

「植物類藥材DNA條形碼檢測法」
及「中藥材參考DNA序列庫」
研究分享會

(CME- IP0006-0084)

1

政府中藥檢測中心
2022年12月16日



內容

- 政府中藥檢測中心簡介
- 中藥材鑒別
- 甚麼是DNA?
- 核酸技術及其應用
- 植物類藥材DNA條形碼檢測法
- 中藥材參考DNA序列庫
- 其他DNA檢測方法





「中醫中藥發展委員會」的建議

集中探討中醫中藥的四大發展範疇



人才培訓及專業發展



中醫服務

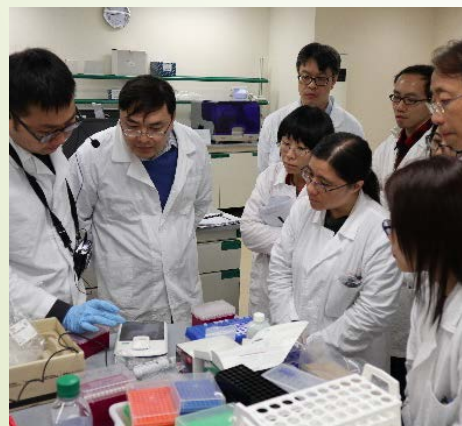


科研



產業發展 (包括中藥檢測)

- 認同中藥檢測有助確保中成藥產品的質素和安全
- 在2015年的施政報告中宣佈會籌劃一所由衛生署管理的中藥檢測中心





政府中藥檢測中心

Government Chinese Medicines Testing Institute (GCMTI)

- 政府中藥檢測中心專責於中藥檢測科研，為中藥安全、品質及檢測方法建立參考標準
- 在2017年開始運作





TSEUNG KWAN O



Oscar by the Sea

Wan Po Road

F.S. Training School

CMH
42,900

GCMTI
17,200

Quarters for FSD
(2021-22)

Pak Shing Kok Road

View

View

Disused Stage 1
Landfill Site

Future Housing
Development
(2027-28)

Green Belt

LOHAS PARK



政府中藥檢測中心 - 目標

6

制訂中藥參考標準

- 繼續現有的《香港中藥材標準》計劃

設立高科技實驗室

設立中藥標本實驗室

設立培訓及技術轉移中心

強化與國際間之合作



政府中藥檢測中心 - 目標

7

制訂中藥參考標準

設立高科技實驗室

- 開展中藥的高端科技研究及制訂檢測方法
- 透過技術轉移予中藥業界，加強業界對中藥及其產品的品質控制

設立中藥標本實驗室

設立培訓及技術轉移中心

強化與國際間之合作



政府中藥檢測中心 - 目標

8

制訂中藥參考標準

設立高科技實驗室

設立中藥標本實驗室

設立培訓及技術轉移中心

強化與國際間之合作

- 收集中藥材標本及其原植 / 動物標本
- 並發展成數碼化標本館開放予公眾，業界及國際科研機構作中藥材鑒別使用
- 同時致力成為具權威性的數碼化標本館
- 二者將成為相關持份者在中藥科研和應用方面的綜合資料庫，重要參考資料及平台



政府中藥檢測中心 - 目標

9

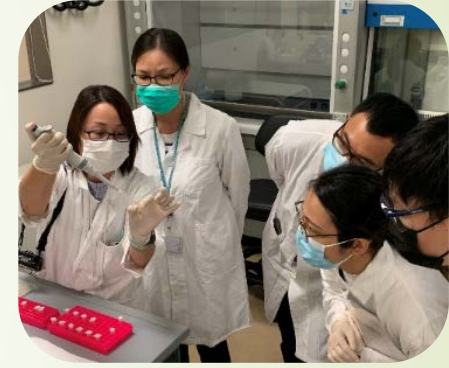
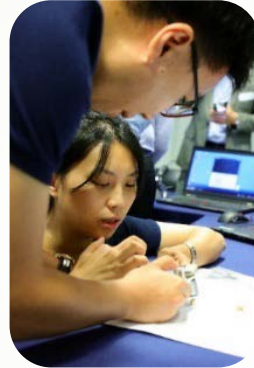
制訂中藥參考標準

設立高科技實驗室

設立中藥標本實驗室

設立培訓及技術轉移中心

強化與國際間之合作



- 為中藥業界及檢測業界提供培訓，推廣中藥參考標準，及將檢測技術轉移予檢測業界
- 促進香港成為國際中藥檢測及認證中心



政府中藥檢測中心 - 目標

10

制訂中藥參考標準

設立高科技實驗室

設立中藥標本實驗室

設立培訓及技術轉移中心

強化與國際間之合作

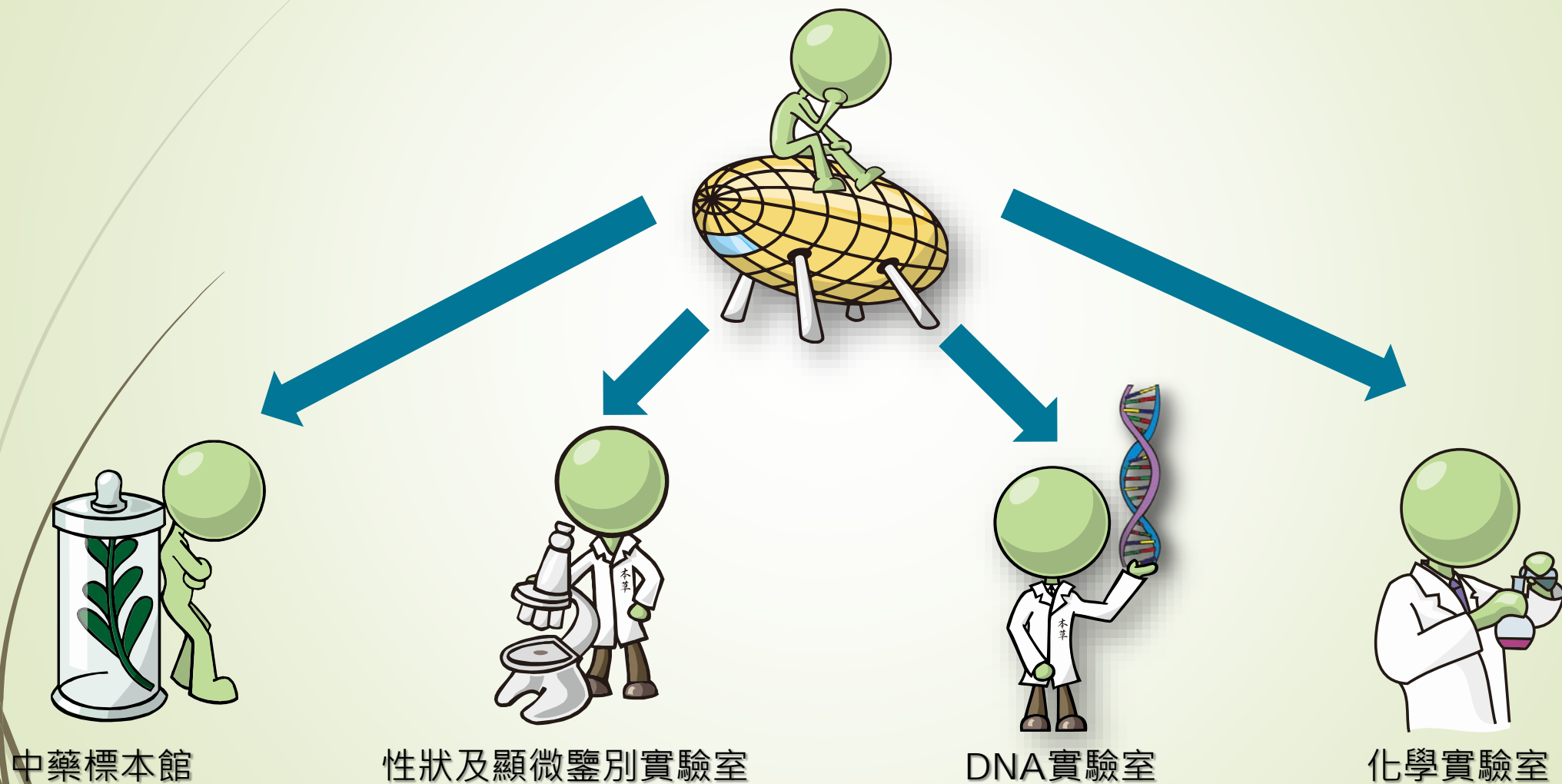


- 舉辦國際性交流活動及繼續維持與內地及海外相關機構的聯絡
- 促進中藥參考標準及檢測方法的統一



政府中藥檢測中心 - 實驗室

11

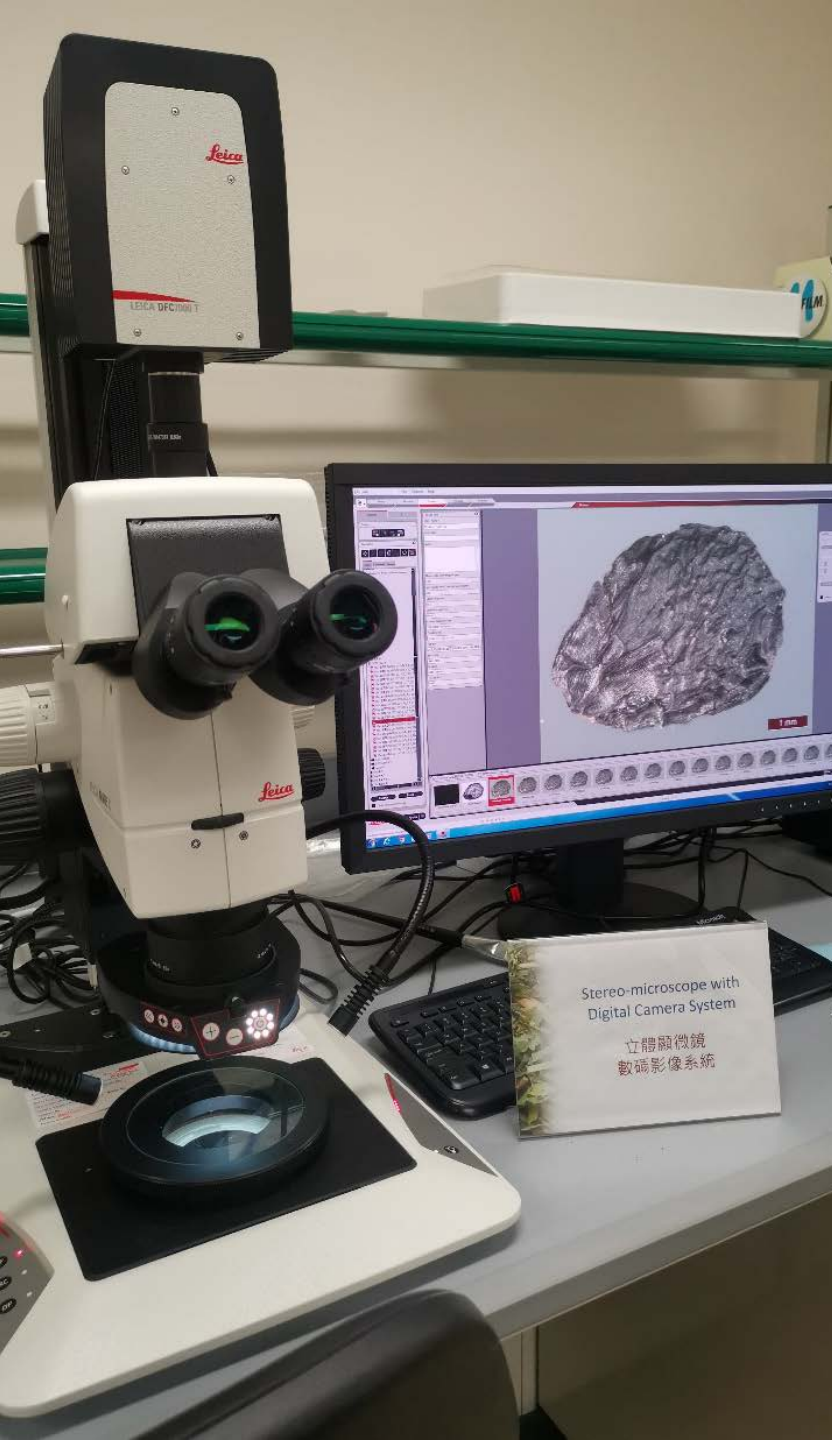




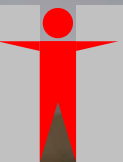
中藥標本館

- 用以貯藏和管理中藥以及嶺南草藥等標本
 - 提供實物標本供對比鑒別和研究
 - 推動本港中醫藥的發展
- 特色展櫃
專題展櫃





性狀及顯微鑒別實驗室
 配備了生物顯微鏡
 立體光學顯微鏡數碼影像系
 統
 可用於研究及記錄中藥的性
 狀與顯微特徵

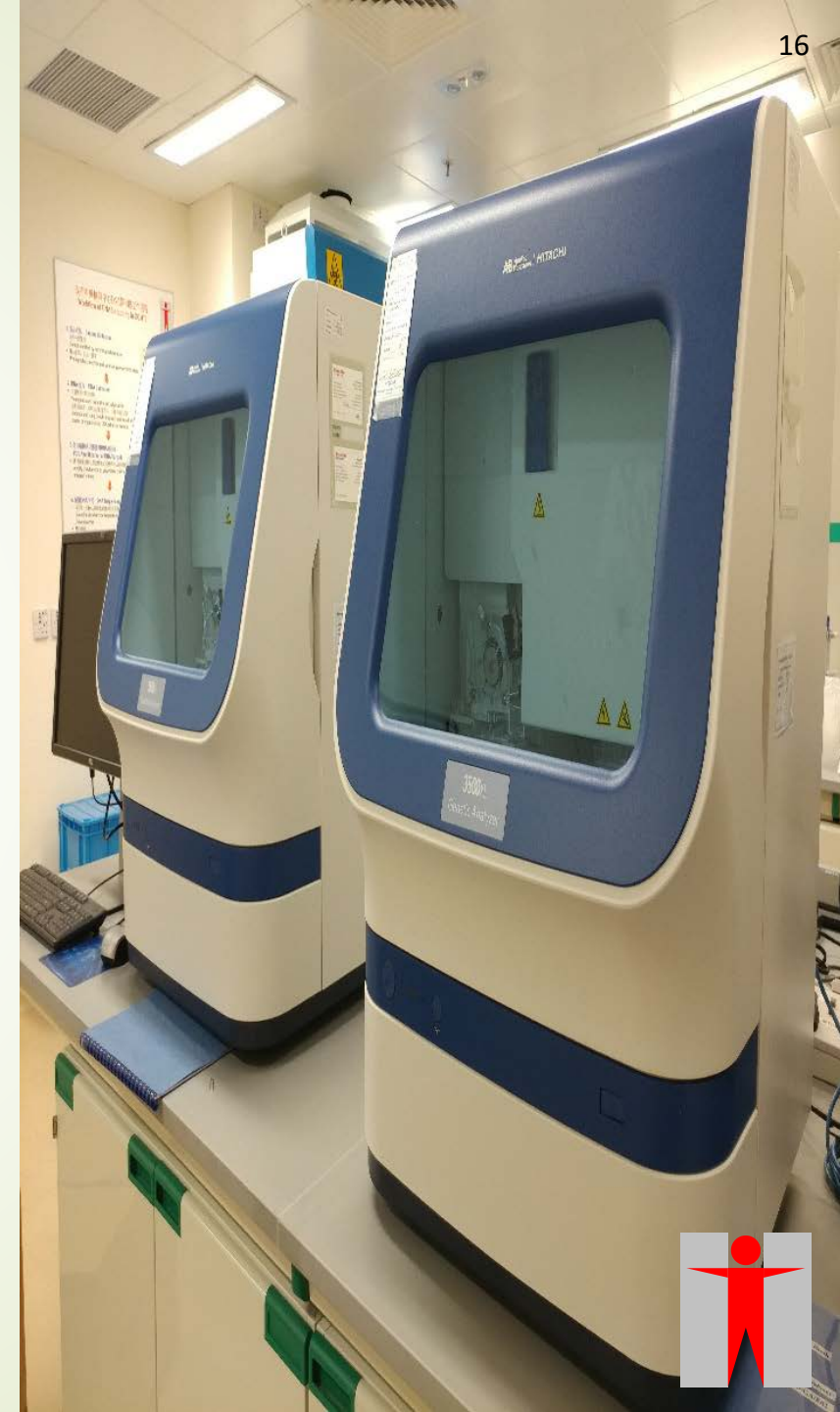




化學實驗室

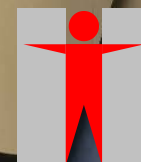
透過化學手段開展可行和實用的中成藥品質控制檢測方法的研究開發工作，以提升中成藥的品質至國際認可標準





DNA實驗室

透過DNA手段作為中藥鑒別的補充方案，並建立中藥材參考DNA序列庫



利用多學科的鑒別手段來識別中藥材/中成藥分析



性狀鑒別

顯微鑒別

外貌特徵

來源鑒別
(文獻研究)

化學成分
遺傳訊息



理化鑒別

DNA分子鑒別



政府中藥檢測中心 - 研究成果

性狀及顯微鑒別

- 香港容易混淆中藥的性狀及顯微鑒別研究

化學

- 內服中成藥中藥材指標成分的分析(枇杷膏)
- 外用藥油中藥材指標成分的分析

生物科技

- 以DNA技術作為鑒別鹿茸的互補檢測方法
- 植物類中藥材的DNA條形碼檢測法
- 動物類中藥材的DNA條形碼檢測法
- 川貝母中常見摻雜品 – 平貝母的DNA 鑒別方法



政府中藥檢測中心 - 培訓及技術轉移



對象

中醫業界、中藥業界、醫院管理局三方協作的中醫教研中心、
檢測業界、醫藥學界、內部同事、公眾



宣傳

中醫藥規管辦公室網頁上載研究結果、《中醫組通訊》
、《中藥商通訊》、國際現代化中醫藥及健康產品展覽
會 - 攤位及展板



教育

分享會
(進修學分供中醫業界)
工作坊





02. 中藥材鑒別

中藥材鑒別體系

鑒定方法	依據
性狀鑒定	感官
基原鑒定	器官
顯微鑒定	細胞
理化鑒定	理化



性狀鑒別

➔ 經典方法，快速，簡便

韮菜子



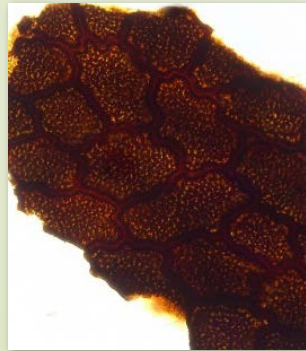
蔥子



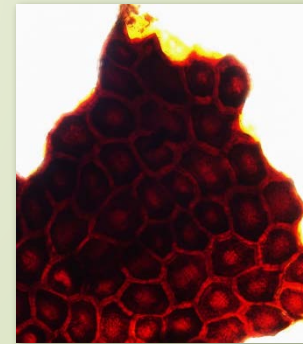
顯微鑒別

- ▶ 通過顯微鏡觀察中藥材的顯微特徵，鑒別中藥材

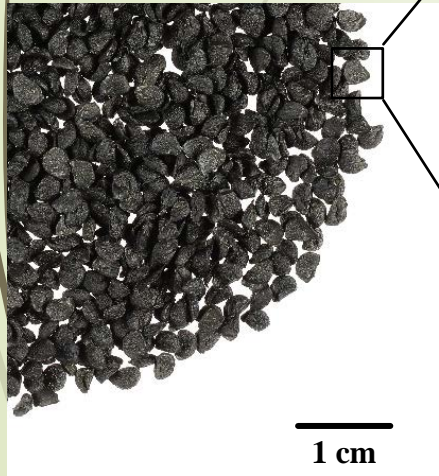
葎菜子



蔥子



微性狀鑒別

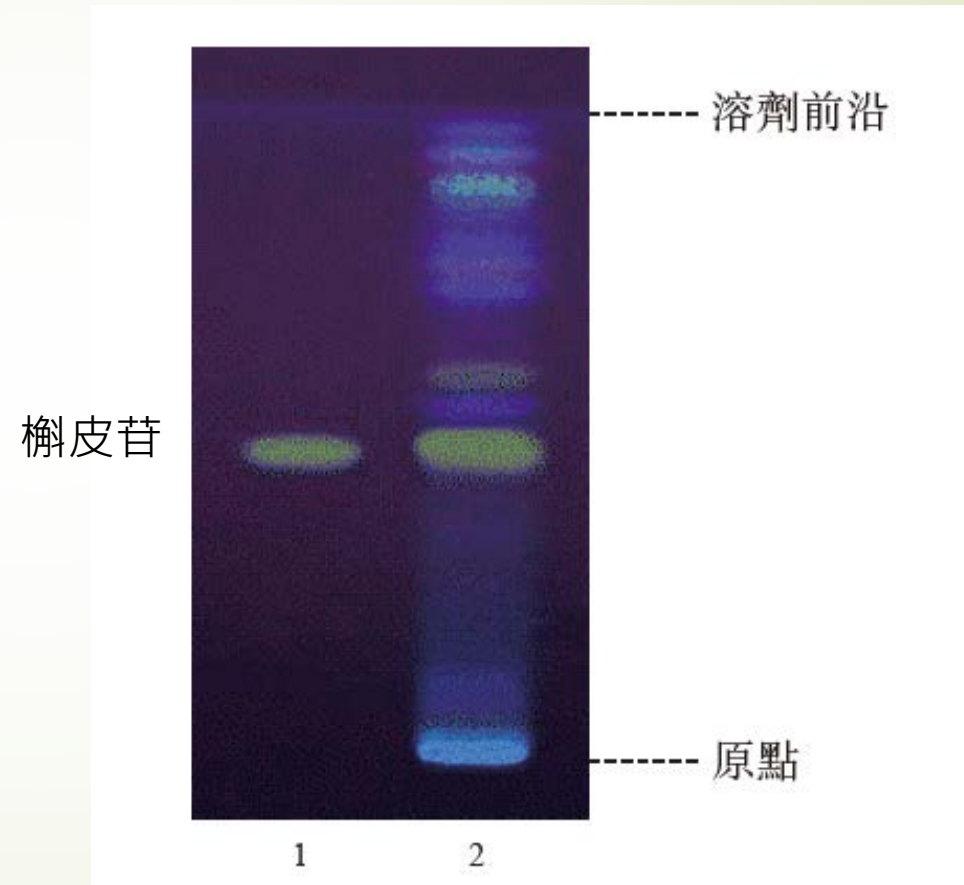


蕒菜子



化學分析

- 化學成分
- 高效薄層色譜
- 高效液相色譜



容易混淆的藥材



蟬蛻



金蟬蛻



容易混淆的藥材



白花蛇舌草



水線草



容易混淆的藥材



南鶴虱

華南鶴虱





03. 甚麼是DNA?

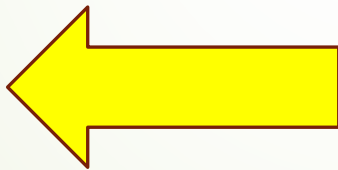
生物組成 - 特有類別

- ▶ 木質化組織 - 樹木
- ▶ 甲殼質 - 蝦，蟹，昆蟲



生物組成 – 普遍存在

- 碳水化合物
- 脂肪
- 蛋白質
- 核酸
 - DNA
 - RNA



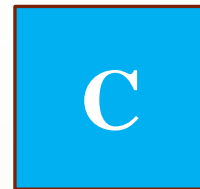
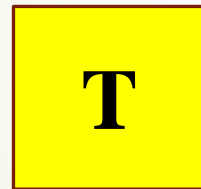
DNA是甚麼？

- Deoxyribonucleic acid
- 脫氧核糖核酸
- 存在於生物的細胞內
- 生物設計的藍圖



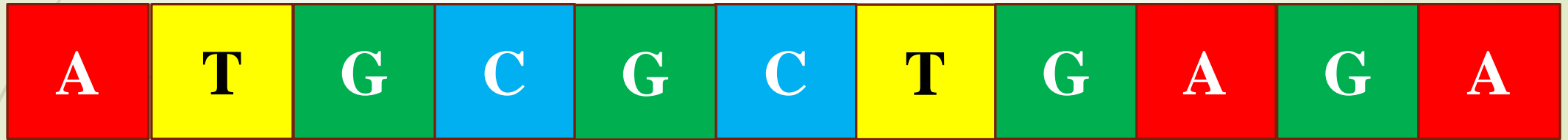
DNA是甚麼？

- 由4種化合物組成
- 像字母積木



甚麼是DNA?

單鏈

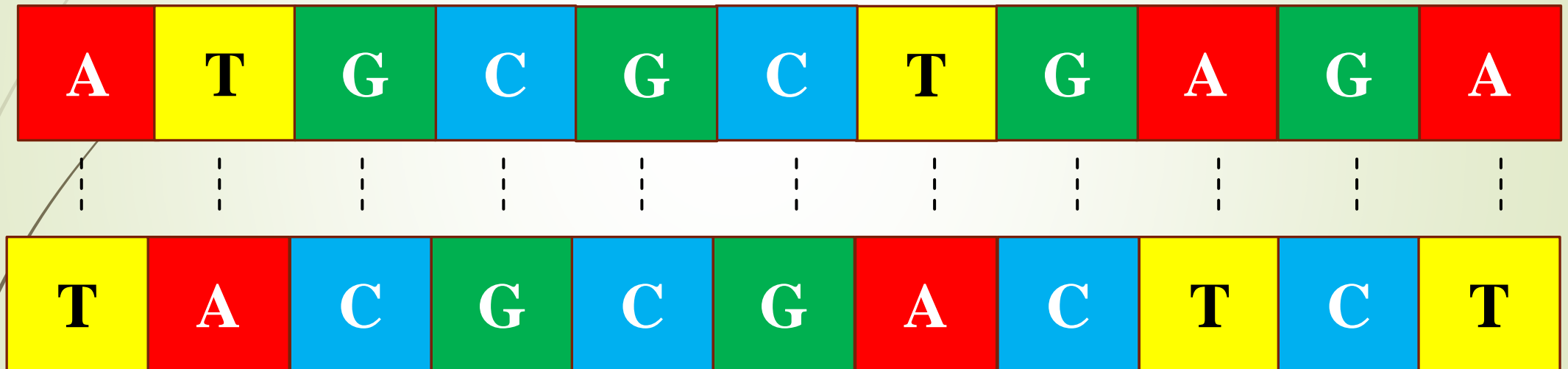


- ➔ 其排列次序，稱為DNA序列



甚麼是DNA?

雙鏈

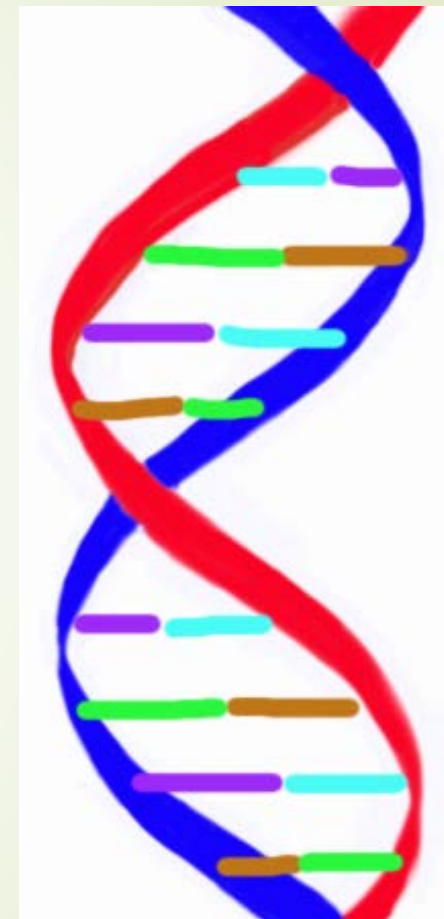


長度: 11 個鹼基對 (11 bp)



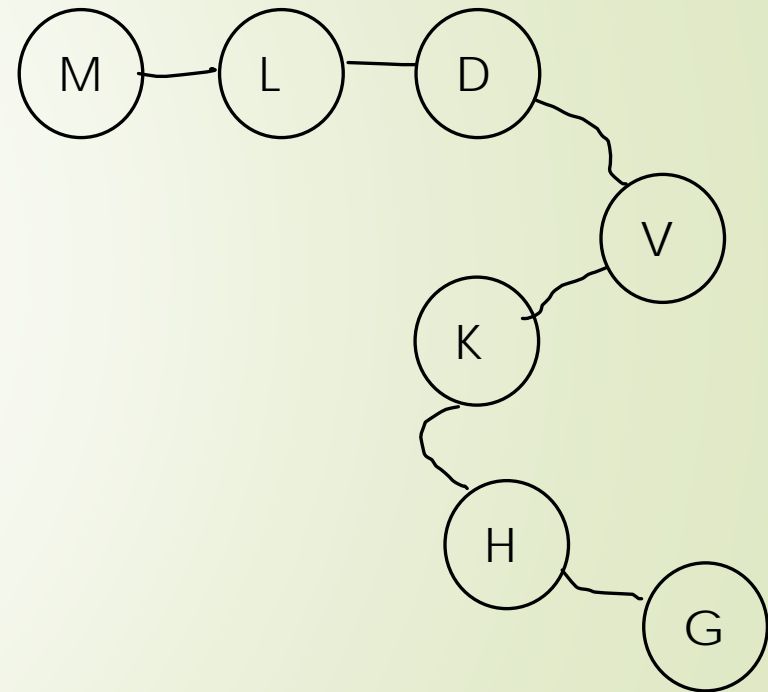
甚麼是DNA?

- 在生物裏，DNA以雙螺旋結構存在
- 1953年，沃森和克里克 (Watson and Crick) 在《自然》雜誌描述了DNA雙螺旋結構



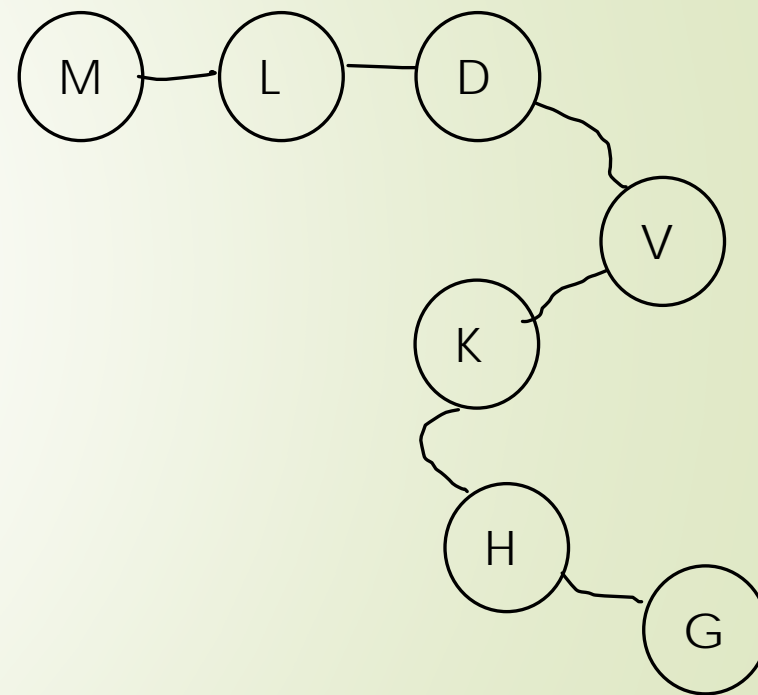
蛋白質

- 人體由20種氨基酸組成
- 20個英文字母
- 生物中必要組成成分
- 參與細胞的反應
 - 酶 (生物催化劑)
 - 肌肉
 - 免疫



蛋白質

- ➔ 每種蛋白都有獨特氨基酸排列
- ➔ 這些特定的排列，由甚麼決定？



密碼

摩斯密碼

訊號	代表英文字母
● —	A
— ● ● ●	B
— ● — ●	C

DNA密碼

DNA序列	氨基酸
ATG	M
CGC	R
TGC	C



DNA的角色

我是這個生物的一個細胞

我是這個生物的總設計圖

DNA

我是**蛋白質A**的設計圖

mRNA

我是最終產物，負責工作

蛋白質 A



小結

- DNA由4種化合物組合而成
- 4種化合物排列次序，稱為DNA序列
- DNA是生命的藍圖



A



T



C



G





04. 核酸技術及其應用

核酸技術里程

1868 年 - 從細胞提取出DNA

1937年 - 以電泳技術分離生物分子

1953年 - 發現DNA的雙螺旋結構

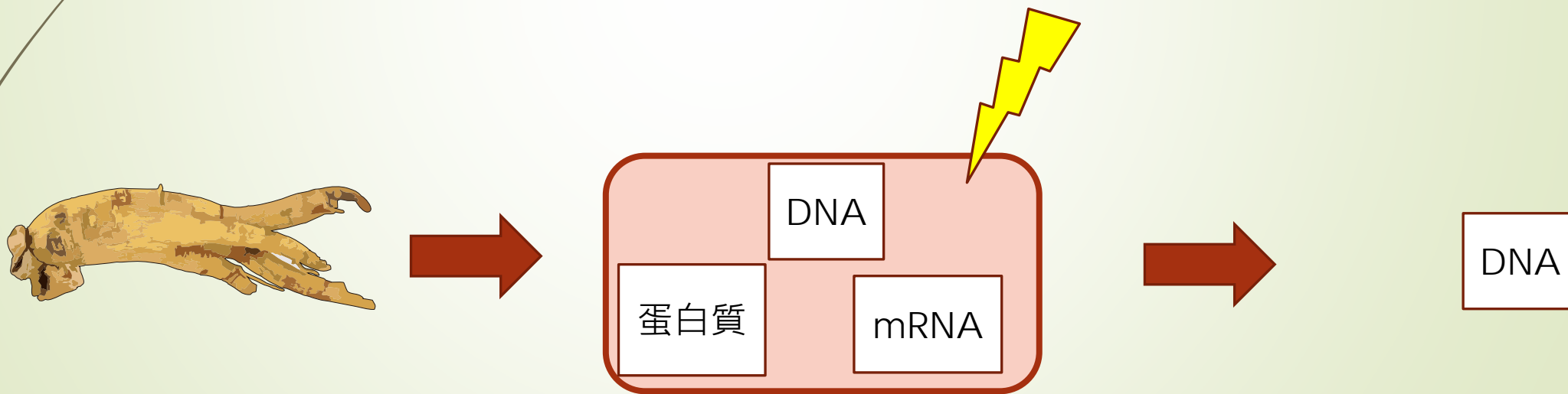
1977年 - 桑格DNA測序

1983年 - 聚合酶鏈式反應 (PCR)



從細胞中提取DNA

- 大多數情況下，不能直接檢測樣本
- 需將細胞膜或細胞壁打破
- 去除DNA以外的成份





DNA測試的靈敏度



<https://daily.jstor.org/forensic-dna-evidence-can-lead-wrongful-convictions/>



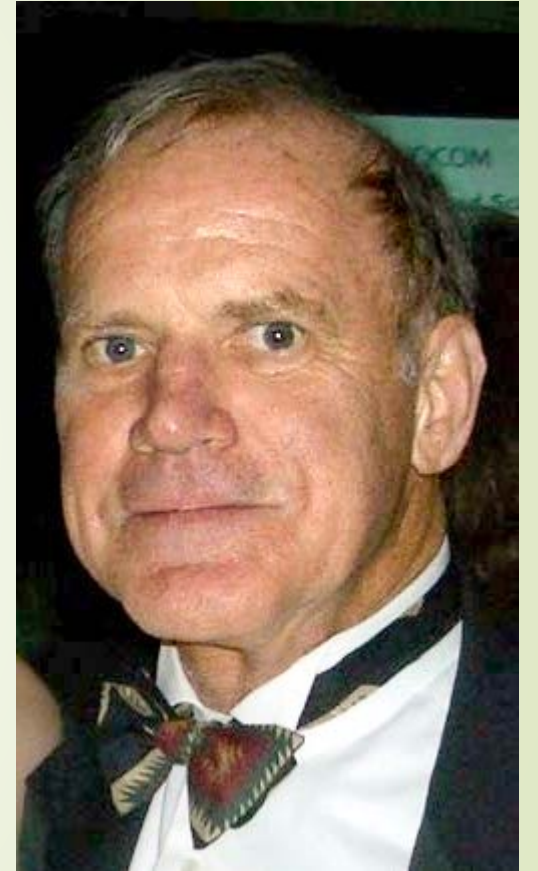
DNA複製技術

- 聚合酶鏈式反應 (Polymerase chain reaction)
- 複製DNA
- 從少量的DNA樣本，反覆擴增，得到足夠分析的分量



PCR的故事

- 發明人: 凱利.班克斯.穆利斯(Kary B. Mullis)
- 經常面對DNA樣本不夠使用
- 由汽車車輪發出規律聲音，啓發複製DNA
- 人工方法，在試管中進行



https://en.wikipedia.org/wiki/Kary_Mullis
(Kary Mullis – Wikipedia)



PCR的故事

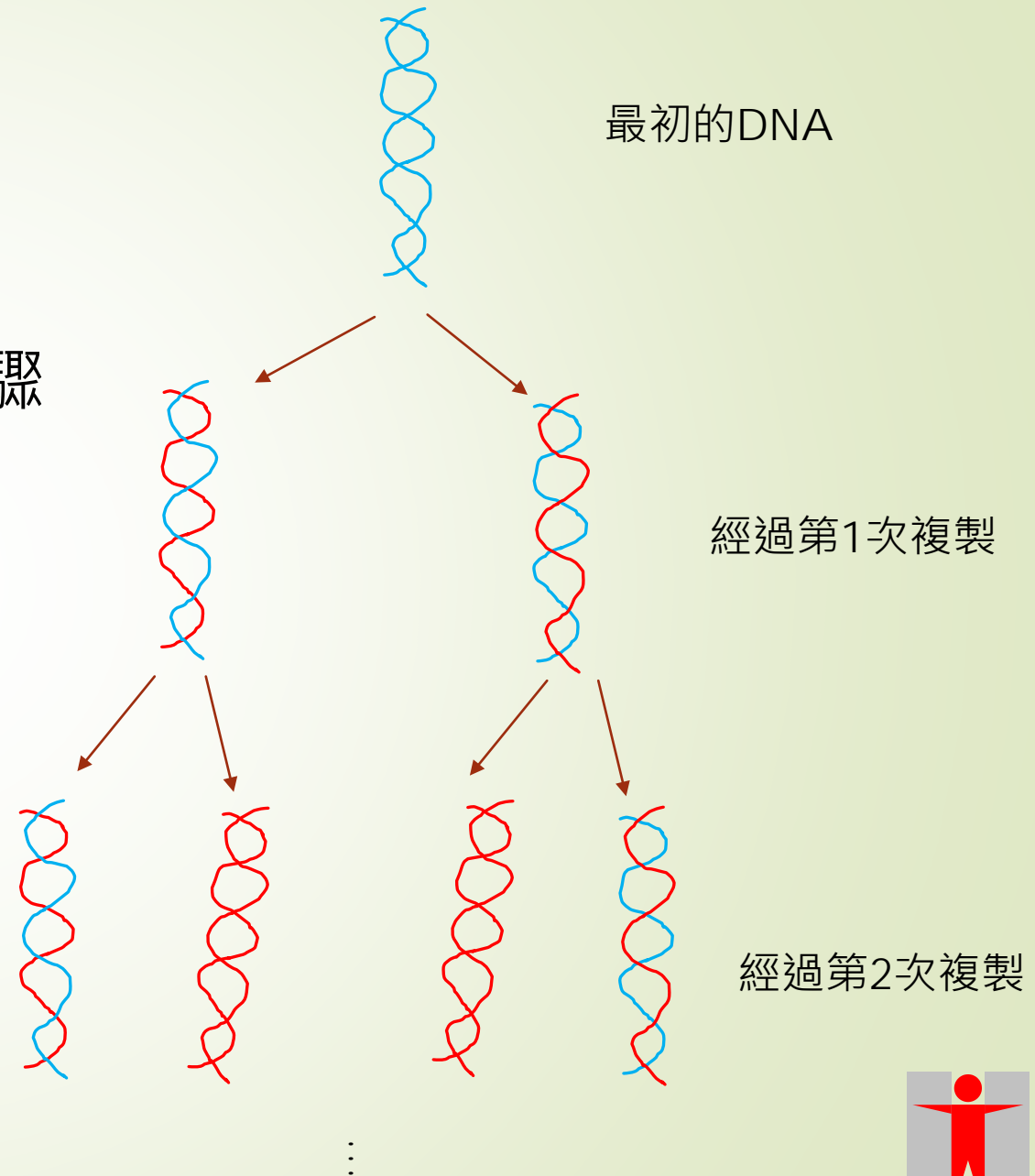
反覆進行相同的複製步驟

➤ 1次 -> 由1變2

➤ 2次 -> 由2變4

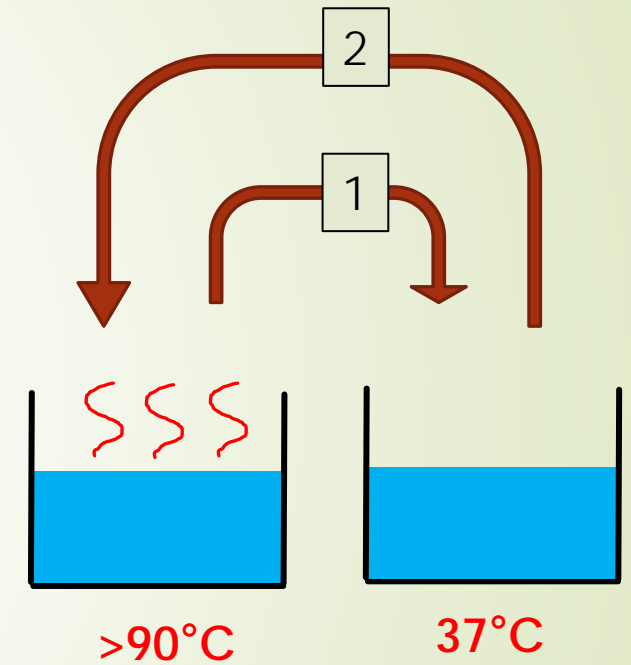
⋮

➤ 30次 -> 10億



初期的PCR

- ➔ PCR需進行約30次複製
- ➔ 每次複製前，都需要以 $>90^{\circ}\text{C}$ 進行反應
- ➔ 每次加入新鮮的DNA聚合酶，去進行新一輪複製
- ➔ 十分耗費人力和物力



水生棲熱菌

- 1970年代
- 美國黃石國家公園的熱泉
- 發現生存在高溫環境的細菌
- 分離出耐高溫的DNA聚合酶
- 莫理斯改用這種DNA聚合酶，解決了每次複製需要加酶的缺點



<https://www.cnbeta.com/articles/science/1131709.htm> (人类的起源？神秘古生菌带来复杂生命的崛起)



PCR的故事

- PCR變得更具實用性
- 小插曲
 - 投稿至《科學》遭駁回
 - 但隨後，《科學》選聚合酶為1989年度分子，讚揚對重要性
- 1993年，獲得諾貝爾化學獎
- 現時已有儀器，代替人手PCR

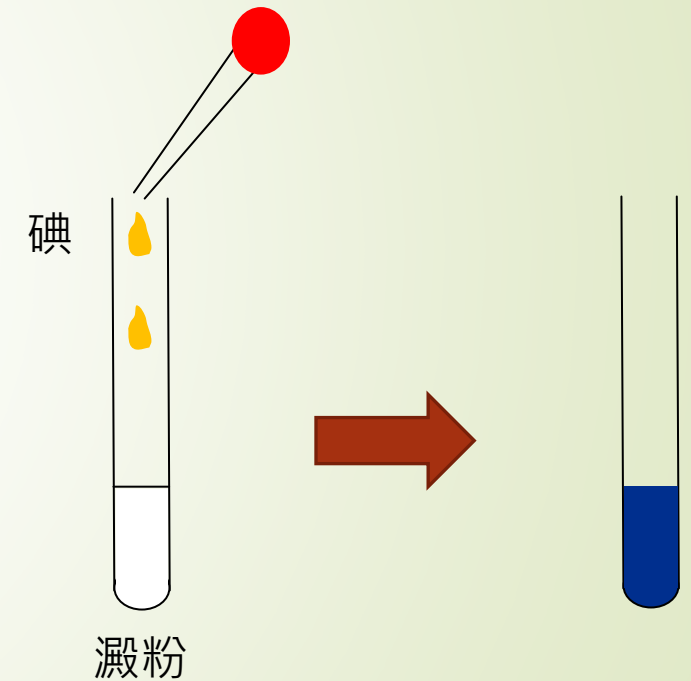
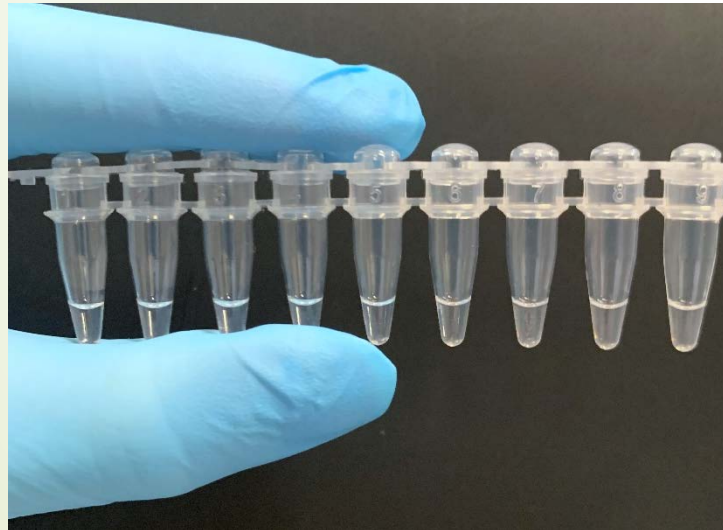


PCR儀



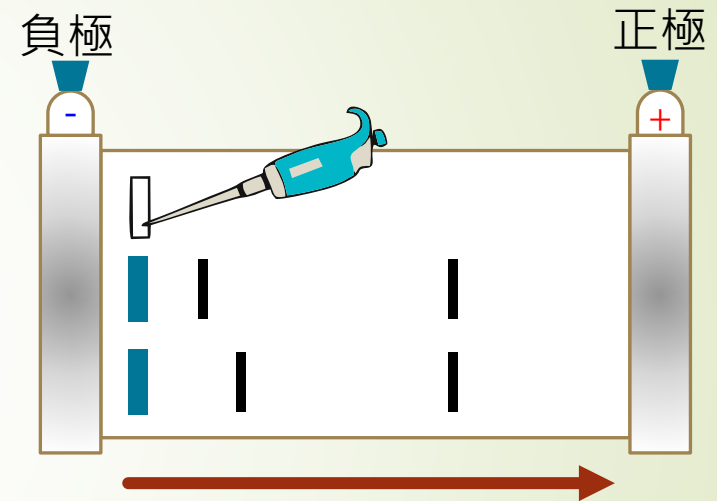
如何“看到”DNA?

- 樣本裏有沒有DNA?
- 經PCR後，有沒有PCR產物?
- 如果有，鹼基對長度是多少?

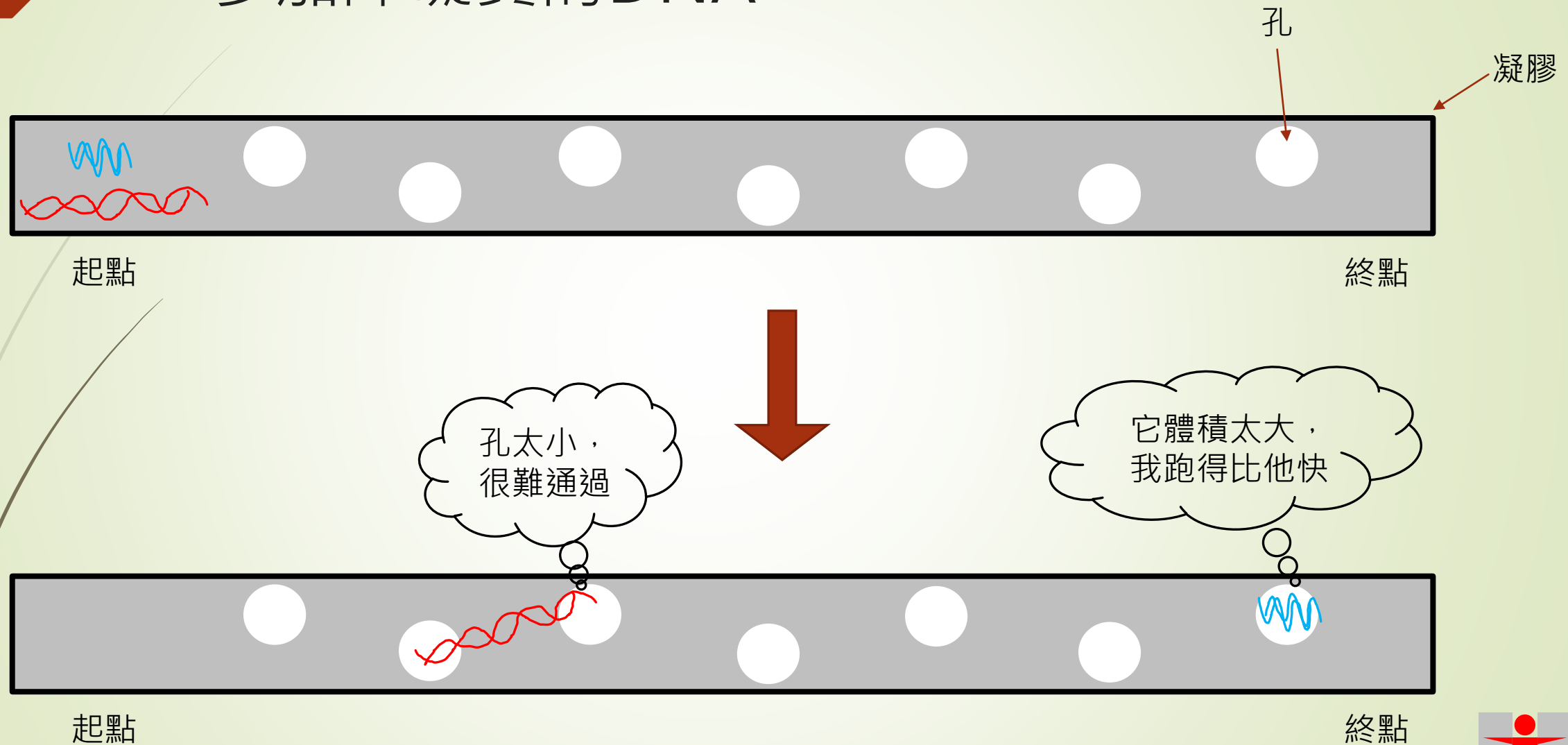


電泳

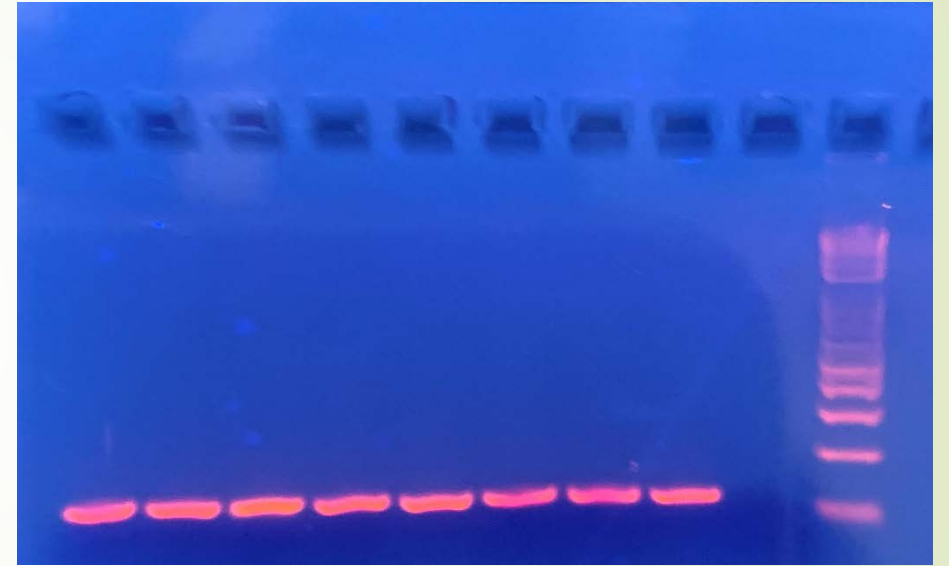
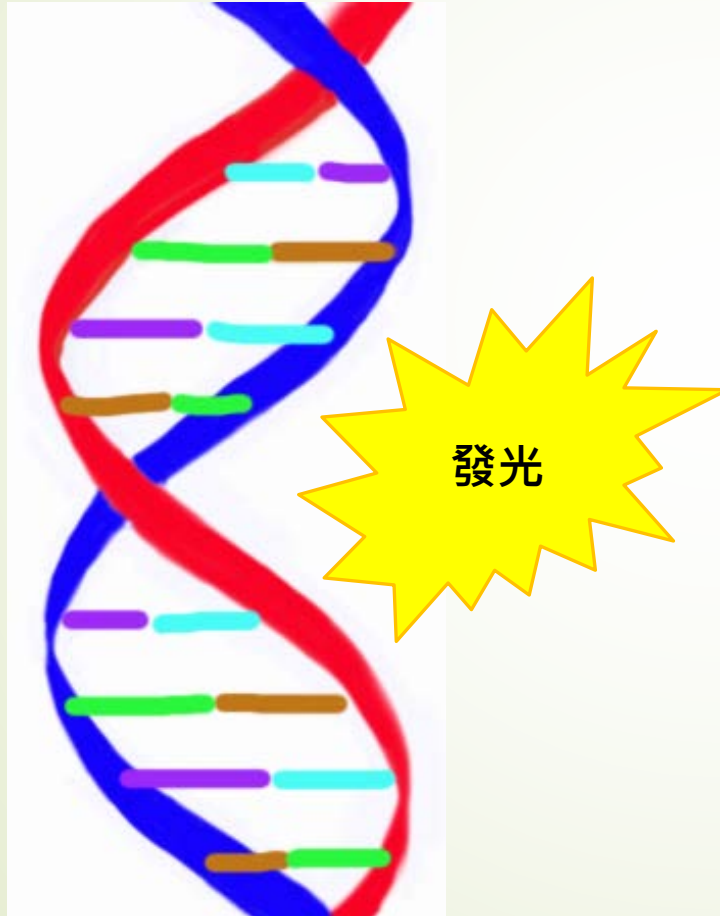
- 1937年
- 分離生物分子
- 瓊脂糖凝膠
 - 從海藻中分離
- DNA帶負電荷，被正極吸引



參加障礙賽的DNA



如何令DNA看得見？



在紫外光燈下觀察的DNA

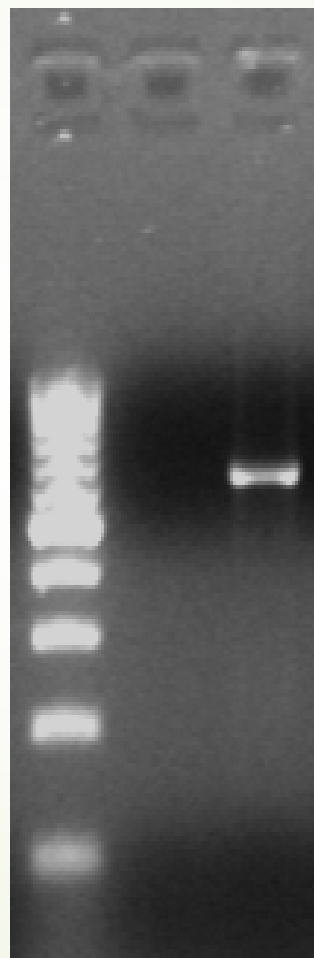


電泳圖

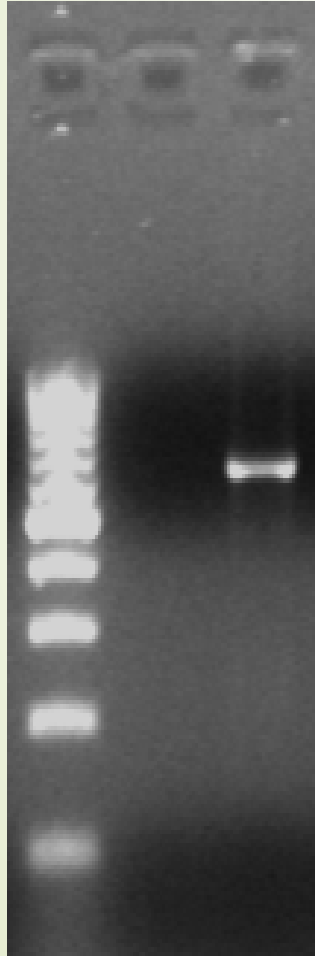
起點

長的DNA

短的DNA



DNA測序

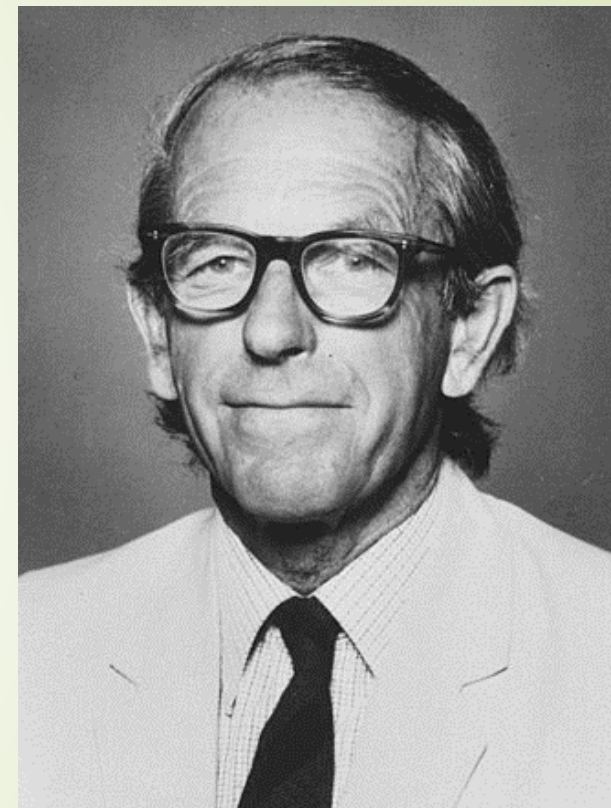


雖然看到DNA，但不知它的DNA序列



桑格法DNA測序

- 弗雷德里克.桑格 (Frederick Sanger)
- 唯一一位獲得2次諾貝爾化學獎
- 1955年，將胰島素的氨基酸序列定序
- 獲得了1958年諾貝爾化學獎



https://en.wikipedia.org/wiki/Frederick_Sanger
Frederick Sanger - Wikipedia

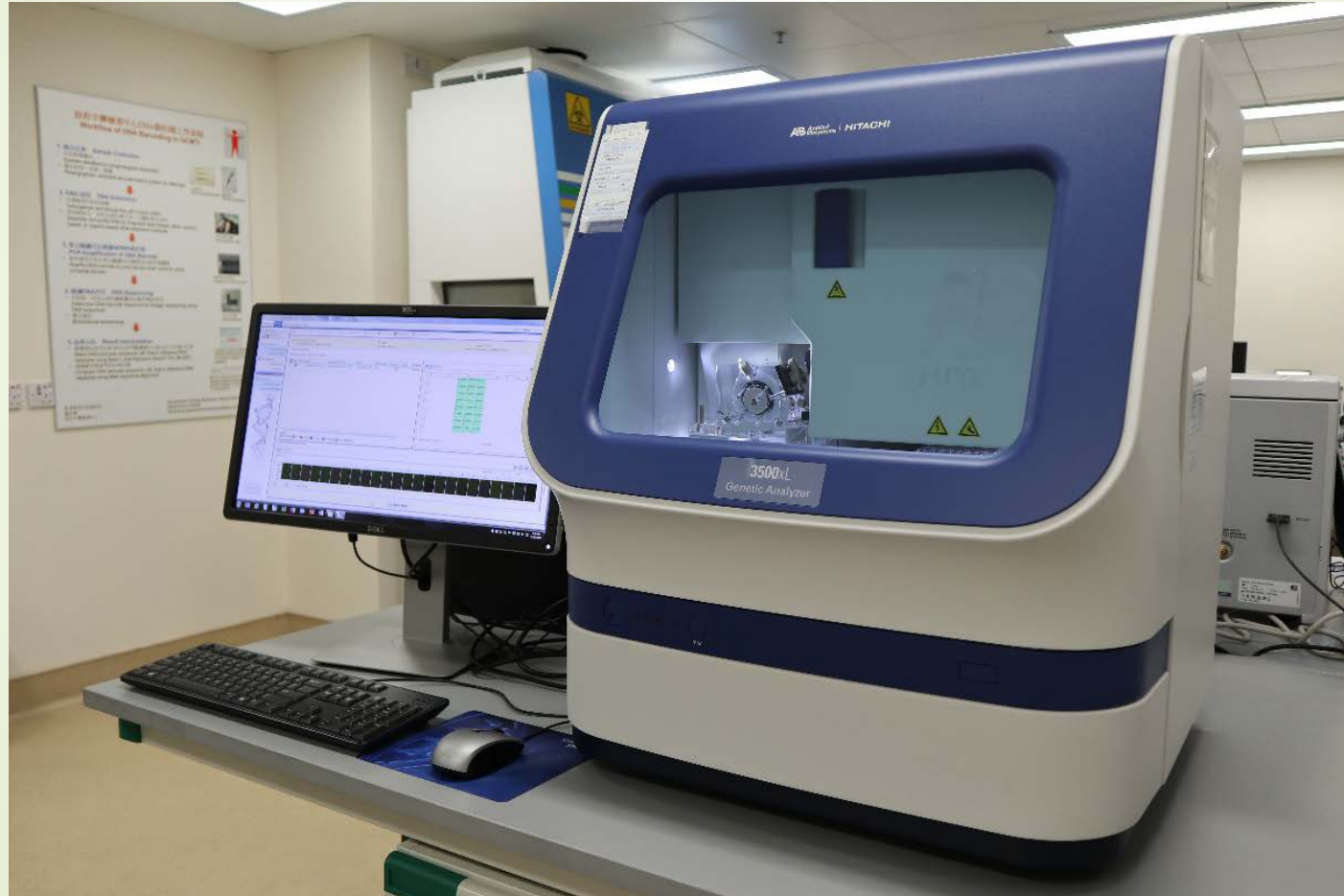


桑格法DNA測序

- 1975年，發展出一種叫「桑格法」的DNA測序技術
- 利用電泳讀出DNA序列
- 1980年，再度獲得諾貝爾化學獎
- 1990年代，DNA測序要使用放射性元素，手動操作

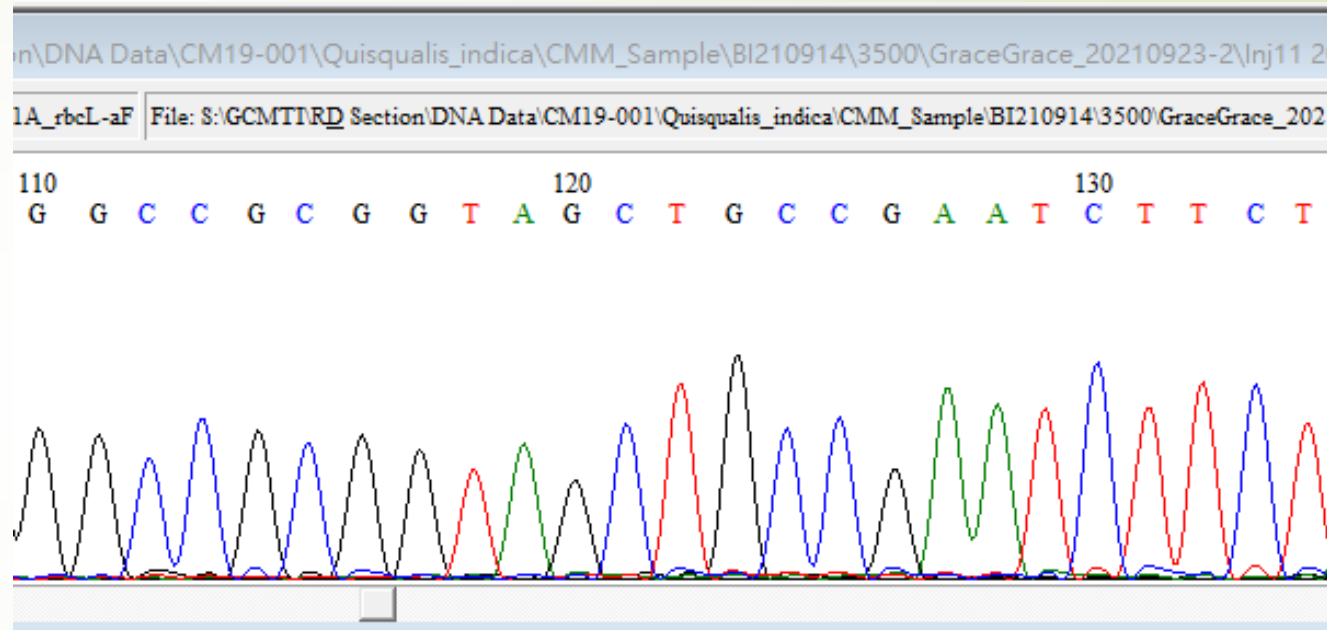


DNA測序儀



DNA序列

測序儀的數據



文字方式儲存

GGCCGCGGTA.....



小結

- 核酸技術用以測試生物的核酸特徵
- 常用的技術有PCR、電泳、DNA測序等

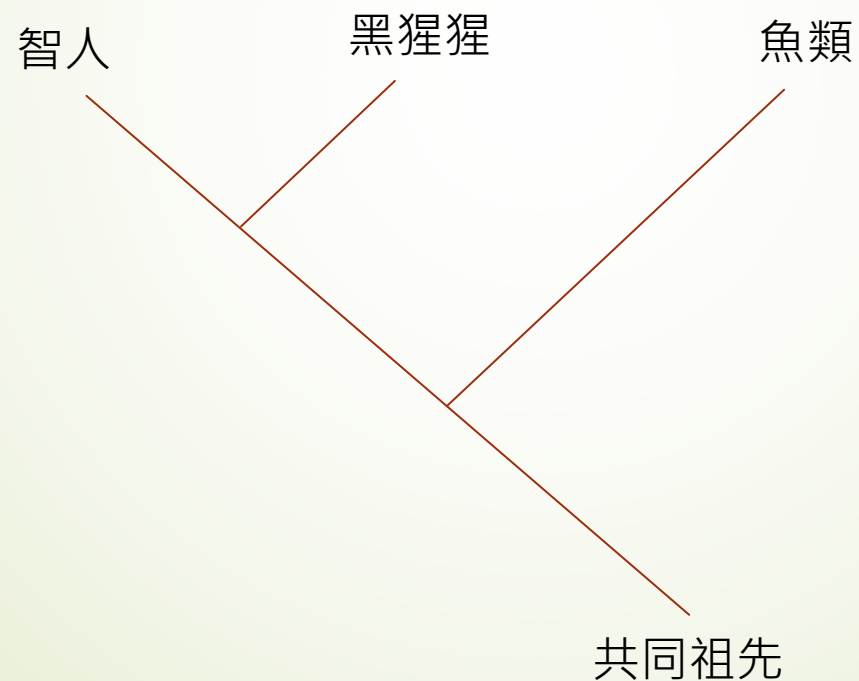




04. 核酸技術及其應用

生物之間的DNA序列差異

- ▶ 外貌特徵差異大的生物，它們之間的DNA序列差異亦大



生物的身份

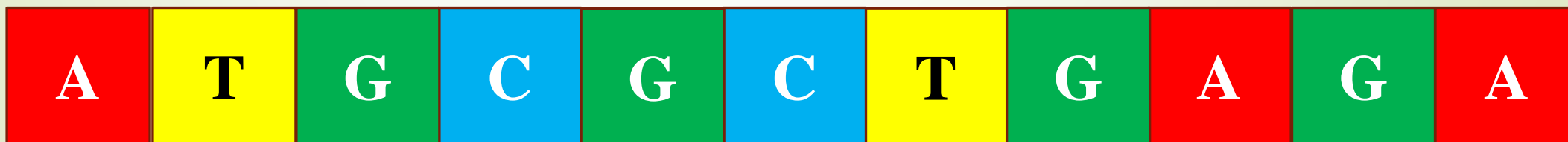
- 生物的DNA訊息量大
- 比對DNA序列，可以區分不同物種

- 但 ...



問題

- 以人類為例，有超過30億個鹼基對(bp)
- 桑格法每次能測1000 bp 以下
- 將所有鹼基對都進行測序?
 - 人力，時間，金錢
- 若否，應測試那一部份？



找尋合適的位置

- 科學家不斷尋找合適的DNA區域
- 區分不同生物品種，例如
 - ITS區域 (約600 bp)能夠有效區分人參和西洋參



人參



西洋參



實驗室A

DNA 區域 **A**
對於柴胡十分有效!

我試了區域**B**，但對七葉一枝花無效，我打算試試區域**C**。

我們的結果顯示，DNA 區域 **B**可以區別鬼臼和龍膽。

剛接收了一個樣本，應該用區域**A**、**B**還是**C**?...

實驗室B

實驗室D



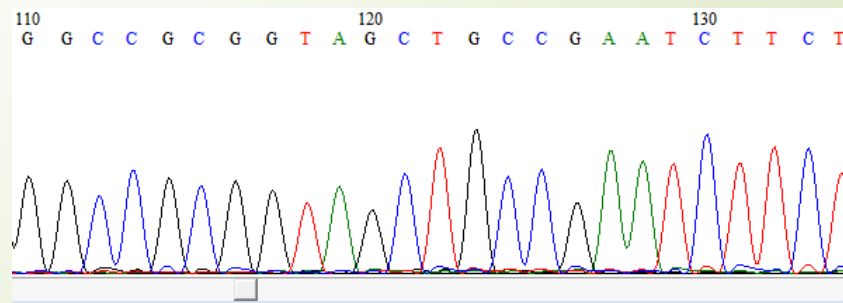
條形碼

- 按編碼規則排列的黑條和空白
- 代表商品名等信息
- 條形碼 = 商品



DNA條形碼

- 2003年
- 加拿大動物學家Paul Hebert，提出以小段DNA片段，為全球生物編碼
- 像商品上的條形碼，生物的條形碼，便是其獨特的DNA序列
- 而這個以DNA序列作為條碼的方法，稱為DNA條形碼



DNA條形碼

- 利用一段或幾段標準DNA區域
 - 集中資源
 - 資訊交換
- 實現動物、植物和真菌物種的快速鑒定
- 物種鑒定發展的大趨勢

大家都用區域A吧

實驗室A

實驗室C

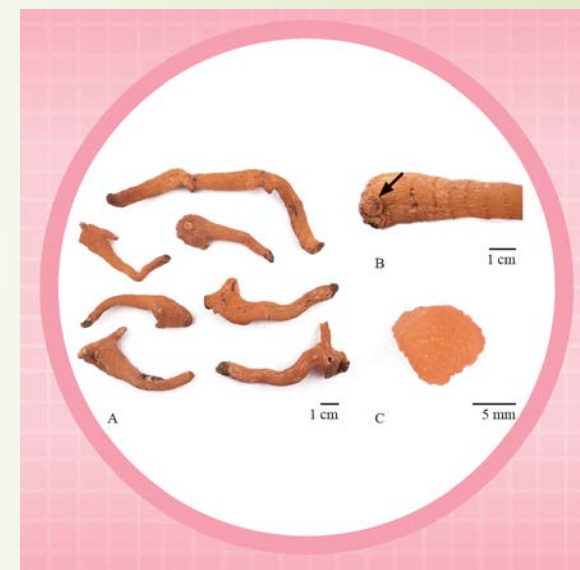
實驗室B

實驗室D



DNA序列參考數據

- 等於藥材的圖鑑
- 由已確定來源的標本，所產生的DNA序列
- 所比對的是DNA序列
- 從而得知樣本身份



香港藥材標準第10冊 – 黃精外觀圖



核酸檢測及應用

- 鑑證
- 食品
- 環境鑒測
- 醫療衛生



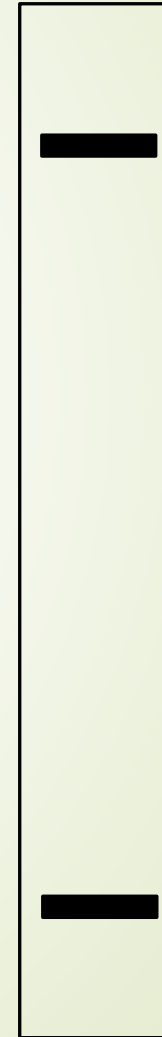
DNA指紋圖譜

- 無需進行DNA測序
- 找出生物之間的差異

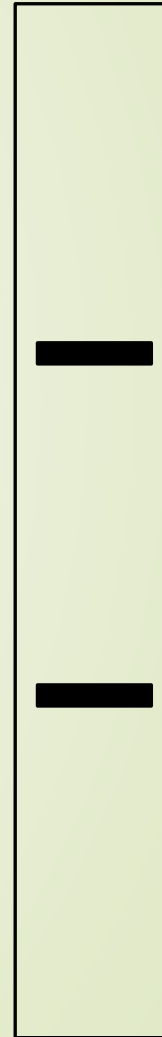
罪案現場



疑犯A



疑犯B



食品 – 基因改造食物

- 大豆、木瓜、香蕉
- 將其它生物的DNA，插入被改造生物之中
- 具有其它生物的功能
 - 抵抗病毒及虫害
 - 含豐富維他命A的香蕉



食品－食物致敏物

- 含致敏物的食物，例如
 - 麩質、奶類、蛋類、花生、甲殼動物、大豆、魚
- 無醫治方法
- 患者應避免進食含致敏物的食物



食品－食物物種

- 2010年2月12日，海關對31家海鮮乾貨零售店進行的一系列突襲中，查獲了100多公斤疑似假鮑魚片，價值約30,000美元。
- “靚鮑魚片”，“澳洲鮑魚片”，“日本鮑魚片”，“美國鮑魚片”，“南非鮑魚片”
- 真身是螺



明報



食品 – 食物安全

- 2012年6月15日，食物安全中心公告公眾停止食用含有河豚毒素的烤石斑魚，河豚毒素的含量由0.31毫克至1.7毫克/公斤不等
- 河豚”作為“石斑魚”
- 有毒河豚肉干(月尾兔頭魷)



環境鑒測



https://www.iflscience.com/plants-and-animals/how-dna-helping-us-fight-back-against-pest-invasions/?archived_content=xxqvkpozic



醫療衛生

- 2019冠狀病毒檢測
- 反轉錄聚合酶連鎖反應(RT-PCR)
- PCR技術的其中一種
- 可以檢出病毒量



小結

- 隨著DNA技術的進步，亦發展出多種檢測方法，例子有DNA條形碼、DNA指紋圖譜
- DNA檢測技術應用於食品安全、環境監測、鑑證、醫療衛生等範疇，與大眾息息相關





DNA鑒別技術 在中藥材的應用



DNA鑒別技術適用範圍

➤ 植物類

➤ 根、莖、花、果、葉、種子等

➤ 動物類

➤ 角、肉、血、皮、毛、鱗片等

➤ 真菌

➤ 菌絲體、子實體、孢子、複合體



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
- 沒有獨特化學成分標記的中藥材



DNA鑒別技術的限制

- 無法作中藥材的品質評估
- 不適用於礦物類中藥材
- 不能分辨部位
- 相對其他鑒別方法，操作步驟較多



中藥基源品質管理

- 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
- 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*)



中藥基源品質管理

- 容易混淆
 - 洋金花(*Datura metel*)
 - 鬧羊花 (*Rhododendron molle*)
- 無獨特化學成分標記的中藥材
 - 動物藥，例如鹿茸



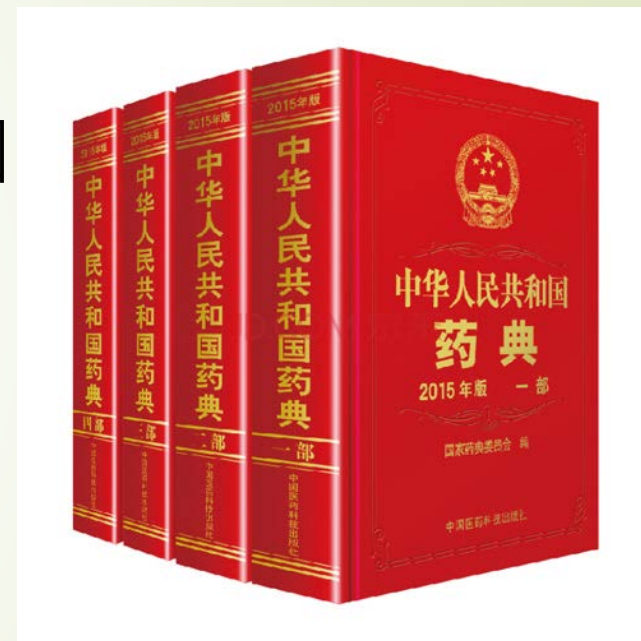
全球DNA測試發展趨勢

- 英國藥典2017版補充章節
 - 聖羅勒
 - 黃柏、關黃柏
- 美國藥典2014
 - 指導原則作為補充方法



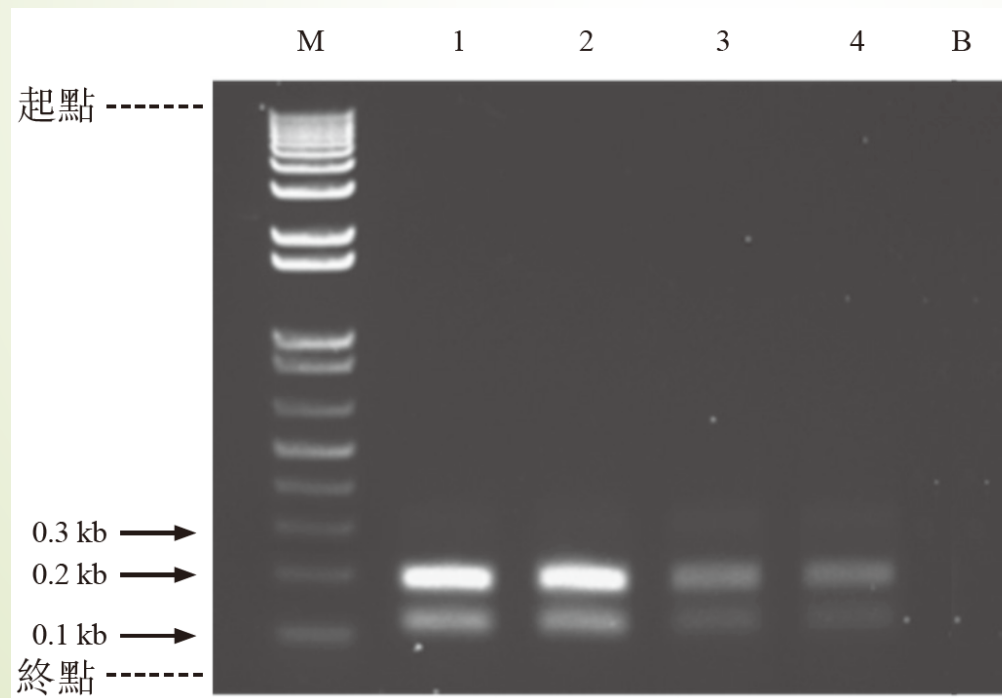
全球DNA測試發展趨勢

- 中華人民共和國藥典(中國藥典)2010版，首次發佈DNA指紋圖譜方法
 - 烏梢蛇
 - 蕪蛇
 - 川貝母
- 2015, 2020 版第四部
 - 9107 中藥材DNA條碼分子鑒定法指導原則



DNA檢測中藥材例子 – 名貴藥材

- ➔ 香港中藥材標準第7冊
- ➔ 川貝母鑒別方法



DNA檢測中藥材例子 – 有毒混淆品

- 川木通、木通、關木通
- 關木通為馬兜鈴科植物東北馬兜鈴
- 含有馬兜鈴酸
 - 腎毒性和致癌
- 關木通混淆木通出售
- 採用PCR-RFLP技術區分



DNA檢測中藥材例子 – 動物類

- ➡ 鱷魚肉、蛇、五爪金龍
- ➡ 大眾相信鱷魚肉對哮喘有幫助
- ➡ 2006年，香港中文大學對市面11份鱷魚肉乾進行DNA測序
 - ➡ 只有1份是鱷魚肉
 - ➡ 其餘是蜥蜴肉或蛇肉



http://the-sun.on.cc/channels/news/20061202/20061202020634_0000.html

太陽報 - 中大分子技術 蜥蜴肉乾現形
貝貝提供純血踢爆假鱷魚



其它藥材例子 (1)

➤ 根類

- 八角蓮與鬼臼、大戟、大黃、山藥、升麻、龍膽、百合、百部、紅景天、骨碎補、黨參、前胡、黃連 ...

➤ 果實種子類

- 八角茴香、五味子與南五味子、化橘紅與佛手、巴豆與毛巴豆、吳茱萸與山茱萸、梔子、蛇床子、砂仁、天花粉 ...

➤ 莖木皮花葉類

- 肉桂、杜仲、刺五加、鉤藤、紅花、西紅花、艾葉、桑葉與桑白皮、淫羊藿 ...



其它藥材例子 (2)

➤ 全草類

- 廣藿香與藿香、青蒿與茵陳、石斛與鐵皮石斛、魚腥草、細辛、穿心蓮、益母草、紫花地丁...

➤ 真菌類

- 冬蟲夏草、細曲、靈芝

➤ 動物類

- 阿膠、海馬、蛤蚧、蜈蚣、塞隆骨、麝香...



政府中藥檢測中心方法



植物類中藥材的 DNA 條形碼檢測方法

05. 「植物類藥材DNA
條形碼檢測法」及「中
藥材參考DNA序列庫」

GCMTI 的DNA研究計劃

透過計劃，共開發了4個DNA檢測方法

- 植物類中藥材的DNA條形碼檢測法
- 動物類中藥材的DNA條形碼檢測法
- 以DNA技術作為鑒別鹿茸的互補檢測方法
- 川貝母中常見摻雜品 – 平貝母的DNA 鑒別方法

建立中藥材參考DNA序列庫

- 詳情可參閱以下連結:

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



「植物類藥材DNA條形碼檢測法」



檢測方法的特點

- 建立及確認植物類藥材的DNA條形碼檢測法及品質控制系統
- 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
- 根據香港實驗所認可計劃的品質管理規定

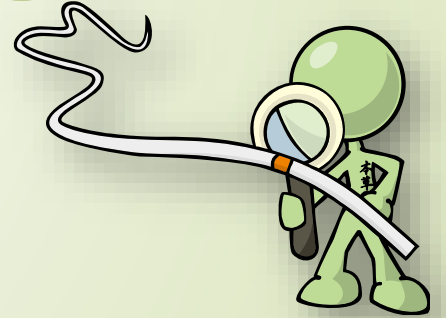


DNA條形碼分子鑒定法

- 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
- 方法中提供的植物類DNA條形碼包括
 - ITS2
 - *psbA-trnH*
 - *rbcL*

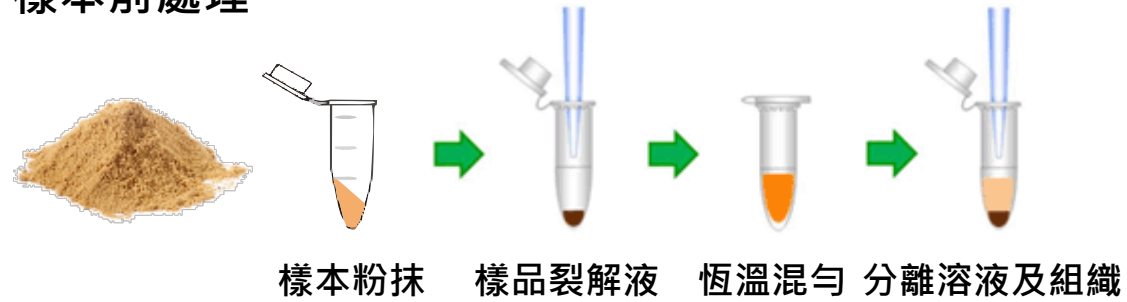


方法步驟

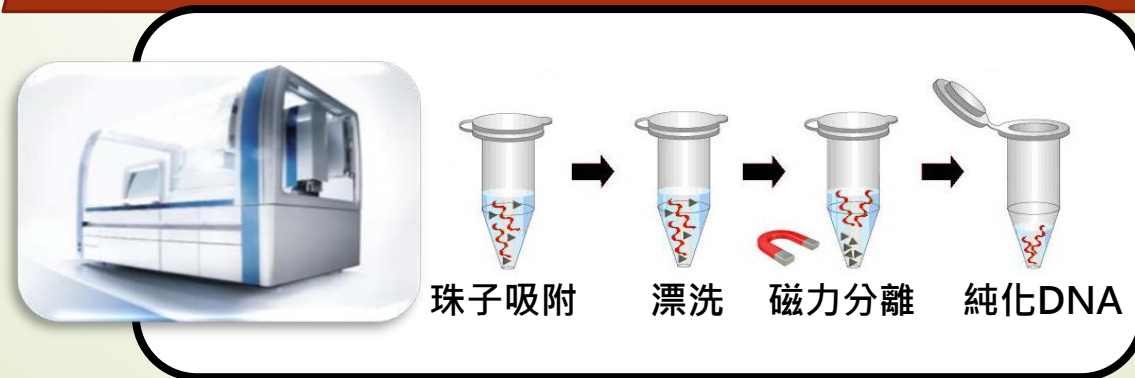


操作流程 - DNA提取

樣本前處理



自動化DNA提取

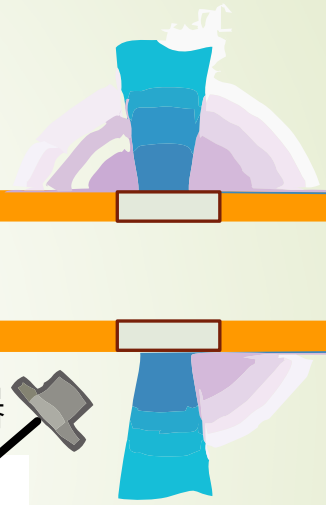
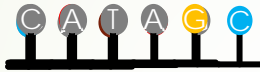


PCR擴增DNA條形碼



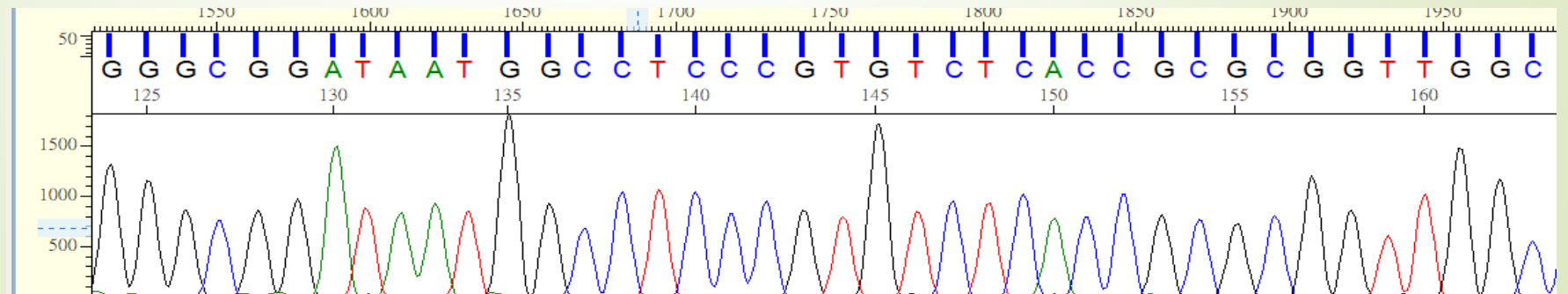
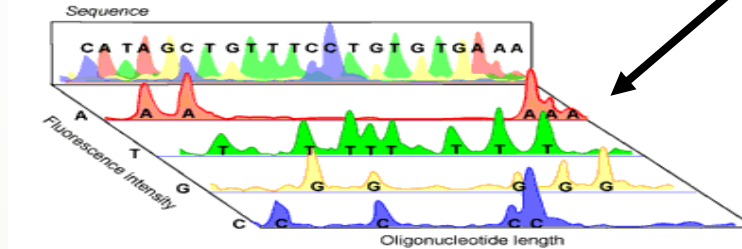
操作流程 - 測序分析

毛細管陣列 (聚合物及電緩衝液)



螢光探測器

DNA序列結果

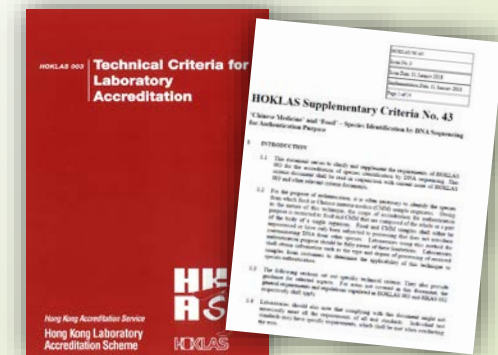


植物類中藥材的DNA條形碼檢測法



品質管理系統

- 每個主要步驟的檢查點
- 確保測試的可靠性



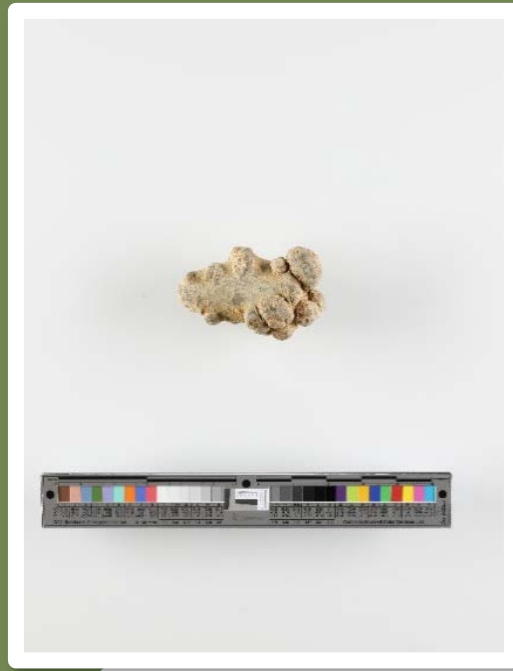
「中藥材參考DNA序列庫」



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	密封数量	2.5 kg
产地或采集地	云南省文山县	密封包装	双层塑袋
鉴定项目	植物基源	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	张继 (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)



參考DNA序列

GCMTI P5-2020-1

Reference DNA Sequence

Plant Specimen

DNA Information

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

```
#RD90-A ITS2
CGCATCAGCGCGCCGCCAAGCCATCCTCCCTGGCGGGGA
GTGAGGCGGAGAGGGCGGATTAAGGCCCTCCCGTGTCTCA
CCGCGCGGTTGGCCCAAAATCGGAGTCCCTGGCGATGGAC
GTACAGACAGAGTGGTGGTTGTA AAAAGCCCTCTCTCATG
TCGTGGCGGTGACCCCTGCCAGCAAAAGCTCTCATGACCC
TGTGGCGCGTCTCGACGTGGCTCCGAGCCG
```

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

```
#RD90-A psbA-trnH
ATAACTTCCTAGACCTAGCTGCTGCGAAGCTCCATC
TACAAATGGATAAGACCCGGCTTAAGTGTATACGAGTTTT
TTTGAATAAAAAGGAGCAATAAACCTTTCCTGTCTAT
CAADAGGGCGGATTCCTCTTTTAAATTAAGTAGTATTT
GACTTACCTAGTTTCTTAAATAAATTA AAAAAGCCGCG
TTTTATTTTATCGGTTGGCTCATGAGTGAATATCTGCTT
TCGTTCTGTATTAATCATAAATCAGAAATTAAGCACTCTT
TCCCAATCTTATCTTTTGGGAAAGTTTTTAAAGAGAA
AAGATAAAAATGTGGACCTTTTACTTAAATACCTTAA
TATTTTATCTCGAAAATAAGAAAGATAAGAAAGAAATA
ATGATGAAATGGTAAAAATTAATCTTTTGAAGAGTAAAG
AAAAGAAATAGTAAAGGGGGCGGATGTAACCAAGTGGATCA
AACCAGT
```

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

```
#RD90-A rbcL
AAGTGTGGATTCCAAAGCTGGTGTAAAGATTACAAATG
ACTTATTAATCTCCGACTATGATCCCAAAGATACTGATA
TCTGGCGAGCATTCGAGTAACCTCTCAACCTGGAGTCCC
AGCTGAAAGAGCGGGGGCCCGGATGCTCCGAACTTC
TACTGGTACATGGCAACTGTGTGGACCGATGGACTTACT
AGCTCTGATCTGTACAAAGGGCGATCTACAAAATGAGAG
CCGTTGCTGGAGAGAGAACTCAATTAATCTTATGTATG
CTACCCATAGACCTTTTGAAGAAAGCTCTGTAACTAA
CATGTTTACTTCCATTGTAGGTAATGATTTGGGTTCAA
GGCTGCTGCTCTACCTCGAAGATCTCGGAAATCCCTG
TTGCTATGTTAAAACTTTCGAAGGCCCTCAATGCAAT
CCAAGTTGAGAGAGATAAATGAAAGAGTATGGTCTGGC
CTGTGGGATGTACTATAAATCTAAATGGGCTATCT
GCTAAAAACTACGGTAGAGCGGTTATGAAATGCTC
```

Reference Detail

Description of reference material	Plant specimen
Scientific name	<i>Panax ginseng</i> C.A. May
Laboratory number	RD90
Sample mark	RD90-A
Locality	Azu, Jian Province, China
Corresponding CMM	RD82
Authenticated	Yes

Image

GCMTI P5-2020-1

Reference DNA Sequence

Chinese Materia Medica (CMM)

DNA Information

Internal transcribed spacer 2 of nuclear ribosomal RNA (ITS2)
Batch ID: BI180611

```
#RD82-1A ITS2
CGCATCAGCGCGCCGCCAAGCCATCCTCCCTGGCGGGGA
GTGAGGCGGAGAGGGCGGATTAAGGCCCTCCCGTGTCTCA
CCGCGCGGTTGGCCCAAAATCGGAGTCCCTGGCGATGGAC
GTACAGACAGAGTGGTGGTTGTA AAAAGCCCTCTCTCATG
TCGTGGCGGTGACCCCTGCCAGCAAAAGCTCTCATGACCC
TGTGGCGCGTCTCGACGTGGCTCCGAGCCG
```

Chloroplast *psbA-trnH* intergenic spacer (*psbA-trnH*)
Batch ID: BI180611

```
#RD82-1A psbA-trnH
ATAACTTCCTAGACCTAGCTGCTGCGAAGCTCCATC
TACAAATGGATAAGACCCGGCTTAAGTGTATACGAGTTTT
TTTGAATAAAAAGGAGCAATAAACCTTTCCTGTCTAT
CAAGAGGGCGGATTCCTCTTTTAAATTAAGTAGTATTT
GACTTACCTAGTTTCTTAAATAAATTA AAAAAGCCGCG
TTTTATTTTATCGGTTGGCTCATGAGTGAATATCTGCTT
TCGTTCTGTATTAATCATAAATCAGAAATTAAGCACTCTT
TCCCAATCTTATCTTTTGGGAAAGTTTTTAAAGAGAA
AAGATAAAAATGTGGACCTTTTACTTAAATACCTTAA
TATTTTATCTCGAAAATAAGAAAGATAAGAAAGAAATA
ATGATGAAATGGTAAAAATTAATCTTTTGAAGAGTAAAG
AAAAGAAATAGTAAAGGGGGCGGATGTAACCAAGTGGATCA
AACCAGT
```

Chloroplast ribulose biphosphate carboxylase large chain (*rbcL*)
Batch ID: BI180611

```
#RD82-1A rbcL
AAGTGTGGATTCCAAAGCTGGTGTAAAGATTACAAATG
ACTTATTAATCTCCGACTATGATCCCAAAGATACTGATA
TCTGGCGAGCATTCGAGTAACCTCTCAACCTGGAGTCCC
AGCTGAAAGAGCGGGGGCCCGGATGCTCCGAACTTC
TACTGGTACATGGCAACTGTGTGGACCGATGGACTTACT
AGCTCTGATCTGTACAAAGGGCGATCTACAAAATGAGAG
CCGTTGCTGGAGAGAGAACTCAATTAATCTTATGTATG
CTACCCATAGACCTTTTGAAGAAAGCTCTGTAACTAA
CATGTTTACTTCCATTGTAGGTAATGATTTGGGTTCAA
GGCTGCTGCTCTACCTCGAAGATCTCGGAAATCCCTG
TTGCTATGTTAAAACTTTCGAAGGCCCTCAATGCAAT
CCAAGTTGAGAGAGATAAATGAAAGAGTATGGTCTGGC
CTGTGGGATGTACTATAAATCTAAATGGGCTATCT
GCTAAAAACTACGGTAGAGCGGTTATGAAATGCTC
```

Reference Detail

Description of reference material	Radix Ginseng
Scientific name	<i>Panax ginseng</i>
Laboratory number	RD82
Sample mark	RD82-1A
Locality	Azu, Jian Province, China
Corresponding plant voucher specimen	RD90 and RD 99
Authenticated	Yes

Image

01

02

01 樣本資訊

02 樣本圖片

03 DNA條形碼

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

憑證樣本(包括臘
葉標本、經鑒別中
藥材樣本)

三個



參考DNA序列資料表 (植物類)

人參

三七

雪蓮花

使君子

川貝母(暗紫貝母)

委陵菜

西洋參

桔梗

防風

川貝母(川貝母)

太子參



「利用特異性聚合酶鏈式反應區分兩種真
品鹿茸的物種」



鹿

- 全身是寶
- 根據《中華人民共和國藥典》，以鹿入藥的計有鹿角、鹿茸、鹿角膠，和鹿角霜四種藥材
- 市面上還有鹿尾羝、鹿鞭、和鹿筋等製品
- 當中以鹿茸最名貴



鹿茸

- 鹿科雄鹿未骨化密生茸毛的幼角
- 具壯腎陽、益精血、強筋骨等功效
- 根據《中醫藥條列》（第549章）及《中國藥典》2015年版，鹿茸的來源物種為梅花鹿和馬鹿
- 鹿茸屬名貴藥材，需求大而產量有限，因此偽品常見於市場
- 根據一些鹿茸的研究報告及文獻記載，部份鹿茸製品實際來源自馴鹿、水鹿

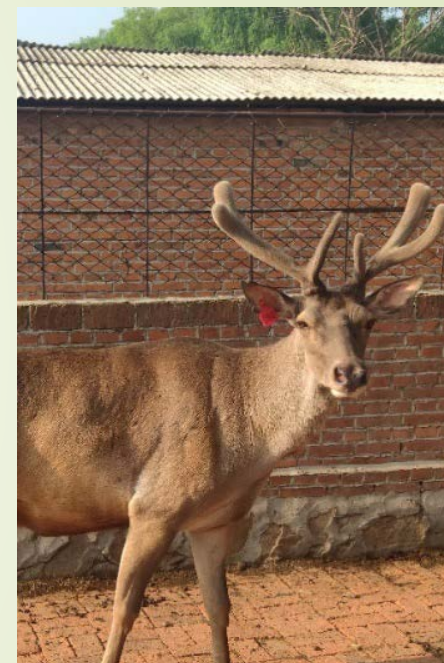


特點

- 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



梅花鹿 *C. nippon*



馬鹿 *C. elaphus*



現時的鹿茸鑒別方法

- ▶ 性狀鑒別法可快速準確地鑒別鹿茸原藥材
 - ▶ 但亞洲地區出售的鹿茸大都會切成飲片，因失去了明顯性狀特徵所以較難作出判別



現時的鹿茸鑒別方法

- 化學手段
 - 受測藥材必需含有獨特的化學標識物
- 動物類藥材大多成份相近
- 根據中國藥典，甘氨酸是測定鹿茸的薄層色譜的標識物
- 甘氨酸普遍存在於各種生物
 - 未必能區分梅花鹿和馬鹿



以DNA技術作為鑒別鹿茸的互補檢測方法

- 開發用於鑒別鹿茸飲片的脫氧核糖核酸(DNA)檢測方法
- 解決現時中藥業界未能有效鑒別鹿茸飲片的問題
- 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



方法步驟

樣本製備

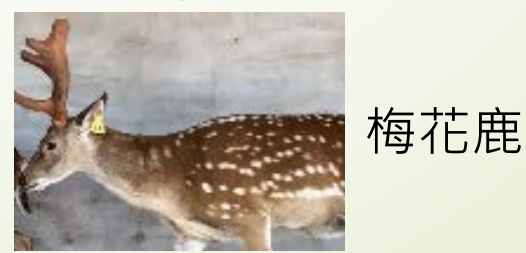
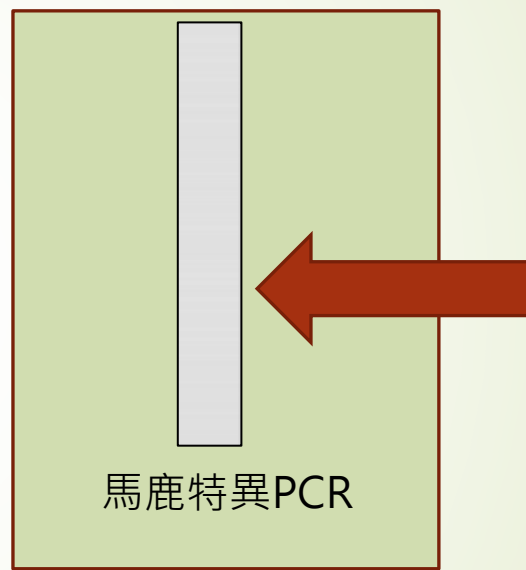
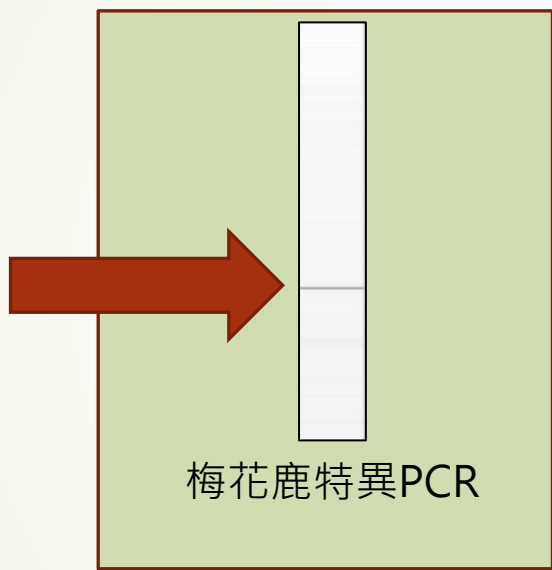
提取DNA

PCR擴增

電泳圖譜分析



原理



可檢測其他鹿產品嗎？



鹿茸



鹿鞭



鹿筋



鹿角



鹿腿肉



鹿成份湯包
(鹿筋)



會認錯其他動植物嗎？

類別	品種
其他鹿類	水鹿、馴鹿、麋鹿、白唇鹿
其他動物	水牛、家牛、綿羊、豬、雞、大頭鱈魚、歐洲無鬚鱈、綠青鱈、大西洋鱈、
植物	刺五加、馬鞭草、野葛
真菌	靈芝



「川貝母中常見摻雜品－平貝母的DNA 鑒別方法」



川貝母

- 常用名貴中藥材之一
- 野生資源為主
- 貨源長期緊缺
- 按性狀不同分別習稱為松貝、青貝、爐貝和栽培品



川貝母來源

以下百合科植物的乾燥鱗莖

- 川貝母 *Fritillaria cirrhosa* D. Don
- 暗紫貝母 *Fritillaria unibracteata* Hsiao et K. C. Hsia
- 甘肅貝母 *Fritillaria przewalskii* Maxim.
- 梭砂貝母 *Fritillaria delavayi* Franch
- 太白貝母 *Fritillaria taipaiensis* P. YI Li
- 瓦布貝母 *Fritillaria unibracteata* Hsiao et K. C. Hsia var. *wabuensis* (S. Y. Tang et S. C. Yue) Z. D. Liu, S. Wang et S. C. Chen



川貝母



暗紫貝母



川貝母市場情況

摻雜

- 在川貝母中摻入價格較低的平貝母
- 混雜其中

冒充

- 曾發現市面上中藥材湯包的包裝上，將「平貝母」標示為「川貝母」



平貝母來源

- 百合科植物平貝母 *Fritillaria ussuriensis* Maxim. 的乾燥鱗莖
- 生長年期較短
- 外型與松貝相似



項目背景

研究計劃

- 開展 “川貝母中常見摻雜品 – 平貝母的DNA鑒別方法” 研究計劃

目的

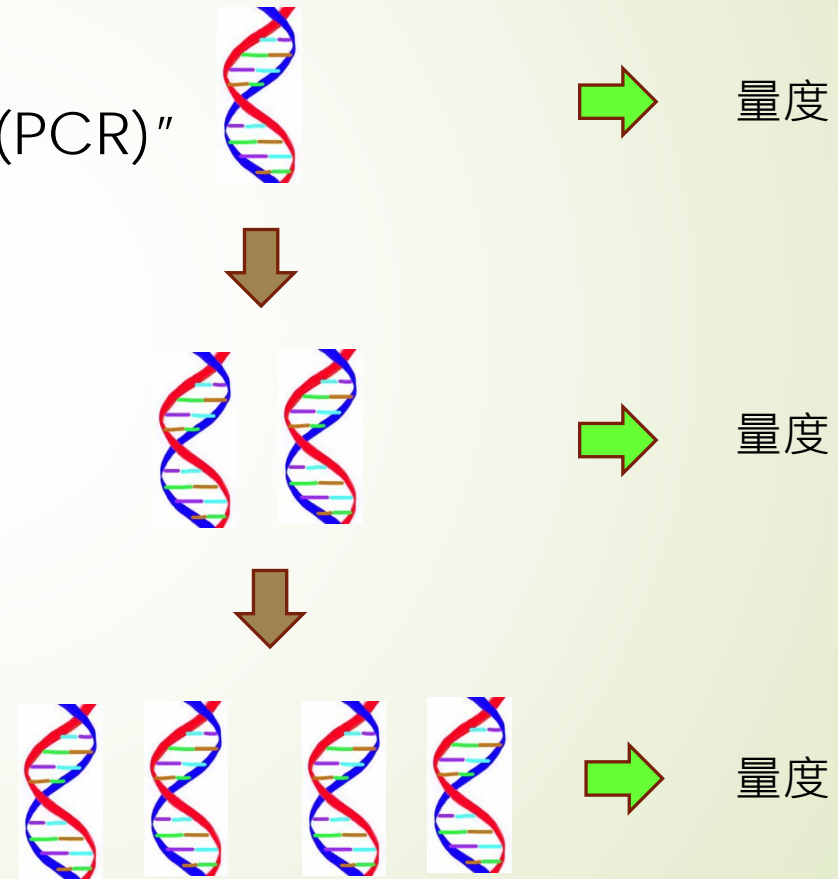
- 提供補充檢測方法供業界參考使用
- 與現行鑒別方法互補不足



實時-聚合酶鏈式反應 (Real-time PCR)

定義

- “實時 (real-time)” + “聚合酶鏈式反應 (PCR)”
- 螢光試劑 (fluorescent reagent)
- 螢光訊號會隨著PCR產物的累積而增加
- 實時-聚合酶鏈式反應儀
 - 進行PCR
 - 每一個循環完成後，量度螢光訊號
 - 擴增曲線 (amplification plot)



方法簡介

應用特點

- 檢出川貝母的混淆品 - 平貝母；
- 適用於混合中藥材粉末；
- 高專屬性



GCMTI RD-1:2022

GCMTI method publications



Identification of *Bulbus Fritillariae Ussuriensis*

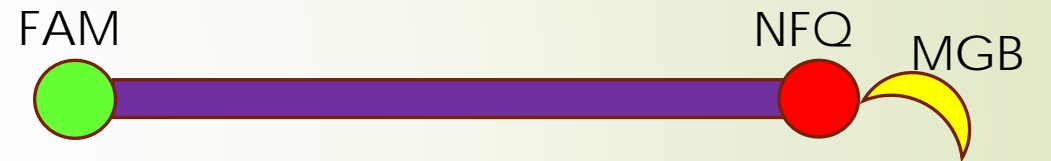
**– a common adulterant found in *Bulbus Fritillariae Cirrhosae*
by qualitative real-time polymerase chain reaction method**

GCMTI RD-1:2022



技術特點

- 定性方法，無需標準曲線 (standard curve)
- TaqMan探針
- 5' FAM
- 3' NFQ
- 3' MGB，提高分辨能力
- 特異性擴增分析-引物/探針組合 (SA)
- 內源陽性擴增對照分析-引物/探針組合 (IPAC)
- 質體DNA



引物/探針組合

	特異性擴增分析 (SA)	內源陽性擴增對照分析 (IPAC)
性質	特異性	廣譜性
功能	偵測平貝母	確定提取的貝母類DNA 可被PCR擴增
探針與平貝母互補	✓	✓
探針與川貝母互補	✗	✓



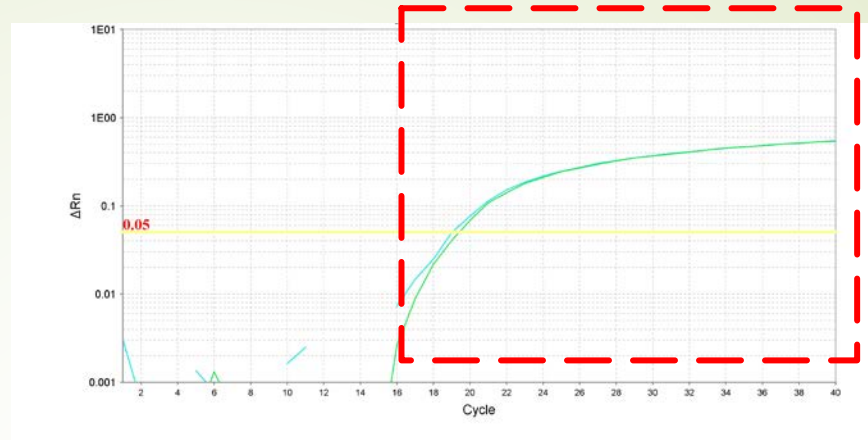
儀器及設備

- 高壓斧
- 粉碎機、研磨機、研磨管
- 剪刀及鑷子
- 移液器
- 層流櫃
- 恆溫混勻儀
- 紫外-可見光分光光度計
- 離心機
- 實時聚合酶鏈式反應儀

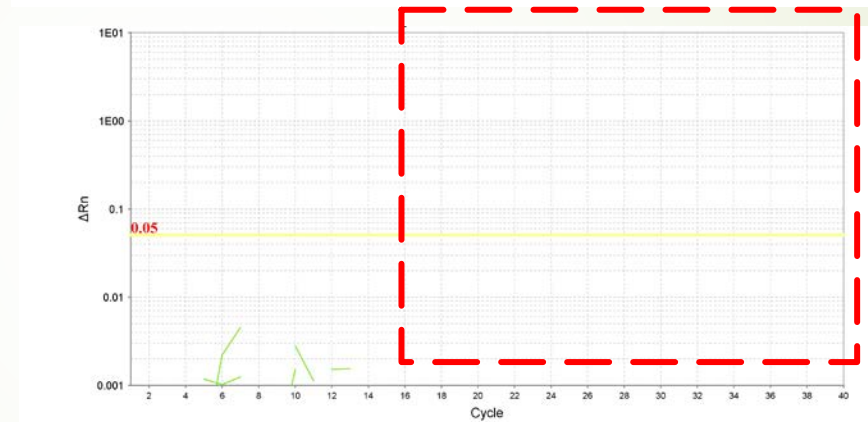
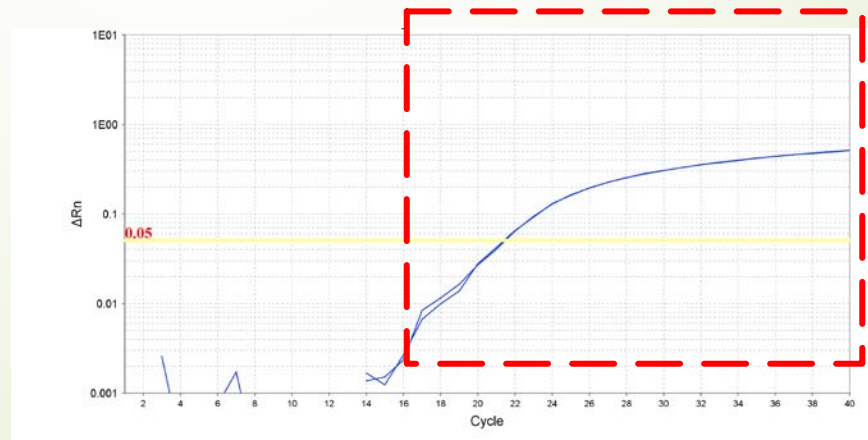


例子

A) 平貝母樣本



B) 川貝母樣本

C) 在川貝母樣本
摻入平貝母

方法學考察 – 其他植物

- 人參、川芎、化橘紅(柚)、牛膝、玄參、甘草、地黃、白朮、鐵皮石斛、艾葉、西洋參、西紅花、苦杏仁、牡丹皮、防風、金銀花、南沙參、穿心蓮、紅花、重樓、射平、北柴胡、桔梗、救必應、北細辛、麥芽、中麻黃、鈎藤、蒙古黃芪、膜莢黃芪、當歸、葛根、陳皮、蓮子、澤瀉、薄荷、雞血藤



人參



西洋參



政府中藥檢測中心

GOVERNMENT CHINESE MEDICINES
TESTING INSTITUTE

操作建議

實驗
Experiments
臨床
Clinical Practices
文獻
Literatures

文化資源

自然資源



DNA檢測的考慮

污染來源

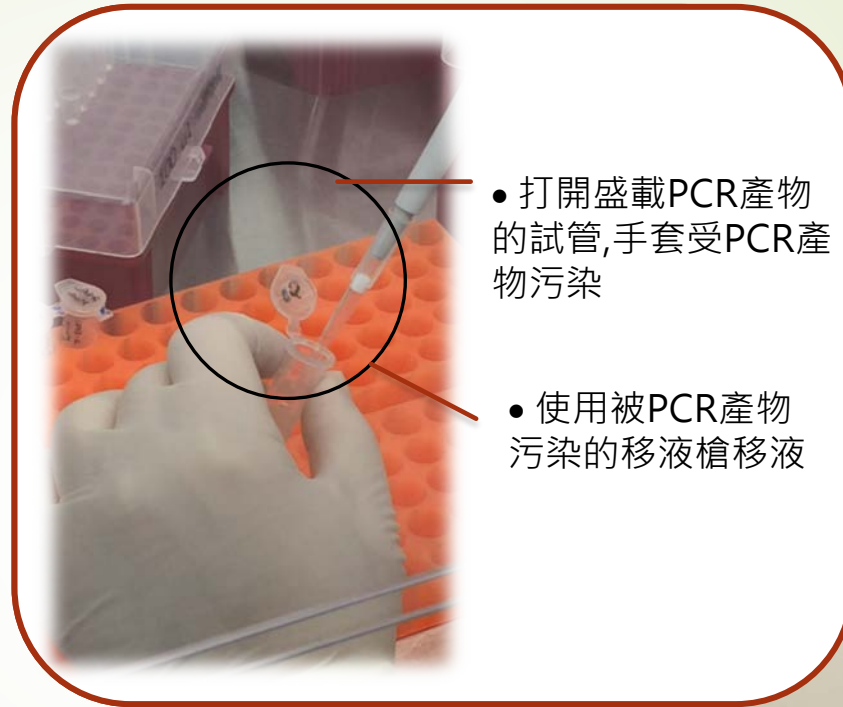
- 樣品交叉污染
- 樣品受環境污染
- 試劑污染
- PCR擴增物污染



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

前PCR 後PCR

提取DNA

PCR擴增

結果分析



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



對照物



試劑盒



樣本



測試中間產物



分裝試劑



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



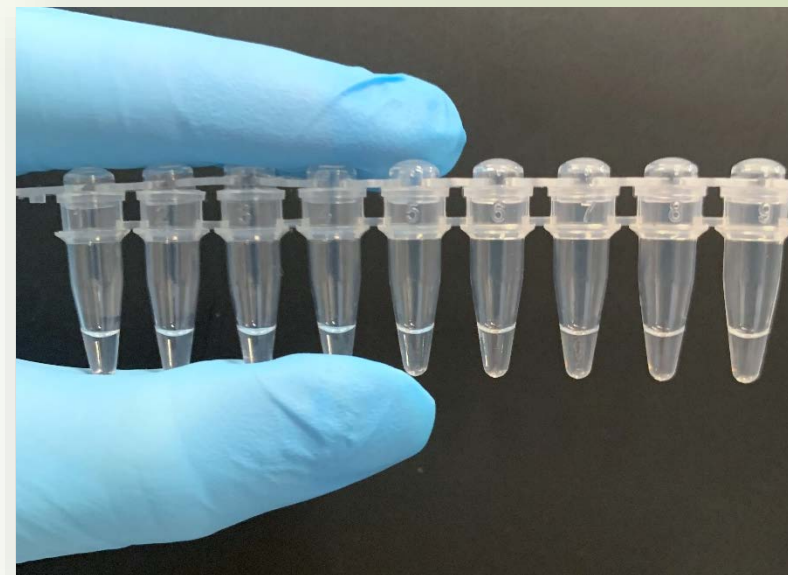
防止污染措施

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

- DNA是生命的藍圖，透過測試生物的DNA特徵以識別來源品種
- 隨著DNA技術的進步，已發展出多種DNA檢測方法，例如DNA條形碼、DNA指紋圖譜等，與大眾生活息息相關
- 多國藥典亦已採納DNA檢測方法作為草藥/中藥材的補充方案
- 政府中藥檢測中心開發中藥材的DNA檢測方法，供大眾及相關業界免費參考使用



謝謝

政府中藥檢測中心

網址：

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

電郵地址：

gcmti@dh.gov.hk

