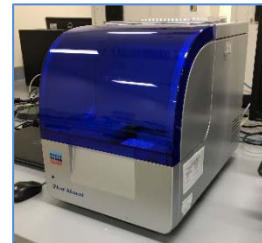


自動化液體處理工作站



PCR熱循環儀

PCR擴增



電泳系統



自動毛細管DNA遺傳分析儀

DNA測序



試劑及材料

電泳

自動化電泳儀:

DNA 高分辨率試劑盒, 50-800 bp DNA 標準物,
15 bp/1 kb DNA 比對標記物

傳統電泳儀:

TBE 緩衝液, 琼脂糖, 凝膠染色劑, 上樣緩衝液,
100 bp DNA 標準物

聚合酶鏈反應

Taq 聚合酶套裝, dNTPs 套裝, D – (+) – Trehalose dihydrate, 超純水

引物組合:

CP03F / CP03R, ITS2F / ITS3R,
psbAF / trnHR, rbcLaF / rbcLaR

DNA 提取

蛋白酶K, α -澱粉酶, 核糖核酸酶A

自動化液體處理工作站:

TopElute 液, QIAGEN QIASymphony DNA 提取套裝

離心柱 DNA 提取法:

GuSCN, NaCl, Tris-HCl, EDTA, Trizma base, Triton X-100,
Tween-20, HCl

PCR 產物純化

DNA 除雜和濃縮套裝, Tris-EDTA (TE) 緩衝液

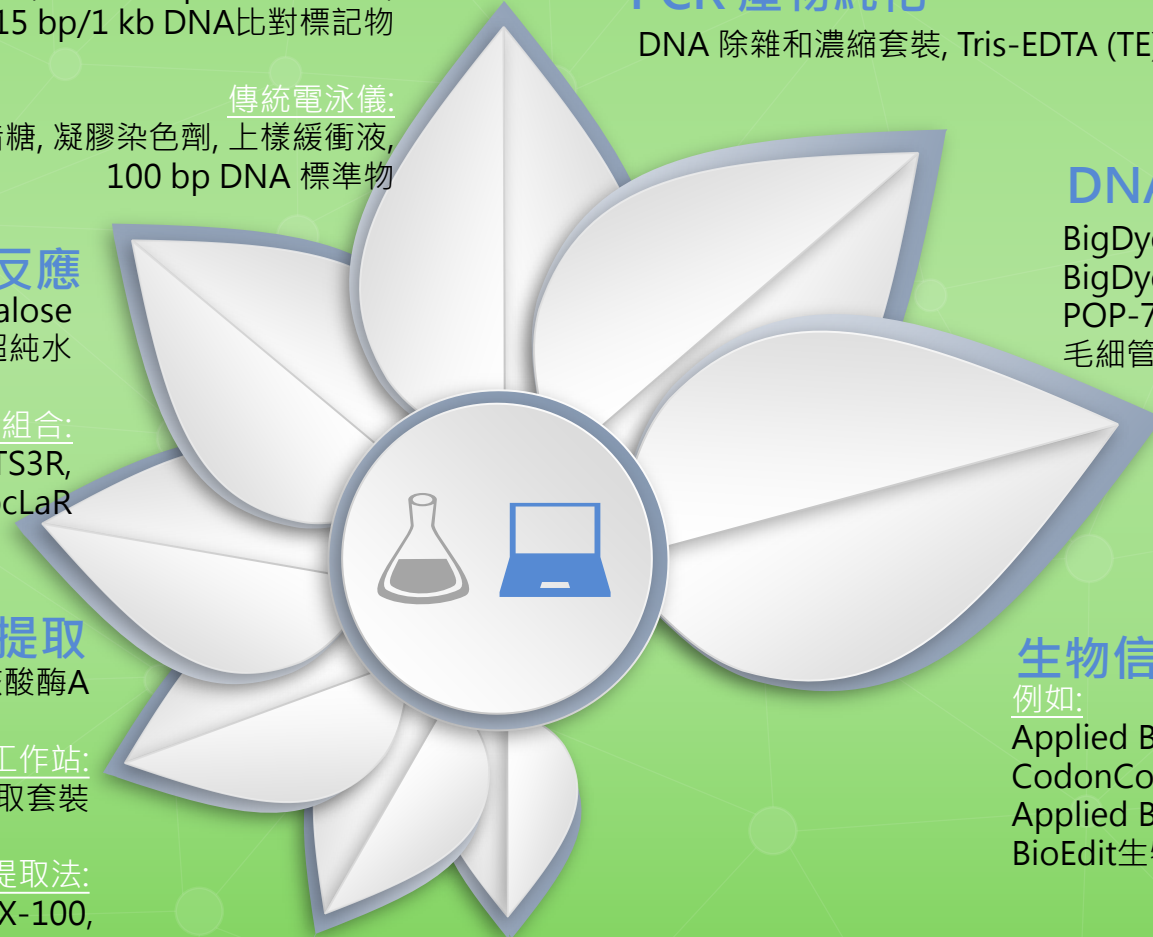
DNA 循環測序和電泳

BigDye® Terminator v3.1 循環測序試劑盒,
BigDye® XTerminator™ 純化試劑盒,
POP-7 聚合物 3500 系列或 3730xl 基因分析儀。
毛細管陣列, 緩衝液

生物信息學軟件

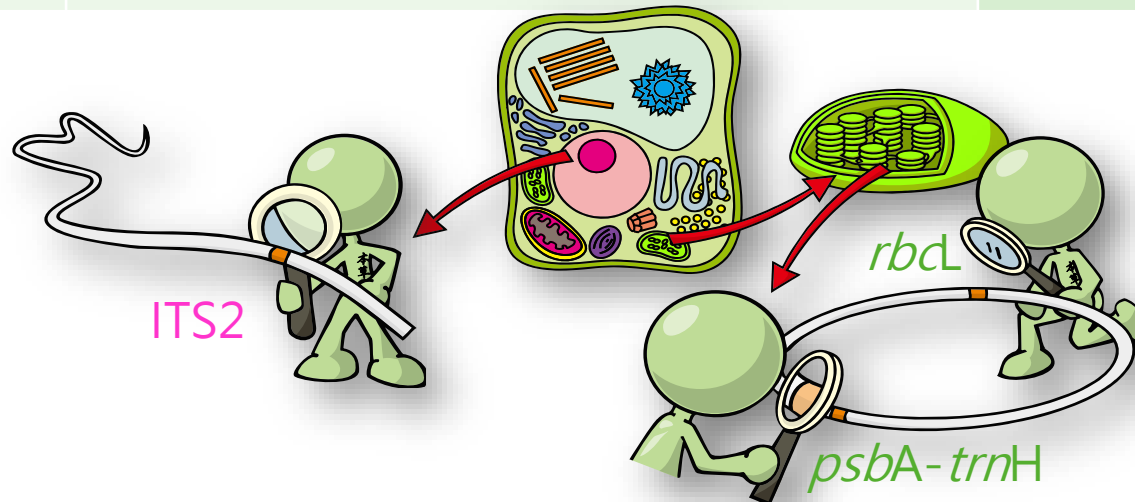
例如:

Applied Biosystems 測序分析軟件,
CodonCode Aligner,
Applied Biosystems 序列掃描儀軟件
BioEdit 生物序列排列編輯器



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
CP03F	正向	5' – CGG ACG AGA ATA AAG ATA GAG T – 3'	~ 123	植物葉綠體DNA片段
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'	~ 500	植物內部轉錄間隔區2 (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'	~ 500	葉綠體 <i>psbA-trnH</i> 基因間區(<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'	~ 600	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'		



操作流程 - 試樣製備



- 切出部分組織並放入消毒過的黃銅研鉢中，用杵研成粉末
- 或可用不銹鋼研磨器磨將組織磨碎成粉末
- 稱取約 100 mg 原材料粉末



操作流程 - DNA提取

樣本粉抹 → 樣品裂解液 → 恆溫混勻 → 分離溶液及組織



離心柱式DNA提取

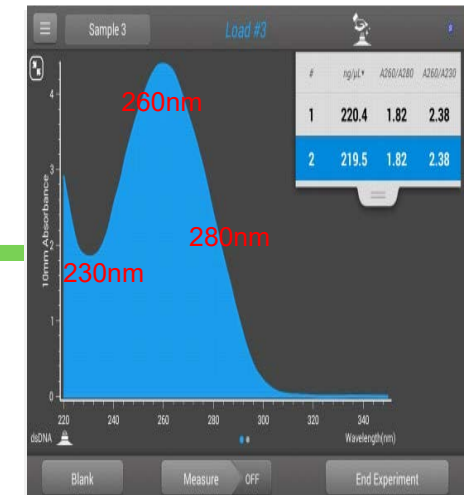
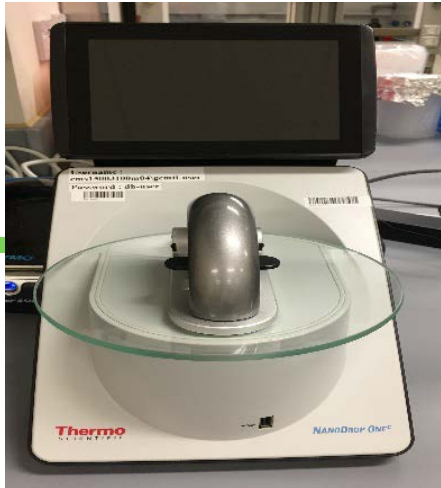
DNA 吸附 → 漂洗 → DNA 洗脫 → 純化 DNA

自動化DNA提取

珠子 吸附 → 漂洗 → 磁力 分離 → 純化 DNA

操作流程 - DNA提取

利用紫外-可見光分光光度計評估DNA提取物純度



波長 (nm)	吸光度最強的物質
215 - 230	常用緩衝液和溶劑
260	核酸
280	芳香族胺基酸

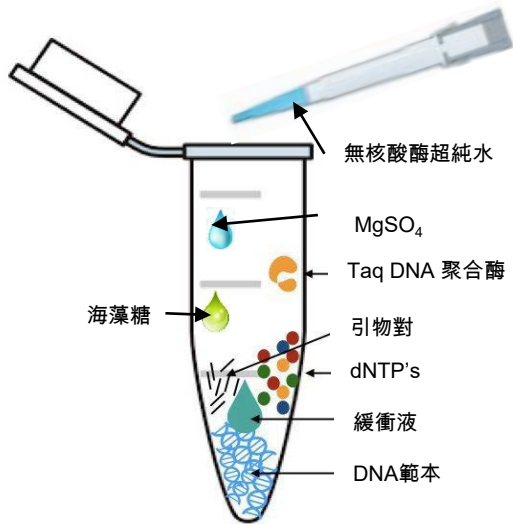
- DNA提取物純度
 - A260/A280
 - A260/A230
- DNA提取物濃度均一化至10 ng/μL



操作流程 - PCR擴增DNA條形碼

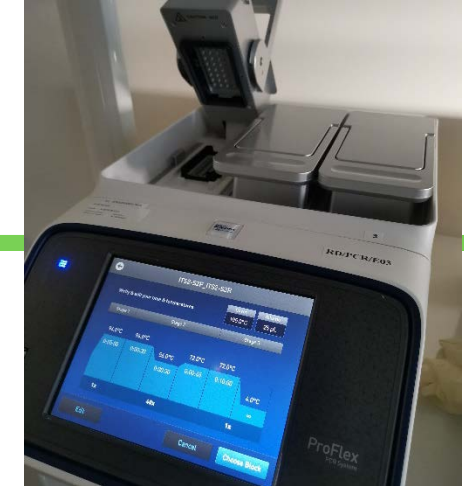
PCR試劑條件

試劑	目標DNA			
	植物葉綠體DNA片段 最終濃度	ITS2 最後濃度	psbA-trnH 最後濃度	rbcL 最後濃度
DNA範本	20 ng	30 ng	30 ng	30 ng
10X PCR緩衝液(不含Mg ²⁺)	1 X	1 X	1 X	1 X
50 mM MgSO ₄	1.5 mM	2.0 mM	2.0 mM	2.5 mM
5 mM dNTPs	0.2 mM @ dNTP	0.2 mM @ dNTP	0.2 mM @ dNTP	0.05 mM @ dNTP
10%海藻糖	-	-	-	5%
10 μM 正向引物	0.2 μM	0.1 μM	0.1 μM	0.1 μM
10 μM 反向引物	0.2 μM	0.1 μM	0.1 μM	0.1 μM
<i>Taq</i> DNA聚合酶 (5 U/μL)	0.625 U 對每次反應	1.0 U 對每次反應	1.0 U 對每次反應	0.6 U 對每次反應
無核酸酶超純水	加無菌超純水至25 μL	加無菌超純水至25 μL	加無菌超純水至25 μL	加無菌超純水至25 μL



操作流程 - PCR擴增DNA條形碼

PCR反應條件



植物葉綠體DNA片段

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

ITS2

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

psbA-trnH

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

rbcl

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



操作流程 - PCR 產物檢測

瓊脂糖凝膠電泳儀
自動化電泳儀



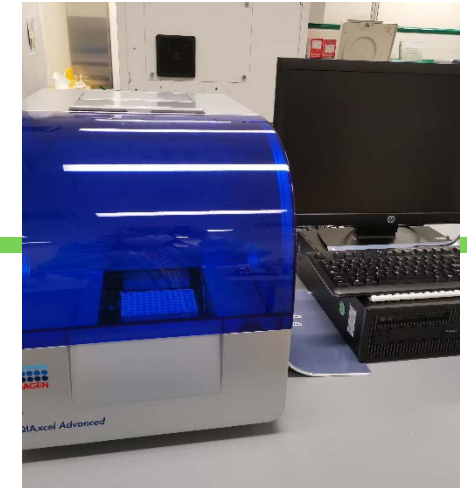
瓊脂糖凝膠電泳儀

- 2%瓊脂糖
- TBE緩沖液
- 凝膠染色劑
- 100 bp DNA 標準物
- 上樣量: 5 μ L PCR擴增物
- 凝膠成像系統



自動化電泳儀

- 憑借毛細管電泳 (CE) 高分辨、高靈敏地分離DNA 樣品
- 自動化電泳儀應用一次性的多功能卡夾可在1小時內分析多至96 個樣品
- 50-800 bp DNA分子大小標記
- 15 bp/1 kb DNA校正試劑



電泳檢測PCR產物 - 結果判定

電泳後通過螢光信號來判斷結果

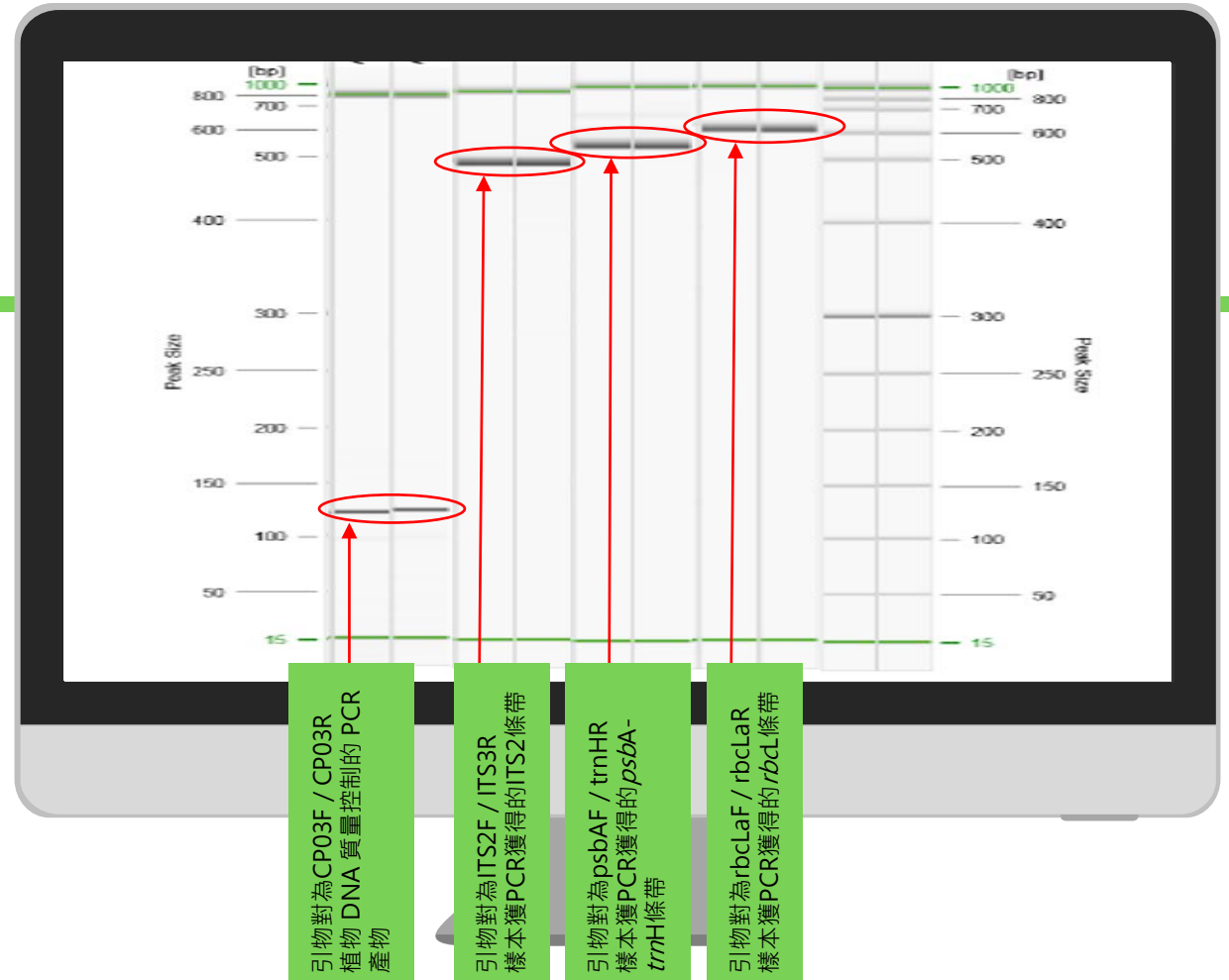
電泳檢測 PCR 產物的結果

用途	CP03F / CP03R 引物對	ITS2F / ITS3R 引物對	psbAF / trnHR 引物對	rbcLaF / rbcLaR 引物對	PCR 產物長 (bp)
植物葉綠體DNA片段測試 ^a	+				~123
ITS2測試 ^b		+			~500
<i>psbA-trnH</i> 測試 ^b			+		~500
<i>rbcL</i> 測試 ^b				+	~600

註解:

a = CP03F / CP03R 引物對用於檢查可擴增的植物 DNA。 "+" 表示PCR陽性結果，DNA條帶無需進行後續 DNA 序列分析。

b = "+" 表示檢測到的目標DNA條帶，其PCR產物需通過後續DNA序列分析作進排序。



操作流程 - 核酸測序

PCR純化
循環測序

PCR擴增

PCR純化

循環測序

測序純化

毛細管電泳

數據分析

DNA循環測序試劑條件

試劑	最終濃度
BigDye [®] Terminator v3.1 循環測序試劑	0.25X
BigDye 測序緩衝液	0.75X
正向或反向引物 (用於 PCR 的相同引物)	0.16 pmol/μL
純化PCR產物	約 25-35 ng
無核酸酶超純水	最終容量至 20 μL

DNA循環測序反應條件

溫度	時間	循環次數
96 °C	1 分鐘	1
96 °C	10 秒	25
50 °C	5 秒	
60 °C	4 分鐘	
4 °C	∞	--

- PCR 產物應進行雙向測序，即每一樣本分別進行正向及反向引物循環測序
- 基於雙向測序，每個 DNA 條形碼應獲得兩個電泳圖



操作流程 - 核酸測序

測序純化
毛細管電泳

PCR擴增

PCR純化

循環測序

測序純化

毛細管電泳

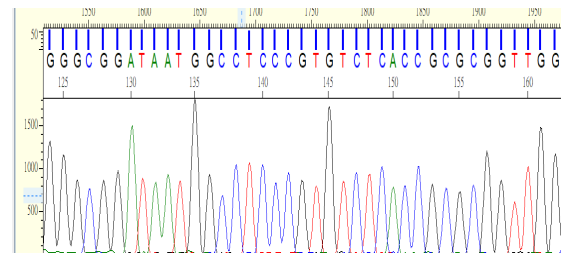
數據分析

測序反應純化

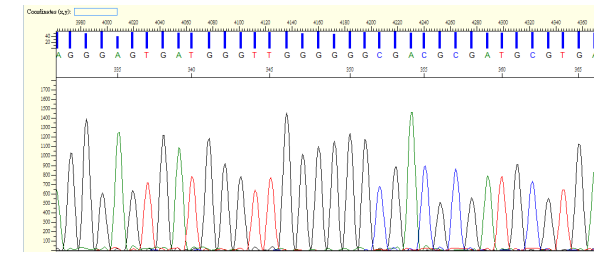
- 去除從測序反應後的殘留物 (未結合的終止子和鹽，還可以去除反應中的染料斑)，而避免信號強度下降及干擾
- 應使用適當純化試劑盒，按照試劑盒的建議，進行DNA 測序產物純化程式

電泳純化 DNA 測序產物

- 使用自動化毛細管電泳DNA測序儀，將純化DNA測序產物進行雙向測序分析，而獲取DNA條形碼的核苷酸序列



正向序列



反向序列



操作流程 - 測序後分析



使用適當的生物資訊學軟件，進行鹼基識別、修剪和編輯以處理測序原始數據和測序峰圖品質控制

例如：

Applied Biosystems (ABI) 測序分析軟件

CodonCode Aligner

Applied Biosystems (ABI) 序列掃描儀軟件

BioEdit生物序列排列編輯器

測序峰圖質量評估

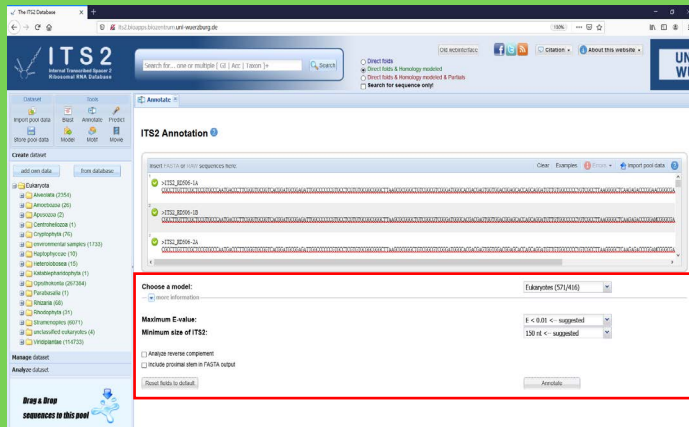


- 去除兩端低質序列
- 去除引物後峰圖的平均Q值需大於20
- 一般情況下,正反向測序峰圖應有足夠的重疊區域以獲得一致性序列
- 不一致城基的確定依據Q值的高低

標注 ITS2 序列



- 使用工具對一致性序列進行注釋
- 取得ITS2序列



<http://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de/>



參考DNA序列

https://www.cmro.gov.hk/html/b5/useful_information_gcmti/research/btc/DNA_sequences.html

Reference DNA Sequence
Plant Specimen

GCMTI FS-2020-1

Reference Detail

Description of reference material	Plant specimen
Scientific name	<i>Panax ginseng</i> C.A. Mey.
Laboratory number	RD93
Sample mark	RD93-A
Locality	Phung, Jian Province, China
Corresponding CMM	RD90
Authenticated	Yes

Image

人參
Panax ginseng

Reference DNA Sequence
Plant Specimen

GCMTI FS-2020-3

Reference Detail

Description of reference material	Plant specimen
Scientific name	<i>Panax quinquefolium</i> L.
Laboratory number	RD94
Sample mark	RD94-A
Locality	Huinan, Jian Province, China
Corresponding CMM	RD70
Authenticated	Yes

Image

西洋參
Panax quinquefolium

Reference DNA Sequence
Plant Specimen

GCMTI FS-2020-2

Reference Detail

Description of reference material	Plant specimen
Scientific name	<i>Panax notoginseng</i> (Burk.) F.H. Chen
Laboratory number	RD93
Sample mark	RD93-A
Locality	Wenlan, Yunnan Province, China
Corresponding CMM	RD24
Authenticated	Yes
Remarks	ITS2: 160V

Image

三七
Panax notoginseng

Reference DNA Sequence
Chinese Materia Medica (CMM)

GCMTI FS-2021-1

Reference Detail

Description of reference material	Radix Platycodi
Scientific name	<i>Platycodon grandiflorum</i> (Jacq.) A. DC.
Laboratory number	RD87
Sample mark	RD87-2A
Locality	Amn, Jian Province, China
Corresponding plant voucher specimen	RD59 and RD50
Authenticated	Yes

Image

桔梗
Platycodon grandiflorum



參考DNA序列

三七資料表

Fact sheet of reference DNA sequences of <i>Panax notoginseng</i> (三七)	
Summary	Information
Scientific name	<i>Panax notoginseng</i> (Burk.) F.H.Chen.
Type of reference material used for data generation	Radix <i>Notoginseng</i> (三七)
Plant voucher specimen (number of specimens / locality)	● 17 / Wenshen, Yunnan Province, China
Plant voucher specimen (number of specimens / locality)	● 2 / Yanshan, Yunnan Province, China
Total number of specimen	● 21
Specimen source	● GCMTI collection ● Hong Kong Chinese Materia Medica Standards (HKCMS) Project
Method for data generation	● GCMTI RD-5:2020
Length of DNA barcode	● Nuclear internal transcribed spacer 2 (ITS2) is 230 bp ● Chloroplast <i>psbA-trnH</i> intergenic spacer (<i>psbA-trnH</i>) is 490 bp ● Chloroplast ribulose biphosphate carboxylase large chain (<i>rbcL</i>) is 553 bp

GCMTI FS:2020-2

Reference DNA Sequence

Plant Specimen

DNA Information

Internal transcribed spacer 2 of nuclear ribosomal RNA (ITS2)
Batch ID: BI180918-2

RD103-A ITS2
CGCATCGGTCGCCCCCAACCCATATTCCTCCGCGGGAG
GTCGATCGCGAGGGGGGAGATATGGCCCTCGGTCTCA
CGTCGCGTTGGCCAAATGGAGCTCTTGGCGATGGAC
GTCAGCACAGGTGGTGGTAAAGAGCCCTTCCATG
TTCTGCGGGGACCGTTCGCGCAAGAAAGCTTCATAGCC
CTGTGCGCTGTCTCGATGGCGGCTCGAGCC

Remarks: observations at nucleotide positions 83, 175, 216

Chloroplast *psbA-trnH* intergenic spacer (*psbA-trnH*)
Batch ID: BI180918-2

RD103-A *psbA-trnH*
ATAATCTCCCTTAGACCTAGCTCGTGTGGAGCTCATT
TACAATAAGTAAAGAACCGGGCTTAGTGTATAGCAAGTTT
TTTAAATAAAGAGAGCAAAATCCCTTTTCTGTGTTTAA
CGAGGGGGGAGTATCGCTTTTATTAGGTAGATT
GACTTACTAGTTTTTTAAATAAATAAATAAATAAATAA
GAGAGCTGTTTTATTCTTCTGGTGTGCTATGGTGG
TATCATCTTCTGTTTATTAATTAATTAATTAATTAAT
AGTCACTCTCAACTTTATTTTGGAGAGGTGTTTT
TTAAAGAAATAATGTGGACTTTTATTAGTAAACT
TAATATTTTCTGAAATAGAAAGATAAGAAAGAA
ATAATGATGAATGGTAAATAATTAATTTTGAAGAGTAA
GGAAGAAAGTATAGTGGGGGGGGAGTGGCAAGTGG
TCAAGGCACT

Chloroplast ribulose biphosphate carboxylase large chain (*rbcL*)
Batch ID: BI180918-2

RD103-A *rbcL*
AAGTGTGGATTCAAAGCTGGTGTAAAGATTACAATTTG
ACTTATATCTCTACTGCTTATGCGCCCAAGATACTGTA
TCTTGG-AGCATTCGAGTAACTCTCACTTGGATTTCC
AAGTGAAGAGAGCGGGGGCGGGTGGCTCGGATTTCT
TACTGTCAATGCA-AGCTGTGTGGACCGAGACTTAC
AGCCTGTGATGTTTAAAGGGCGATCTACAAATAGAG
CGCTTCTGGAGAGAGCAATTAATTTCTGATGATG
CTTACCATTAGACCTTTTGAAGAGGTTTGTATTAG
CATTTTTTCAATTTAGAGTAAATATTTGGTTTAA
GCCCTGTGCTCTAGTGTGGAGGATTTGGAGTCTCT
TTGATTTGTTAAAGCTTTCAGAGCGGCTCTATGGCAT
CTAGTTTGGAGAGATAATTTGAG-AGTATGCTGCTC
CTGTGGGATGAT-TATTAAAC-TAATAGTGGGTTATCT
GCTAAAGACTAGTGGAGGGGGTATGATGATGCTTC

Reference Detail

Description of reference material	Plant specimen
Scientific name	<i>Panax notoginseng</i> (Burk.) F.H.Chen.
Laboratory number	RD103
Sample mark	RD103-A
Locality	Wenshen, Yunnan Province, China
Corresponding C/M/D	RD234
Authenticated	Yes
Remarks	ITS2: 83Y, 175Y, 216Y

Image

GCMTI FS:2020-2

Reference DNA Sequence

Chinese Materia Medica (CMM)

DNA Information

Internal transcribed spacer 2 of nuclear ribosomal RNA (ITS2)
Batch ID: BI190508

RD044-A ITS2
CGCATCGGTCGCCCCCAACCCATATTCCTCCGCGGGAG
GTCGATCGCGAGGGGGGAGATATGGCCCTCGGTCTCA
CGTCGCGTTGGCCAAATGGAGCTCTTGGCGATGGAC
GTCAGCACAGGTGGTGGTAAAGAGCCCTTCCATGTGTG
GTCGATCGCTGTCTCGATGGCGGCTCGAGCC

Remarks: observations at nucleotide positions 83, 175, 216

Chloroplast *psbA-trnH* intergenic spacer (*psbA-trnH*)
Batch ID: BI190508

RD244-2A *psbA-trnH*
ATAATCTCCCTTAGACCTAGCTCGTGTGGAGCTCATT
TACAATAAGTAAAGAACCGGGCTTAGTGTATAGCAAGTTT
TTTAAATAAAGAGAGCAAAATCCCTTTTCTGTGTTTAA
CGAGGGGGGAGTATCGCTTTTATTAGGTAGATT
GACTTACTAGTTTTTTAAATAAATAAATAAATAAATAA
GAGAGCTGTTTTATTCTTCTGGTGTGCTATGGTGG
TATCATCTTCTGTTTATTAATTAATTAATTAATTAAT
AGTCACTCTCAACTTTATTTTGGAGAGGTGTTTT
TTAAAGAAATAATGTGGACTTTTATTAGTAAACT
TAATATTTTCTGAAATAGAAAGATAAGAAAGAA
ATAATGATGAATGGTAAATAATTAATTTTGAAGAGTAA
GGAAGAAAGTATAGTGGGGGGGGAGTGGCAAGTGG
TCAAGGCACT

Chloroplast ribulose biphosphate carboxylase large chain (*rbcL*)
Batch ID: BI190508

RD244-2A *rbcL*
AAGTGTGGATTCAAAGCTGGTGTAAAGATTACAATTTG
ACTTATATCTCTACTGCTTATGCGCCCAAGATACTGTA
TCTTGG-AGCATTCGAGTAACTCTCACTTGGATTTCC
AAGTGAAGAGAGCGGGGGCGGGTGGCTCGGATTTCT
TACTGTCAATGCA-AGCTGTGTGGACCGAGACTTAC
AGCCTGTGATGTTTAAAGGGCGATCTACAAATAGAG
CGCTTCTGGAGAGAGCAATTAATTTCTGATGATG
CTTACCATTAGACCTTTTGAAGAGGTTTGTATTAG
CATTTTTTCAATTTAGAGTAAATATTTGGTTTAA
GCCCTGTGCTCTAGTGTGGAGGATTTGGAGTCTCT
TTGATTTGTTAAAGCTTTCAGAGCGGCTCTATGGCAT
CTAGTTTGGAGAGATAATTTGAG-AGTATGCTGCTC
CTGTGGGATGAT-TATTAAAC-TAATAGTGGGTTATCT
GCTAAAGACTAGTGGAGGGGGTATGATGATGCTTC

Reference Detail

Description of reference material	Radix <i>Notoginseng</i>
Scientific name	<i>Panax notoginseng</i> (Burk.) F.H.Chen.
Laboratory number	RD244
Sample mark	RD244-2A
Locality	Wenshen, Yunnan Province, China
Corresponding plant voucher specimen	RD234 and RD103
Authenticated	Yes

Image

Front view

Back view

GCMTI FS:2020-2

Reference DNA sequences in FASTA format

Internal transcribed spacer 2 of nuclear ribosomal RNA (ITS2) sequence of plant voucher specimen of *Panax notoginseng* and Chinese Materia Medica (CMM) *Notoginseng* Radix et Rhizoma

RD103-A ITS2
CGCATCGGTCGCCCCCAACCCATATTCCTCCGCGGGAG
GTCGATCGCGAGGGGGGAGATATGGCCCTCGGTCTCA
CGTCGCGTTGGCCAAATGGAGCTCTTGGCGATGGAC
GTCAGCACAGGTGGTGGTAAAGAGCCCTTCCATGTGTG
GTCGATCGCTGTCTCGATGGCGGCTCGAGCC

RD244-A ITS2
CGCATCGGTCGCCCCCAACCCATATTCCTCCGCGGGAG
GTCGATCGCGAGGGGGGAGATATGGCCCTCGGTCTCA
CGTCGCGTTGGCCAAATGGAGCTCTTGGCGATGGAC
GTCAGCACAGGTGGTGGTAAAGAGCCCTTCCATGTGTG
GTCGATCGCTGTCTCGATGGCGGCTCGAGCC

RD103-A ITS2
CGCATCGGTCGCCCCCAACCCATATTCCTCCGCGGGAG
GTCGATCGCGAGGGGGGAGATATGGCCCTCGGTCTCA
CGTCGCGTTGGCCAAATGGAGCTCTTGGCGATGGAC
GTCAGCACAGGTGGTGGTAAAGAGCCCTTCCATGTGTG
GTCGATCGCTGTCTCGATGGCGGCTCGAGCC

RD244-A ITS2
CGCATCGGTCGCCCCCAACCCATATTCCTCCGCGGGAG
GTCGATCGCGAGGGGGGAGATATGGCCCTCGGTCTCA
CGTCGCGTTGGCCAAATGGAGCTCTTGGCGATGGAC
GTCAGCACAGGTGGTGGTAAAGAGCCCTTCCATGTGTG
GTCGATCGCTGTCTCGATGGCGGCTCGAGCC

RD103-A ITS2
CGCATCGGTCGCCCCCAACCCATATTCCTCCGCGGGAG
GTCGATCGCGAGGGGGGAGATATGGCCCTCGGTCTCA
CGTCGCGTTGGCCAAATGGAGCTCTTGGCGATGGAC
GTCAGCACAGGTGGTGGTAAAGAGCCCTTCCATGTGTG
GTCGATCGCTGTCTCGATGGCGGCTCGAGCC

RD244-A ITS2
CGCATCGGTCGCCCCCAACCCATATTCCTCCGCGGGAG
GTCGATCGCGAGGGGGGAGATATGGCCCTCGGTCTCA
CGTCGCGTTGGCCAAATGGAGCTCTTGGCGATGGAC
GTCAGCACAGGTGGTGGTAAAGAGCCCTTCCATGTGTG
GTCGATCGCTGTCTCGATGGCGGCTCGAGCC

RD103-A ITS2
CGCATCGGTCGCCCCCAACCCATATTCCTCCGCGGGAG
GTCGATCGCGAGGGGGGAGATATGGCCCTCGGTCTCA
CGTCGCGTTGGCCAAATGGAGCTCTTGGCGATGGAC
GTCAGCACAGGTGGTGGTAAAGAGCCCTTCCATGTGTG
GTCGATCGCTGTCTCGATGGCGGCTCGAGCC

RD244-A ITS2
CGCATCGGTCGCCCCCAACCCATATTCCTCCGCGGGAG
GTCGATCGCGAGGGGGGAGATATGGCCCTCGGTCTCA
CGTCGCGTTGGCCAAATGGAGCTCTTGGCGATGGAC
GTCAGCACAGGTGGTGGTAAAGAGCCCTTCCATGTGTG
GTCGATCGCTGTCTCGATGGCGGCTCGAGCC

RD103-A ITS2
CGCATCGGTCGCCCCCAACCCATATTCCTCCGCGGGAG
GTCGATCGCGAGGGGGGAGATATGGCCCTCGGTCTCA
CGTCGCGTTGGCCAAATGGAGCTCTTGGCGATGGAC
GTCAGCACAGGTGGTGGTAAAGAGCCCTTCCATGTGTG
GTCGATCGCTGTCTCGATGGCGGCTCGAGCC

RD244-A ITS2
CGCATCGGTCGCCCCCAACCCATATTCCTCCGCGGGAG
GTCGATCGCGAGGGGGGAGATATGGCCCTCGGTCTCA
CGTCGCGTTGGCCAAATGGAGCTCTTGGCGATGGAC
GTCAGCACAGGTGGTGGTAAAGAGCCCTTCCATGTGTG
GTCGATCGCTGTCTCGATGGCGGCTCGAGCC

RD103-A ITS2
CGCATCGGTCGCCCCCAACCCATATTCCTCCGCGGGAG
GTCGATCGCGAGGGGGGAGATATGGCCCTCGGTCTCA
CGTCGCGTTGGCCAAATGGAGCTCTTGGCGATGGAC
GTCAGCACAGGTGGTGGTAAAGAGCCCTTCCATGTGTG
GTCGATCGCTGTCTCGATGGCGGCTCGAGCC

RD244-A ITS2
CGCATCGGTCGCCCCCAACCCATATTCCTCCGCGGGAG
GTCGATCGCGAGGGGGGAGATATGGCCCTCGGTCTCA
CGTCGCGTTGGCCAAATGGAGCTCTTGGCGATGGAC
GTCAGCACAGGTGGTGGTAAAGAGCCCTTCCATGTGTG
GTCGATCGCTGTCTCGATGGCGGCTCGAGCC

RD103-A ITS2
CGCATCGGTCGCCCCCAACCCATATTCCTCCGCGGGAG
GTCGATCGCGAGGGGGGAGATATGGCCCTCGGTCTCA
CGTCGCGTTGGCCAAATGGAGCTCTTGGCGATGGAC
GTCAGCACAGGTGGTGGTAAAGAGCCCTTCCATGTGTG
GTCGATCGCTGTCTCGATGGCGGCTCGAGCC

RD244-A ITS2
CGCATCGGTCGCCCCCAACCCATATTCCTCCGCGGGAG
GTCGATCGCGAGGGGGGAGATATGGCCCTCGGTCTCA
CGTCGCGTTGGCCAAATGGAGCTCTTGGCGATGGAC
GTCAGCACAGGTGGTGGTAAAGAGCCCTTCCATGTGTG
GTCGATCGCTGTCTCGATGGCGGCTCGAGCC

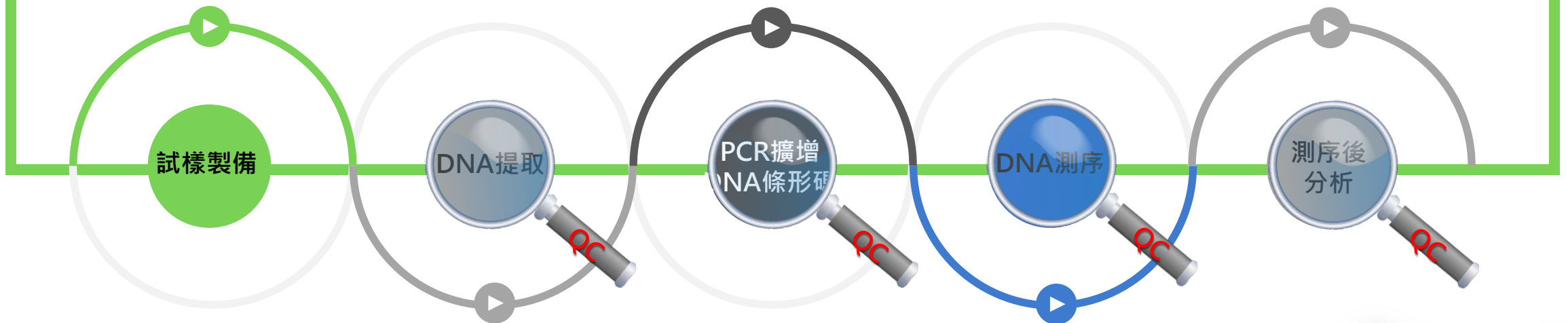
RD103-A ITS2
CGCATCGGTCGCCCCCAACCCATATTCCTCCGCGGGAG
GTCGATCGCGAGGGGGGAGATATGGCCCTCGGTCTCA
CGTCGCGTTGGCCAAATGGAGCTCTTGGCGATGGAC
GTCAGCACAGGTGGTGGTAAAGAGCCCTTCCATGTGTG
GTCGATCGCTGTCTCGATGGCGGCTCGAGCC

RD244-A ITS2
CGCATCGGTCGCCCCCAACCCATATTCCTCCGCGGGAG
GTCGATCGCGAGGGGGGAGATATGGCCCTCGGTCTCA
CGTCGCGTTGGCCAAATGGAGCTCTTGGCGATGGAC
GTCAGCACAGGTGGTGGTAAAGAGCCCTTCCATGTGTG
GTCGATCGCTGTCTCGATGGCGGCTCGAGCC



品質控制

檢查每次測試是否符合品質控制要求以確定測試結果的有效性

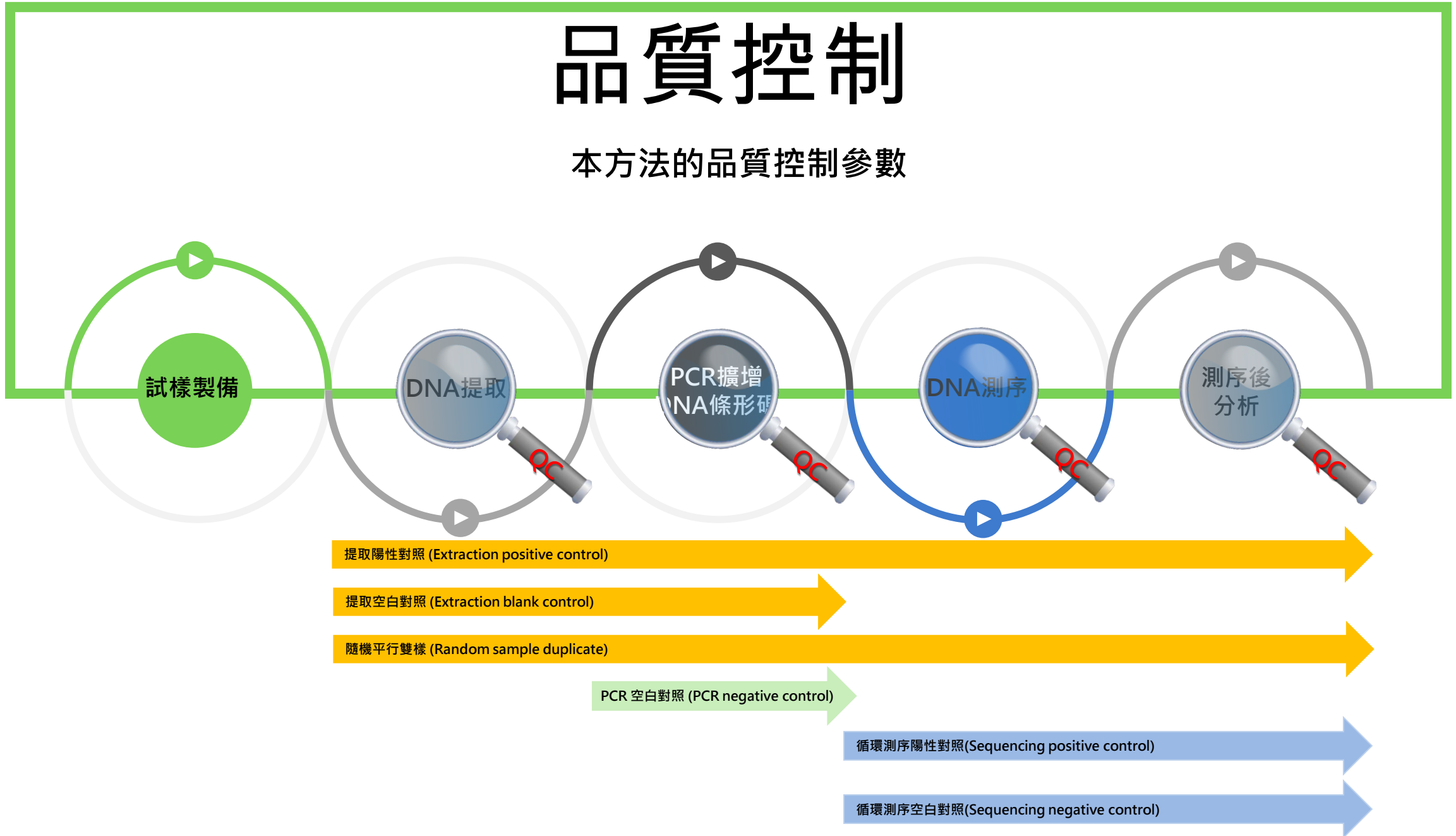


- 為確保測試方法在使用時能有足夠的監控, 在方法中必須加入適當質控程序
- 使用者應按能力去決定每批次可處理的供試品數量, 按方法規定實行系統質控計劃 (QC plan)



品質控制

本方法的品質控制參數



品質控制

本方法的品質控制參數



Random sample duplicate control

- 隨機重覆樣品與同一批次供試品一起進行測試
- 在整個分析過程中(從DNA提取、PCR分析到DNA測序)的結果應為一致

提取陽性對照 (Extraction positive control)

提取空白對照 (Extraction blank control)

隨機平行雙樣 (Random sample duplicate)



品質控制

本方法的品質控制參數



PCR 空白對照 (PCR negative control)

- 是PCR試管不加入任何樣品或對照品DNA範本
- 與同一批次供試品的DNA樣本一起進行PCR測試
- 反映PCR過程是否被污染
- 在名PCR系統中應獲得陰性結果，即電泳圖上無相應條帶

提取陽性對照 (Extraction positive control)

提取空白對照 (Extraction blank control)

隨機平行雙樣 (Random sample duplicate)

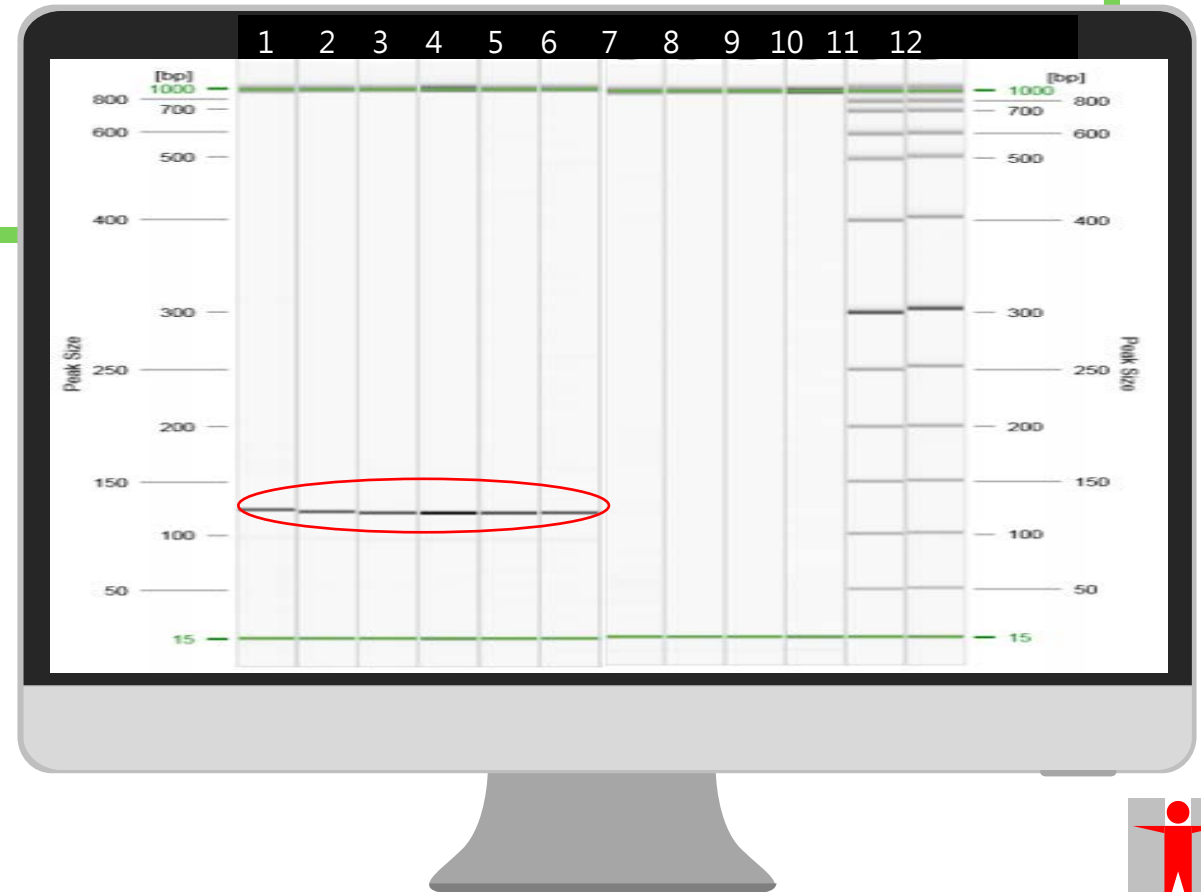
PCR 空白對照 (PCR negative control)



質控參數結果判定

電泳圖例子 - 植物葉綠體DNA片段測試

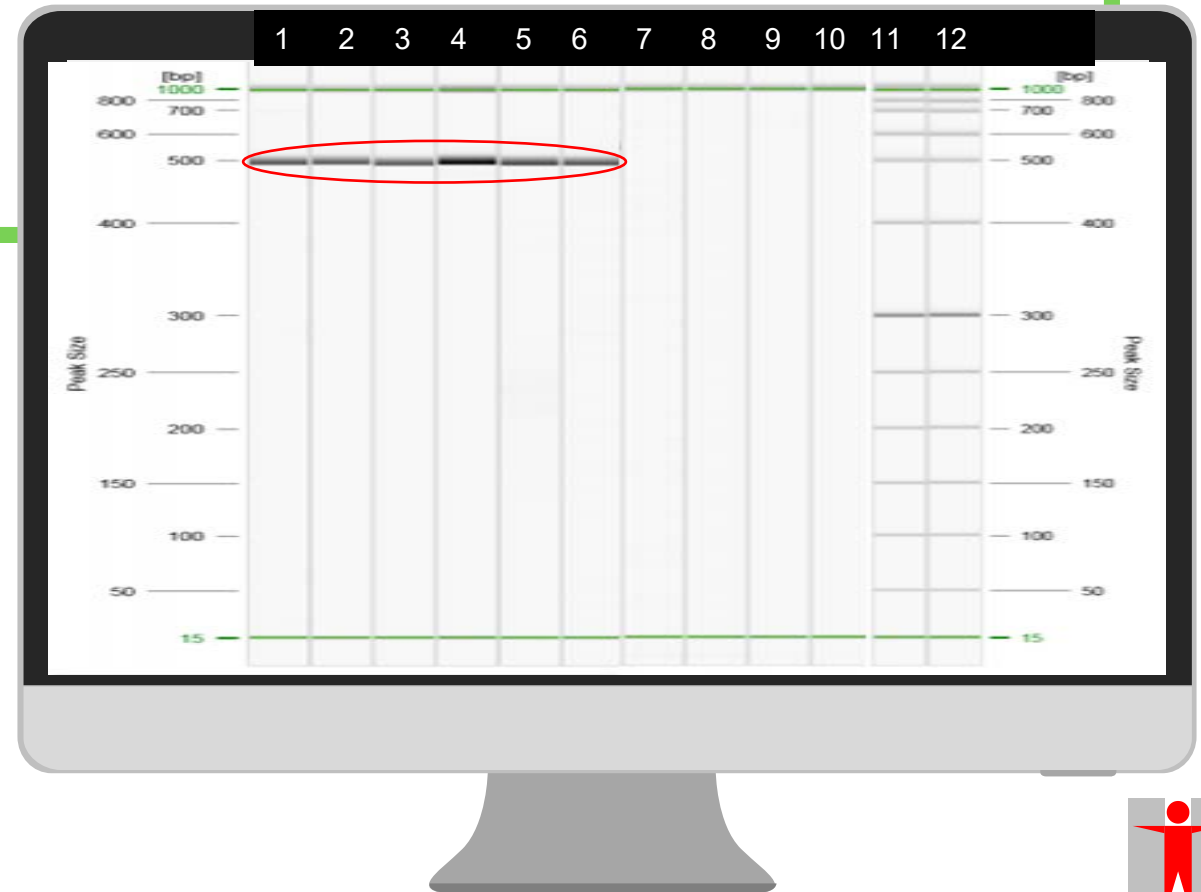
泳道編號	類型	結果 / 說明
1	樣本A	陽性結果 產生1條 ~ 123 bp 條帶
2	樣本A 的平行雙樣	
3	樣本B	
4	樣本B 的平行雙樣	
5	提取陽性對照	
6	提取陽性對照的平行雙樣	
7	提取空白對照	陰性結果 (無相應條帶)
8	提取空白對照的平行雙樣	
9	PCR 空白對照	
10	PCR 空白對照的平行雙樣	
11	DNA分子大小標記	比對測定 PCR 產物的片段大小
12	DNA分子大小標記	



質控參數結果判定

電泳圖例子 - ITS2 DNA 條形碼

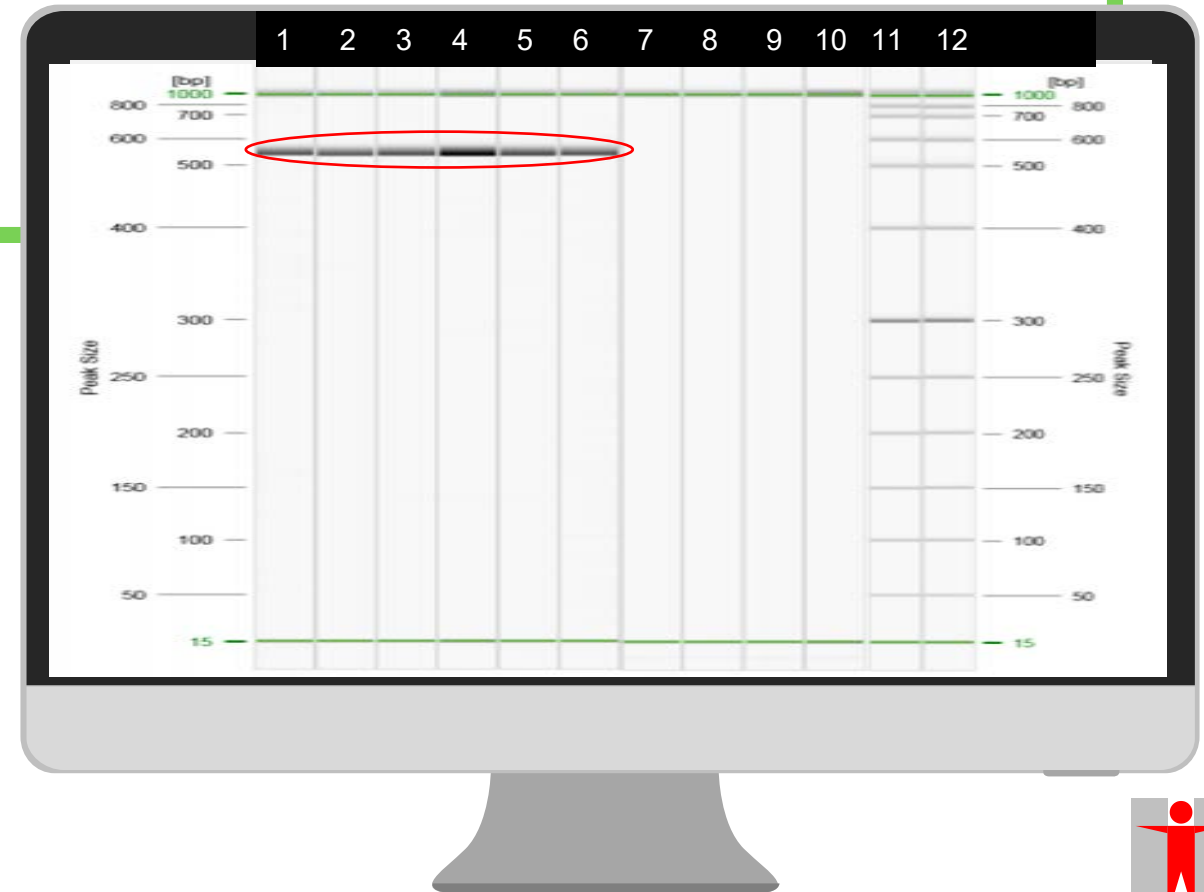
泳道編號	類型	結果 / 說明
1	樣本A	陽性結果 產生1條 ~ 500 bp 條帶
2	樣本A 的平行雙樣	
3	樣本B	
4	樣本B 的平行雙樣	
5	提取陽性對照	
6	提取陽性對照的平行雙樣	
7	提取空白對照	陰性結果 (無相應條帶)
8	提取空白對照的平行雙樣	
9	PCR 空白對照	
10	PCR 空白對照的平行雙樣	
11	DNA分子大小標記	比對測定 PCR 產物的片段大小
12	DNA分子大小標記	



質控參數結果判定

電泳圖例子 - *psbA-trnH* DNA 條形碼

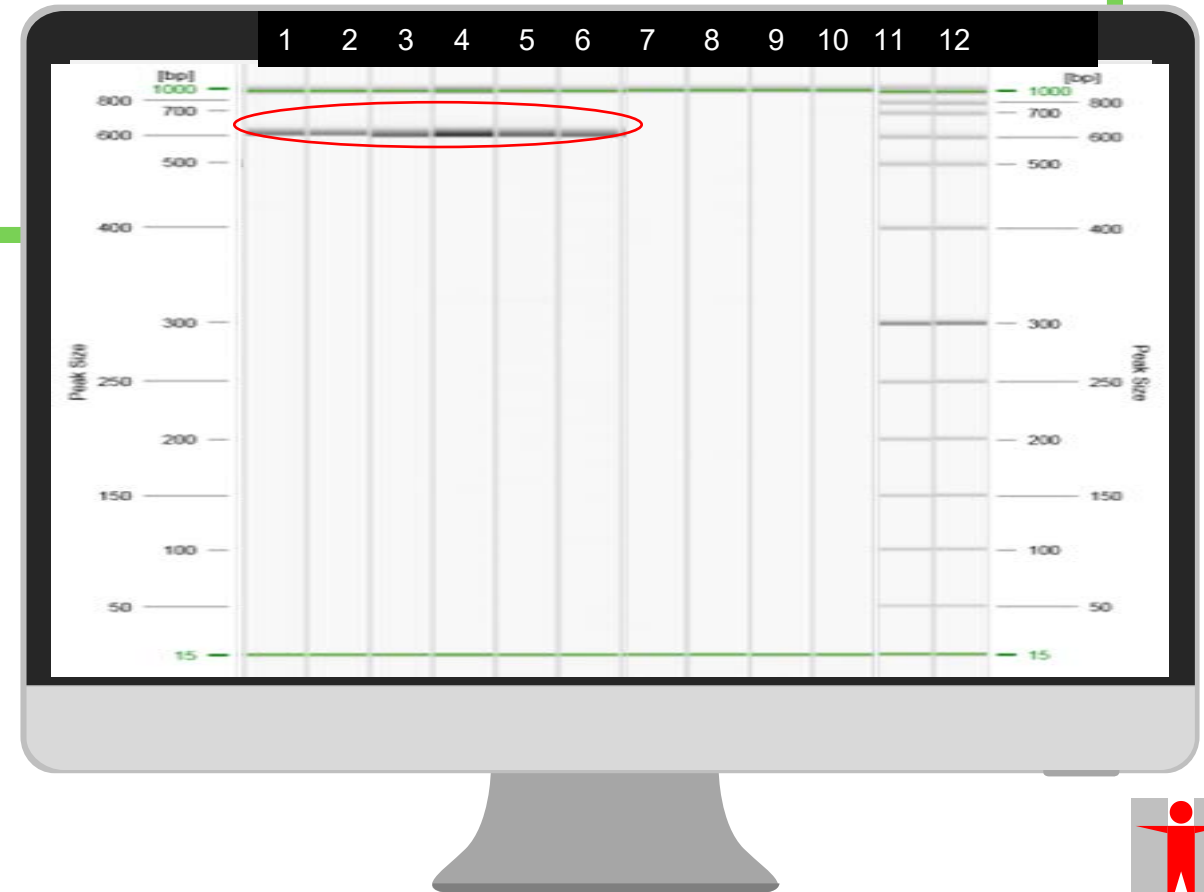
泳道編號	類型	結果 / 說明
1	樣本A	陽性結果 產生1條 ~ 500 bp 條帶
2	樣本A 的平行雙樣	
3	樣本B	
4	樣本B 的平行雙樣	
5	提取陽性對照	
6	提取陽性對照的平行雙樣	
7	提取空白對照	陰性結果 (無相應條帶)
8	提取空白對照的平行雙樣	
9	PCR 空白對照	
10	PCR 空白對照的平行雙樣	
11	DNA分子大小標記	比對測定 PCR 產物的片段大小
12	DNA分子大小標記	



質控參數結果判定

電泳圖例子 - *rbcL* DNA 條形碼

泳道編號	類型	結果 / 說明
1	樣本A	陽性結果 產生1條 ~ 600 bp 條帶
2	樣本A 的平行雙樣	
3	樣本B	
4	樣本B 的平行雙樣	
5	提取陽性對照	陰性結果 (無相應條帶)
6	提取陽性對照的平行雙樣	
7	提取空白對照	
8	提取空白對照的平行雙樣	
9	PCR 空白對照	比對測定 PCR 產物的片段大小
10	PCR 空白對照的平行雙樣	
11	DNA分子大小標記	
12	DNA分子大小標記	



品質控制

本方法的品質控制參數



循環測序空白對照(Sequencing negative control)

- 是PCR試管不加入任何純化PCR產物樣本
- 與同一批次供試品的純化PCR產物樣本一起進行循環測序反應
- 反映循環測序過程是否被污染
- 在DNA序列分析中，獲得無信號的原始測序數據

提取陽性對照 (Extraction positive control)

提取空白對照 (Extraction blank control)

隨機平行雙樣 (Random sample duplicate)

PCR 空白對照 (PCR negative control)

循環測序陽性對照(Sequencing positive control)

循環測序空白對照(Sequencing negative control)



方法學考察

- CP2020

9107 中藥材DNA 條碼分子鑒定法 指導原則

- HOKLAS SC-43

"Chinese Medicine" and "Food" - Species Identification by DNA Sequencing for Authentication Purpose

9107 中藥材 DNA 条形码分子 鉴定法指导原则

本法用于中药材(包括药材及部分饮片)及基原物种的鉴定。

DNA 条形码分子鉴定法是利用基因组中一段公认的、相对较短的 DNA 序列来进行物种鉴定的一种分子生物学技术,是传统形态鉴别方法的有效补充。由于不同物种的 DNA 序列是由腺嘌呤(A)、鸟嘌呤(G)、胞嘧啶(C)、胸腺嘧啶(T)四种碱基以不同顺序排列组成,

DNA 片段序列进行分析即能够区分不同物种。

中药材 DNA 条形码分子鉴定通常是以二内部转录间隔区(ITS2)[●]为主体条形码的方法体系,其中植物类中药材选用 ITS 序列,以叶绿体 *psbA-trnH*[●]为辅助序列,药用细菌色素 C 氧化酶亚基 *ICOD*[●]为主体辅助序列。

三、方法学验证

应符合《中国药典》四部“指导原则 9101”相关要求。

1. 影响因素考察

考察 DNA 条形码分子鉴定法的影响因素,包括 DNA 提取(样品量、水浴温度和水浴时间)、PCR 条件(变性时间、退火温度与时间及延伸时间)和产物纯化(考察不同纯化试剂盒),保证实验方法的准确性。

2. 方法适用性考察

采用 DNA 条形码分子鉴定法对 20 批次以上药材或基原物种进行测定,积累数据,确定种内序列变异大小,保证该测定方法的适用性。

3. 基原物种对比验证

以分类学家确认的基原物种叶片为对象,采用该方法获得 DNA 条形码数据,与相应药材产生的 DNA 条形码数据进行对比,避免内生真菌等污染,保证结果准确性。

HOKLAS SC-43
Issue No. 4
Issue Date: 19 February 2021
Implementation Date: 19 February 2021
Page 1 of 14

HOKLAS Supplementary Criteria No. 43

'Chinese Medicine' and 'Food' - Species Identification by DNA Sequencing for Authentication Purpose

1 INTRODUCTION

- This document serves to clarify and supplement the requirements of ISO/IEC 17025:2017 and HKAS Policy Document No. 1 for the accreditation of species identification by DNA sequencing. Applicant laboratories shall operate under a management system complying with ISO/IEC 17025:2017 and HKAS Policy Document No. 1.
- For the purpose of authentication, it is often necessary to identify the species from which food or Chinese materia medica (CMM) sample originates. Owing to the nature of this technique, the scope of accreditation for authentication purpose is restricted to food and CMM that are composed of the whole or a part of the body of a single organism. Food and CMM samples shall either be unprocessed or have only been subjected to processing that does not introduce contaminating DNA from other species. Laboratories using this method for authentication purpose shall be fully aware of these limitations. Laboratories shall obtain information such as the type and degree of processing of received samples from customers to determine the applicability of this technique to species authentication.
- For areas not covered in this document, ISO/IEC 17025:2017, HKAS Policy Document No. 1, HKAS 002 and other relevant supplementary criteria documents shall apply.
- Laboratories should also note that fulfilling the requirements in this document might not necessarily meet all the requirements of all test standards. Individual test standards may have specific requirements, which shall be met when conducting the tests.

香港實驗所認可計劃(HOKLAS)
補充準則

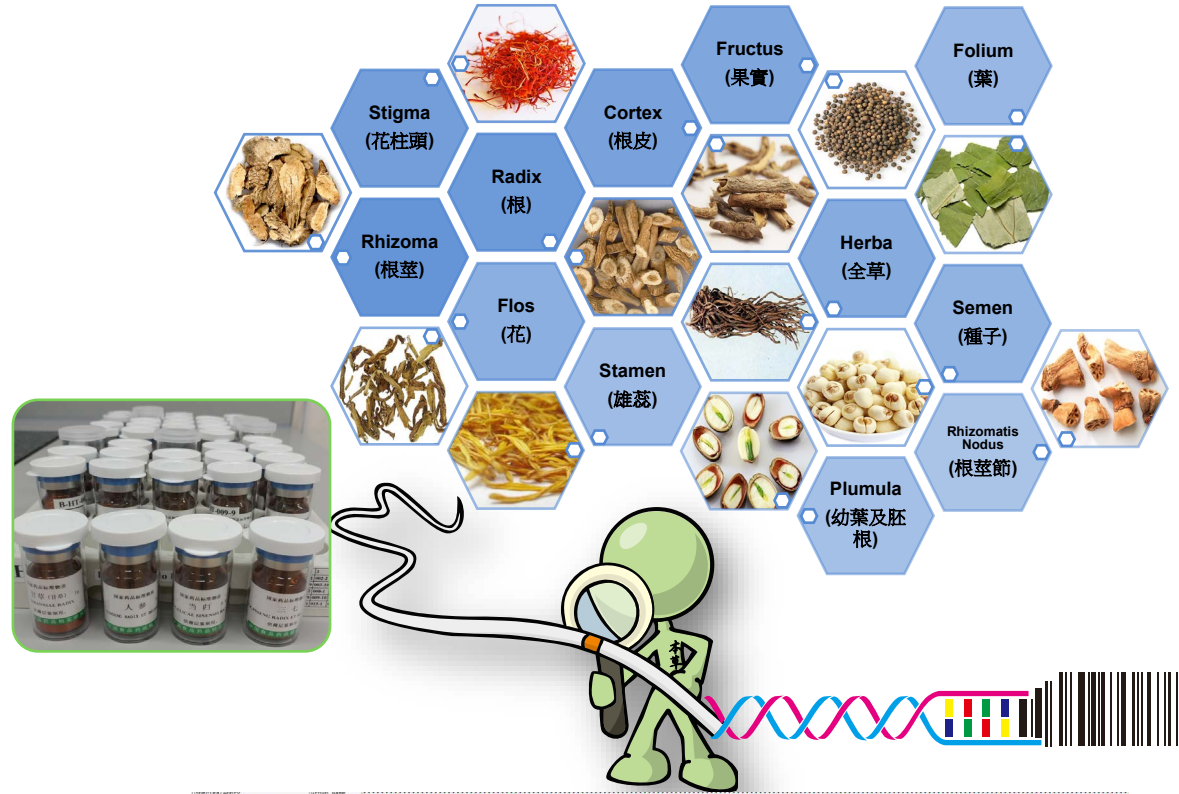


方法學考察

材料

- 24不同藥用部位的對照中藥材粉末(NIFDC)
- 臘葉標本、經鑒別中藥材樣本
- 市售樣本(原藥材)

本方法適用於未經處理或經中度處理的中藥材
單一來源的原藥材或藥材粉末均可



Sample ID	Sample Name	Barcode
1	Panax ginseng (from Chen Zi)	[Barcode]
2	RD00-A	[Barcode]
3	RD00-B	[Barcode]
4	RD00-C	[Barcode]
5	RD00-D	[Barcode]
6	RD00-E	[Barcode]
7	RD00-F	[Barcode]
8	RD00-G	[Barcode]
9	RD00-H	[Barcode]
10	RD00-I	[Barcode]
11	RD00-J	[Barcode]
12	RD00-K	[Barcode]
13	RD00-L	[Barcode]
14	RD00-M	[Barcode]
15	RD00-N	[Barcode]
16	RD00-O	[Barcode]
17	RD00-P	[Barcode]
18	RD00-Q	[Barcode]
19	RD00-R	[Barcode]
20	RD00-S	[Barcode]
21	RD00-T	[Barcode]
22	RD00-U	[Barcode]
23	RD00-V	[Barcode]
24	RD00-W	[Barcode]
25	RD00-X	[Barcode]
26	RD00-Y	[Barcode]
27	RD00-Z	[Barcode]
28	RD00-AA	[Barcode]
29	RD00-AB	[Barcode]
30	RD00-AC	[Barcode]
31	RD00-AD	[Barcode]
32	RD00-AE	[Barcode]
33	RD00-AF	[Barcode]
34	RD00-AG	[Barcode]
35	RD00-AH	[Barcode]
36	RD00-AI	[Barcode]
37	RD00-AJ	[Barcode]
38	RD00-AK	[Barcode]
39	RD00-AL	[Barcode]
40	RD00-AM	[Barcode]
41	RD00-AN	[Barcode]
42	RD00-AO	[Barcode]
43	RD00-AP	[Barcode]



方法學考察

比較3種不同原理的DNA提取法

- DNA質量
- 植物葉綠體DNA片段測試
- 擴增DNA條型碼(PCR成功率 – ITS2)

	自動化DNA提取法 (磁珠提取DNA)	離心柱式DNA提取法 (柱子及無機溶劑提取DNA)	DNA提取試劑盒 (柱子及有機溶劑提取DNA)
紫外分光光度計檢測DNA質量	<ul style="list-style-type: none"> • DNA回收率範圍: 0.7-60μg/ 50 mg 葯材粉末 <ul style="list-style-type: none"> • 最低: 胡椒 • 最高: 蓮子心 • 整體回收率較佳 • OD260/280: 1.3-1.8 	<ul style="list-style-type: none"> • DNA回收率範圍: 0.3-36μg /50 mg 葯材粉末 <ul style="list-style-type: none"> • 最低: 胡椒 • 最高: 荷葉 • 整體回收率較佳 • OD260/280: 1.0-1.9 	<ul style="list-style-type: none"> • DNA回收率範圍: 0.3-16μg /50 mg 葯材粉末 <ul style="list-style-type: none"> • 最低: 胡椒 • 最高: 荷葉 • 整體回收率一般 • OD260/280: 1.4-1.9
植物葉綠體DNA片段測試	陽性結果 (全部樣品提取到滿足後續實驗要求的範本DNA)	陽性結果 (全部樣品提取到滿足後續實驗要求的範本DNA)	陽性結果 (全部樣品提取到滿足後續實驗要求的範本DNA)
DNA條形碼的檢測 (PCR成功率 – ITS2)	全部樣本可得ITS2條帶 <ul style="list-style-type: none"> • DNA條帶訊號較強 	全部樣本可得ITS2條帶 <ul style="list-style-type: none"> • 當中少部分樣本需要稀釋才可獲得條帶 • 有較多樣品產生單一DNA條帶 	全部樣本可得ITS2條帶 <ul style="list-style-type: none"> • 當中少部分樣本需要稀釋才可獲得條帶 • DNA條帶訊號較弱



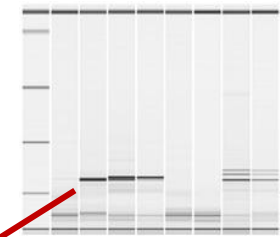
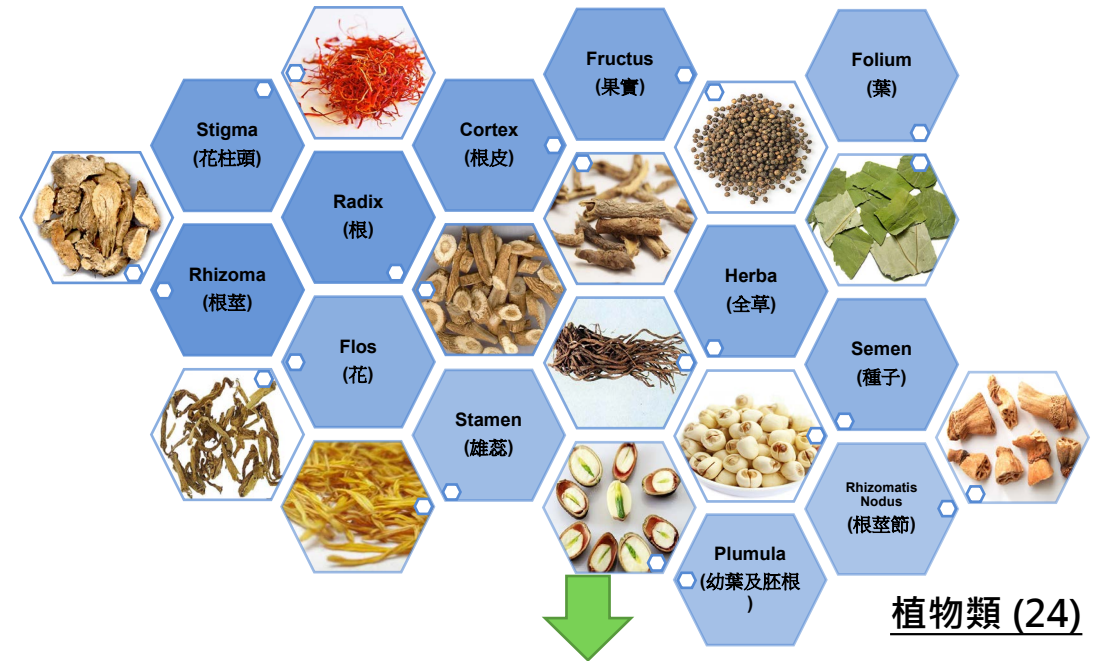
方法學考察

PCR優化考慮

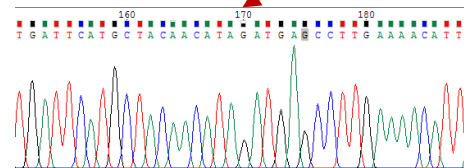
- 不同 [Mg²⁺] 濃度
- 添加增效劑, 例如海藻糖(Trehalose), BSA, DMSO
- 熱循環範圍值: 35-40個

PCR條件可達致

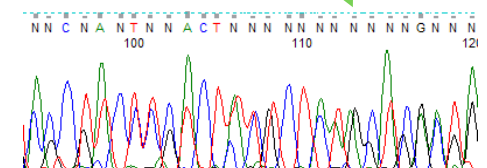
1. 產生單一DNA條帶並有足夠擴增物進行後續DNA序列分析
2. 提高PCR專一性從而減低干擾DNA條帶的產生(不適用已被外DNA污染的樣本)



單一DNA條帶



含有干擾DNA條帶



方法學考察

檢測限度

- 使用離心柱式DNA提取法及自動化DNA提取法得出DNA

	引物組合	檢測限度
1	ITS2-2F/ ITS2-3R	3 ng 模板DNA
2	psbAF/ trnHR	30 ng 模板DNA
3	rbcLaF/ rbcLaR	3 ng 模板DNA
4	CP 03-F / CP 03-R	20 pg 模板DNA



方法學考察

實驗室間比對驗證

- 實驗結果在不同實驗室能夠重現，相同樣品在不同實驗室獲得DNA條形碼序列應為相同

離心柱式DNA提取法

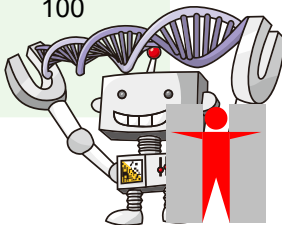
Lab	Test samples	Result	Number of satisfactory DNA barcode results	Total number of DNA barcode results received	Satisfactory %
1	RD333, RD334 and RD335	100% Percent sequence identity against reference	9	9	100
2	RD339, RD340 and RD341	100% Percent sequence identity against reference	9	9	100

* One laboratory (Lab 3) submitted satisfactory results using only the manual DNA extraction methods after the due date because of the 2019 novel coronavirus disease (COVID-19) outbreak threatened in China.

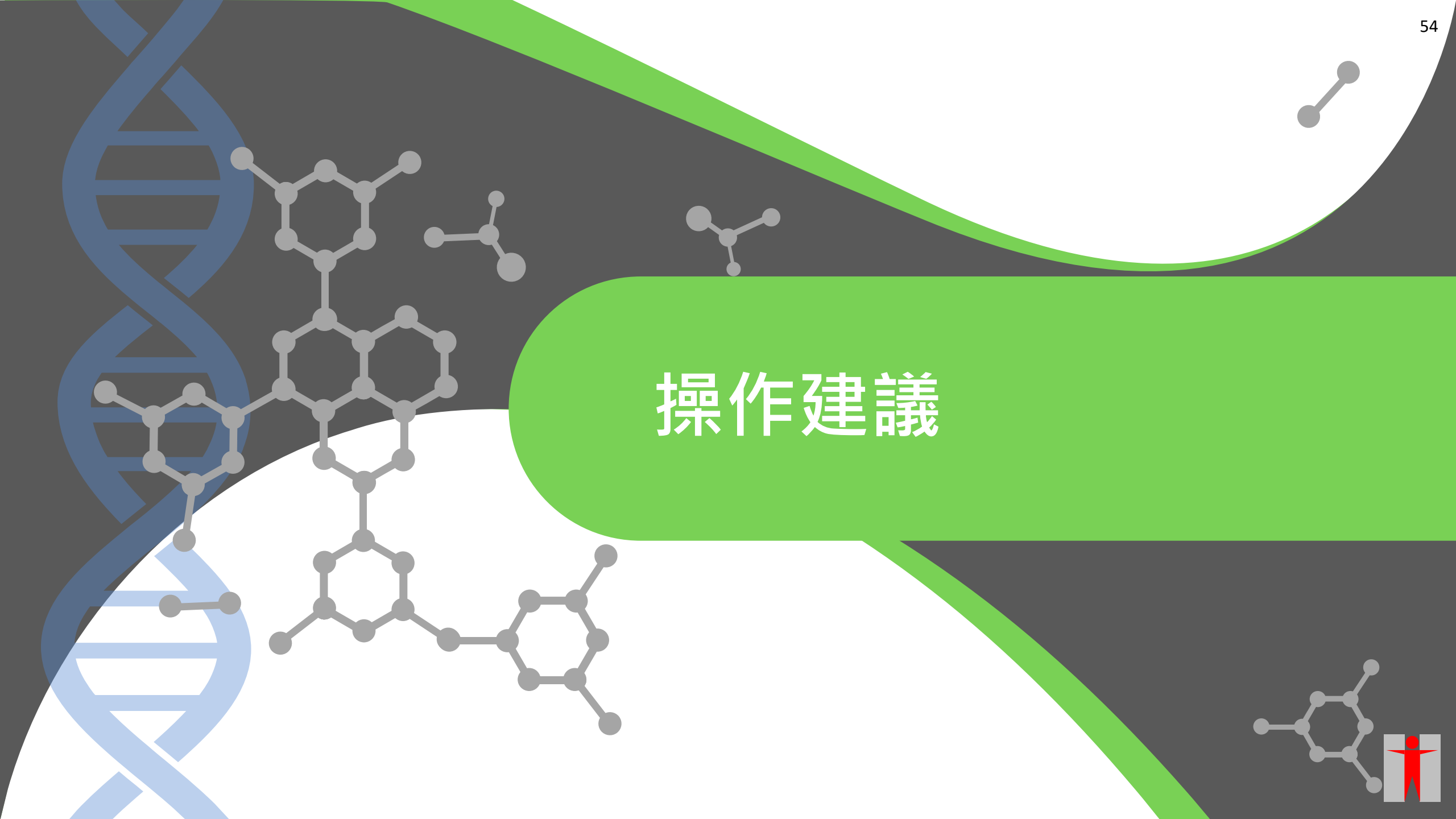


自動化DNA提取法

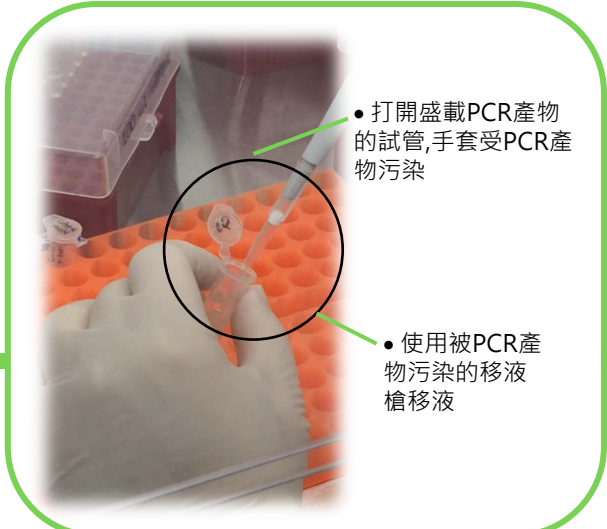
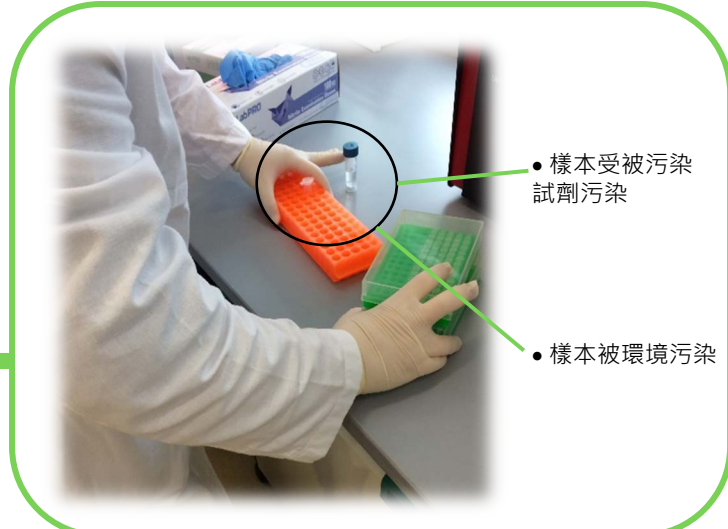
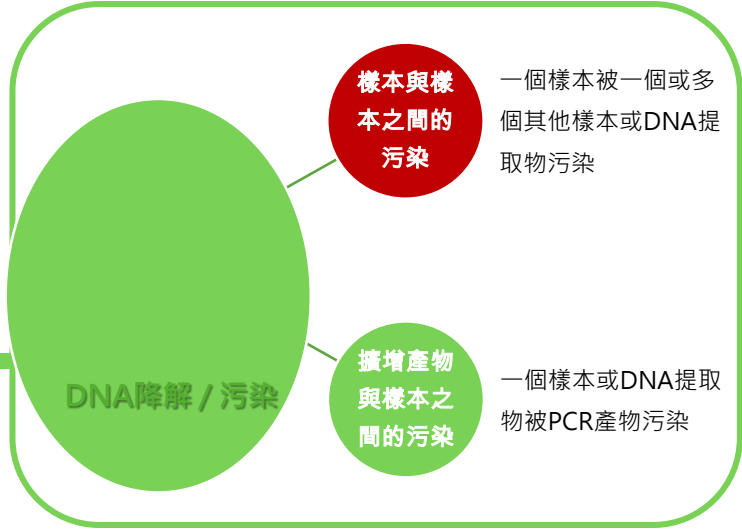
Lab	Test samples	Result	Number of satisfactory DNA barcode results	Total number of DNA barcode results received	Satisfactory %
1	RD336, RD337 and RD338	100% Percent sequence identity against reference	9	9	100
2	RD342, RD343 and RD344	100% Percent sequence identity against reference	9	9	100



操作建議



DNA檢測的考慮



污染來源

- 樣本交叉污染
- PCR擴增產物污染
- 樣本被環境污染
- 試劑被污染

污染途徑

PCR產物污染

- 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產物的試管
 - 移液槍移液



操作流程



- 根據所進行的測試，將實驗室操作環境明確區分成前PCR擴增區域和後PCR擴增區域
- 採用"單向流程"的原則處理樣品，從前PCR擴增區域到後PCR擴增區域



實驗室環境

最理想的情況下，不同功能的工作區域劃分在獨立工作室



試劑儲存和準備區



樣本製備區



核酸提取區



擴增區



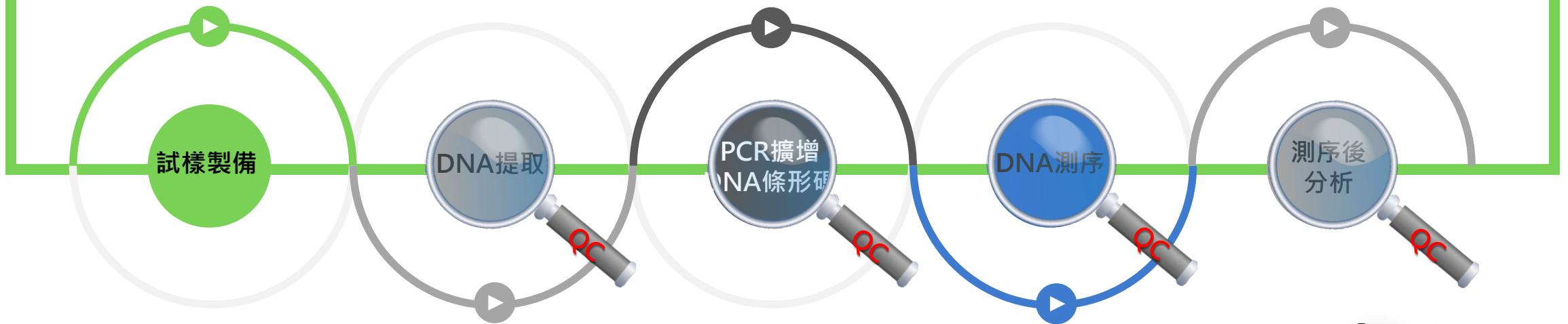
擴增產物分析區

- 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

使用方法的品質控制參數監測污染



- 提取陽性對照 (Extraction positive control)
- 提取空白對照 (Extraction blank control)
- PCR 空白對照 (PCR negative control)



防止污染措施

樣本、對照物應與試劑的存放



樣本



對照物



試劑盒



分裝試劑



測試中間產物

- 樣本、對照物應與試劑應該分開存放，並事先用適當的消毒劑將儲存容器表面進行擦拭消毒
- 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
- 應保持相關的儲存條件（如冷凍室/冷藏室/乾燥器），以防止儲存物品的降解



防止污染措施

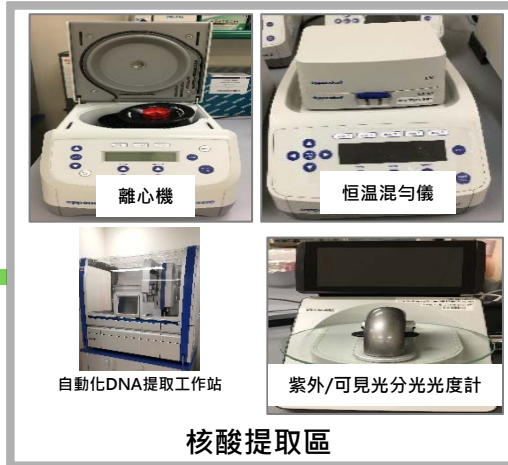
儀器及設備的位置

前PCR擴增區域

後PCR擴增區域



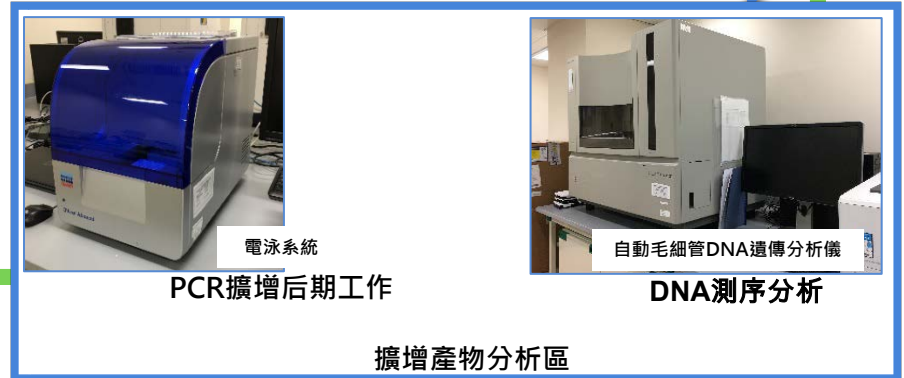
樣本製備區



核酸提取區



PCR擴增區



擴增產物分析區



試劑儲存和準備區

- 專用的操作儀器及設備在特定的工作區區域使用，不可隨意拿到其他區域
- 消毒儀器應放置在前PCR擴增區域
- 試劑的配製和存放在前PCR擴增區域
- 將有關產生塵埃粒子的工作限制在生物安全櫃中操作
- 不應將試劑和儀器從骯髒的地方移到乾淨的地方

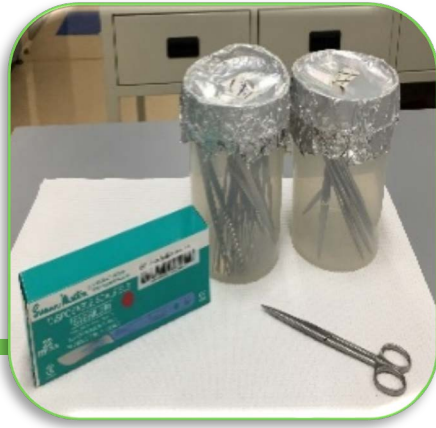


防止污染措施

操作時的注意事項



每次只處理一份樣本



使用消毒用具



手套、消毒劑、吸附墊



紫外光交聯器

- 應使用保護裝備，實驗操作時應戴手套和穿實驗袍
- 樣本前處理時，每次只處理一份，避免交叉污染。處理下一份樣本前，更換手套
- 器具要高溫高壓消毒，或使用一次性已消毒用具或已照射紫外光消毒的用具
- 用有濾芯的吸頭
- 製備PCR混合液，分裝
- 只可在後PCR區打開盛載PCR擴增物的試管
- 實驗前後應使用適當的消毒劑對工作區進行消毒，如：70%乙醇、10%次氯酸鈉、DNA AWAY™、Eliminase™等
- 使用完生物安全櫃和層流櫃前後應照射紫外光



防止污染措施



使用層流櫃

- 設置HEPA濾芯
- 設置紫外光燈
- 層流氣流可保護實驗樣品及試劑
- 配備 PCR主混合液試劑

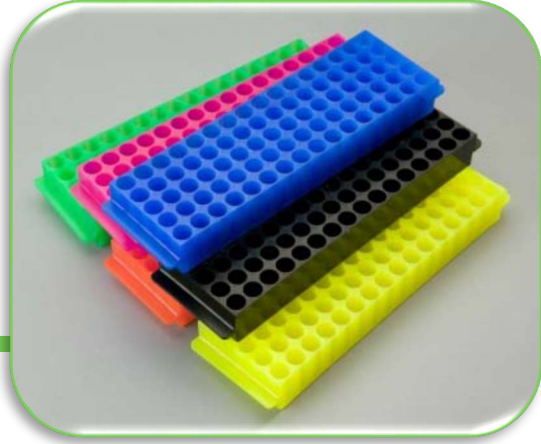


定期清潔儀器及設備

- 實驗過程中，可能出現飛濺或溢出的情況，DNA測試結果可能會受到儀器污染的影響
- 定期清潔或使用前後儀器及設備時，應用消毒劑進行清潔
- 如：實驗枱面、離心機、混勻儀、生物安全櫃、層流櫃、電泳儀、紫外透射儀等



處理螢光測試材料



- 避免光漂白
 - 使用鋁箔包裹或覆蓋測試試劑
 - 琥珀管
 - 琥珀色儲存盒
 - 用深色的架子
 - 要迅速完成

- 避免渦流
- 避免多次冰凍和解凍降而解試劑



總結

- 此項目是為中藥業界和檢測業界提供多元化測試服務，希望可推動中藥檢測認證產業的發展。
- 我們希望所開發的中藥材的標準脫氧核糖核酸條形碼檢測方法（「DNA條形碼檢測法」）和建立一個中藥材參考DNA序列庫（「DNA序列庫」），能建立中藥材和基原植物物種之間的遺傳可溯源性，並保障中藥材臨床應用的安全和效用。



謝謝

