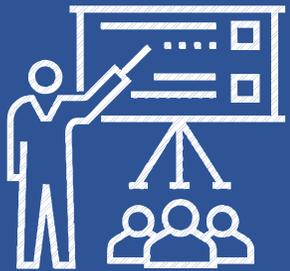


Chinese Medicine Regulatory Office  
Department of Health  
衛生署中醫藥規管辦公室



Identification of *Bulbus Fritillariae Ussuriensis* in the presence of  
*Bulbus Fritillariae Cirrhosae* by DNA method  
川貝母中常見摻雜品 – 平貝母的DNA 鑒別方法

黃家樂

2022年11月4日



# 內容

項目背景

技術原理

方法介紹

操作建議

Q & A

政府中藥檢測中心

GOVERNMENT CHINESE MEDICINES  
TESTING INSTITUTE

文化資源

實驗  
Experiments  
臨床  
Clinical Practices  
文獻  
Literatures

自然資源



# 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



# 多學科鑒別手段



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

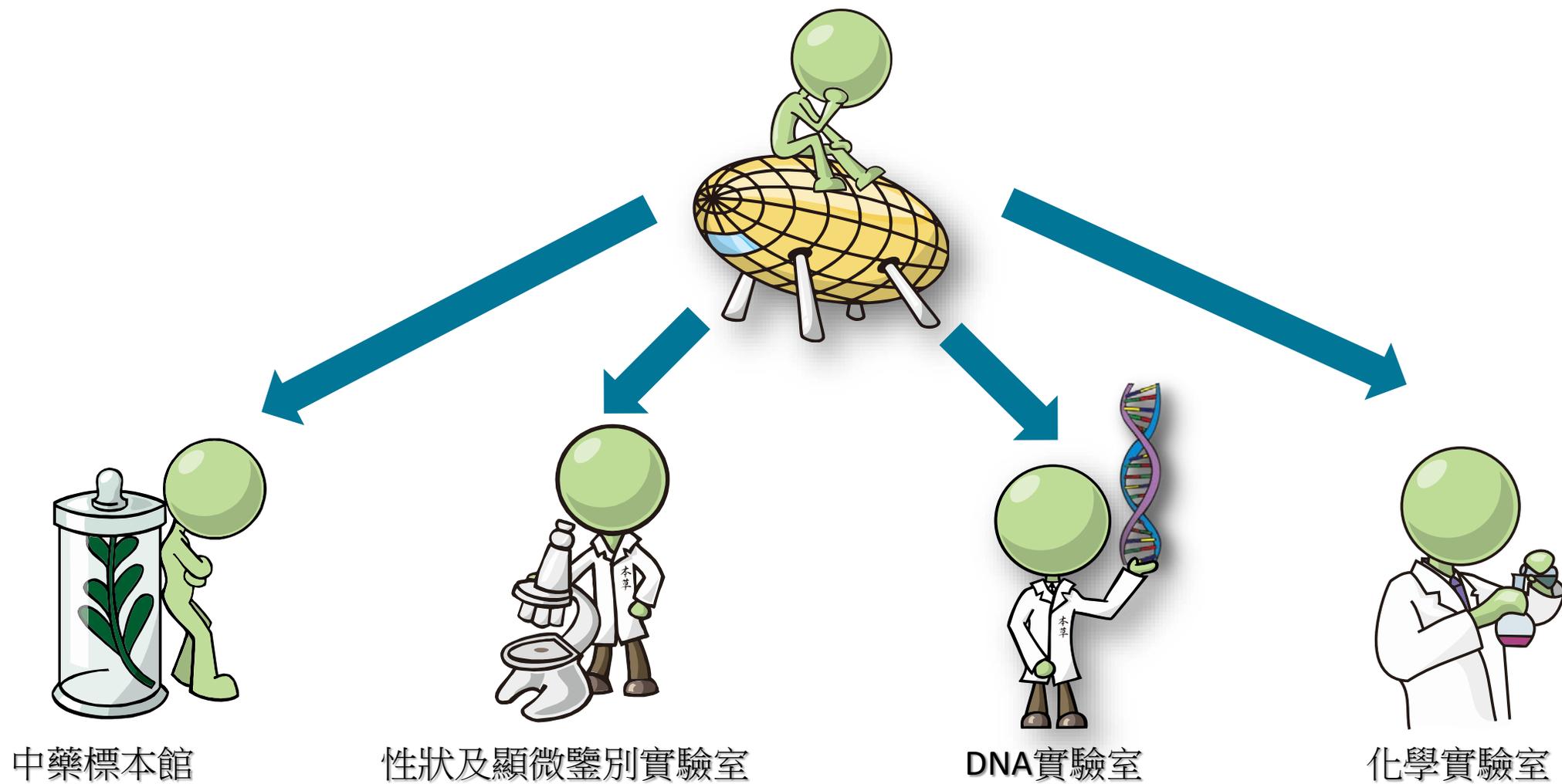


理化鑒別

DNA分子鑒別



# 實驗室



# 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



# 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



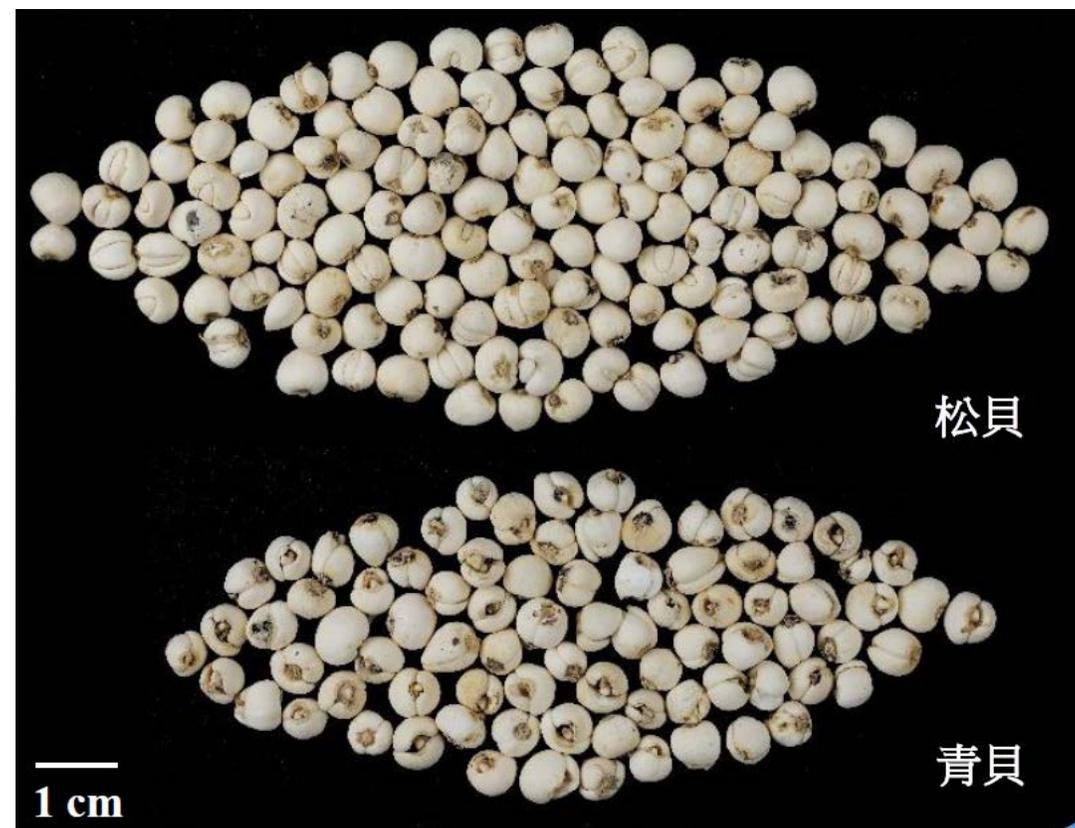
## 教育

分享會(進修學分供中醫業界)  
工作坊



# 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. Yl 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



# 貝母的功能比較

川貝母	平貝母
清熱潤肺，化痰止咳	清熱潤肺，化痰止咳
有散結消癰	

➔ 功能有一定差異，臨床上應區別使用



# 貝母的性狀鑒別

- 香港容易混淆中藥的性狀及顯微鑒別研究



# 區分川貝母和平貝母

## 性狀鑒別法

- 快速準確
- 市售川貝母粉末
- 失去明顯性狀特徵



## 化學分析

- 近緣物種
- 獨特指標含量低
- 需複雜手段



# DNA 鑒別技術

## 優點

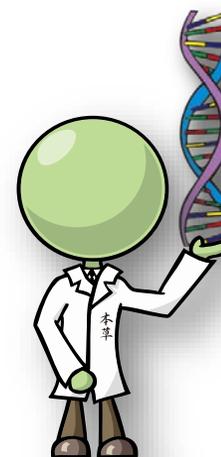
- 分辨能力強
- 基源品質管理

## 限制

- 無法作中藥材的品質評估
- 相對其他鑒別方法，操作較複雜

## 適用於

- 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



# 現行川貝母 DNA 鑒別方法

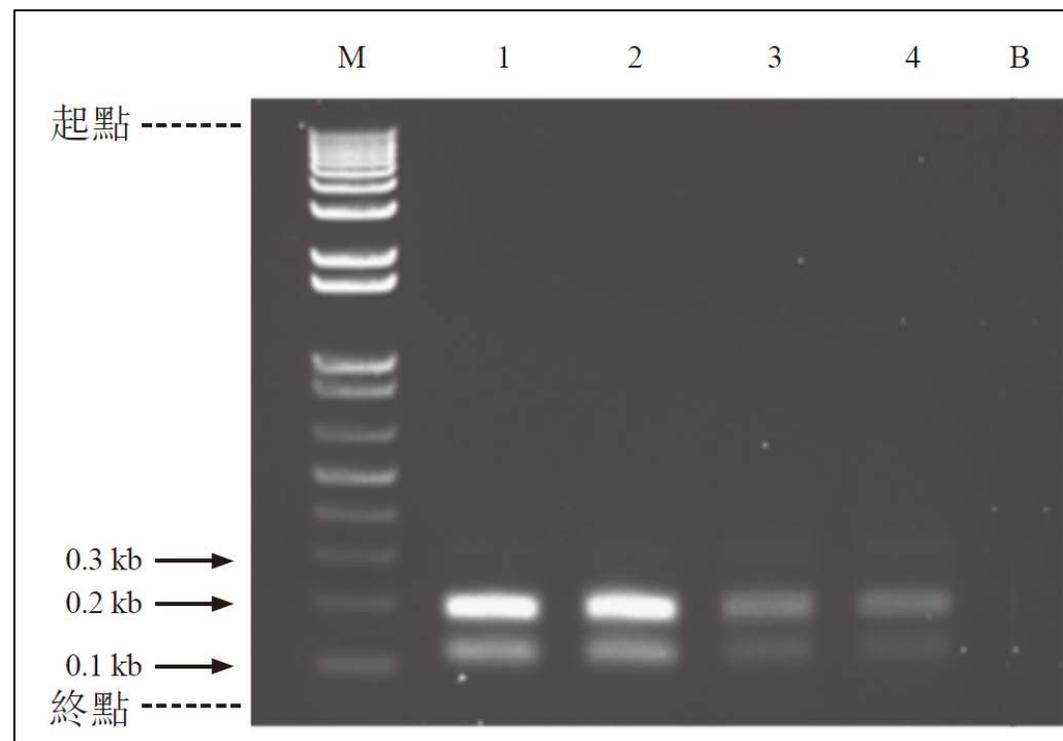
## PCR-RFLP

- 2020年版《中華人民共和國藥典》  
(《中國藥典》)
- 《香港中藥材標準》第七冊 (港標)

## DNA條形碼

- ITS2, *psbA-trnH*, ...

➔ 但不適合於中藥材混合粉末



《港標》第七冊



# 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



政府中藥檢測中心  
GOVERNMENT CHINESE MEDICINES  
TESTING INSTITUTE

技術原理

實驗  
Experiments  
臨床  
Clinical Practices  
文獻  
Literatures

文化資源

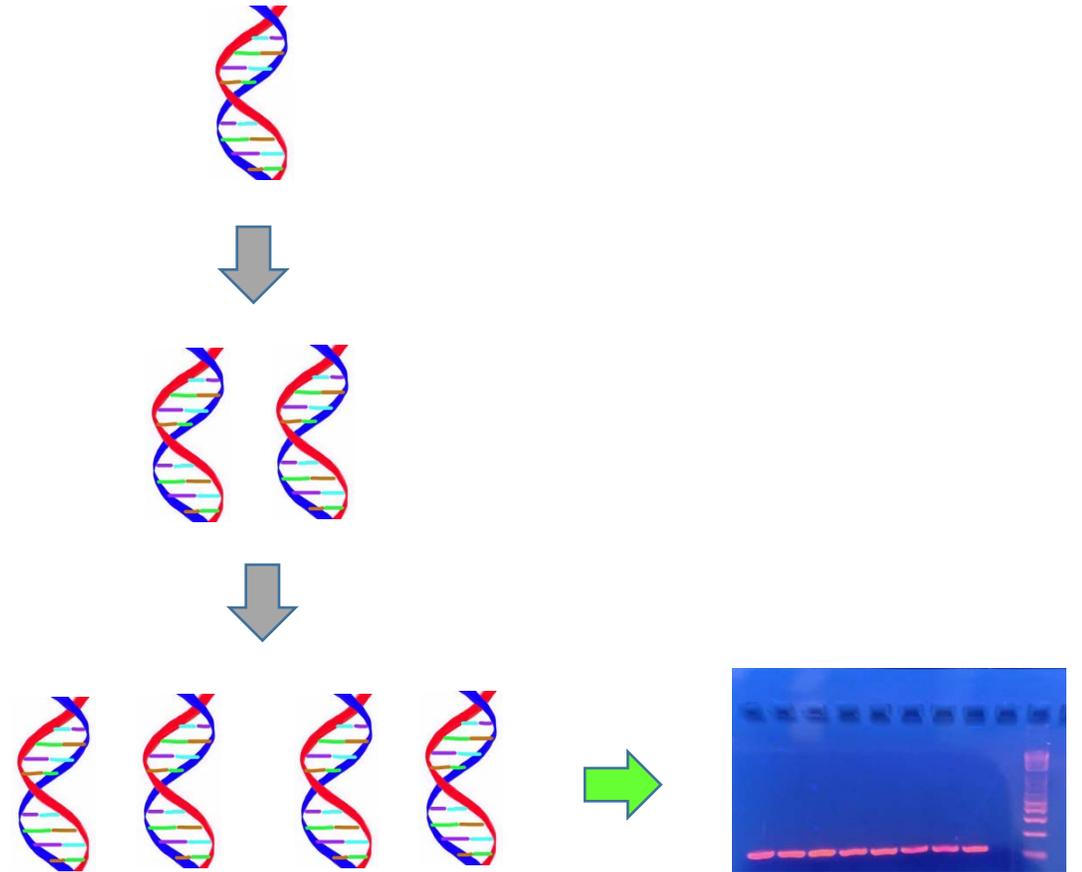
自然資源



# 聚合酶鏈式反應

## Polymerase chain reaction (PCR)

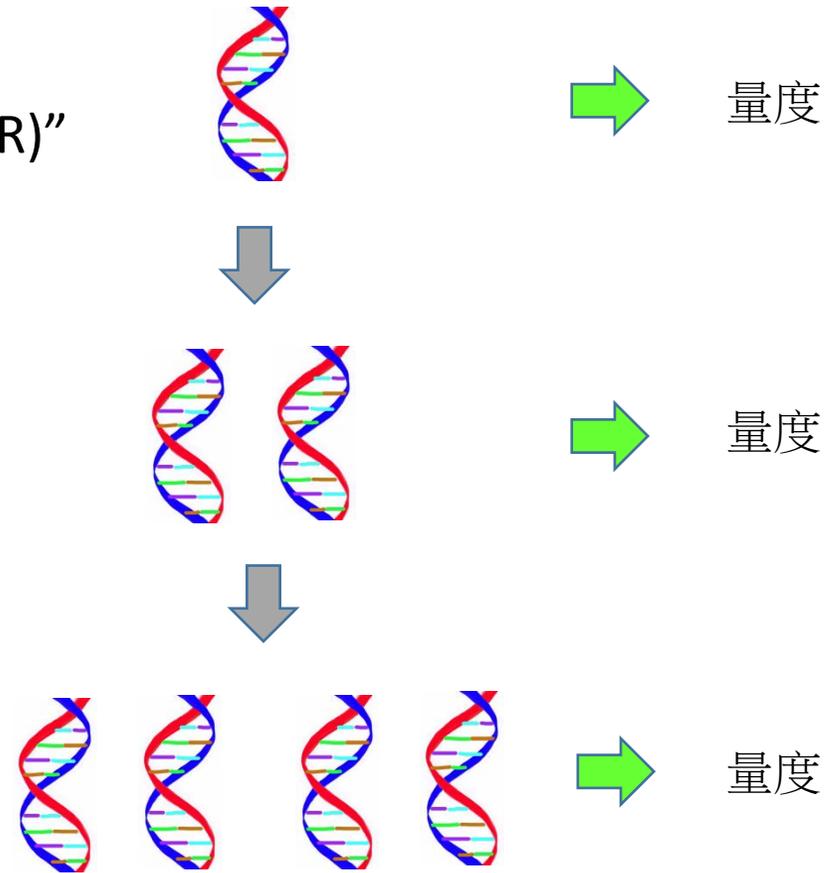
- 將基因組(genome)上特定位置的DNA複製、擴增
- 循環數(cycle number) 20 – 45不等
- 達至可檢測水平
- 現時DNA檢測方法的核心組成
- 發展出多種以PCR為基礎的技術，例如實時-聚合酶鏈式反應(real-time PCR)等



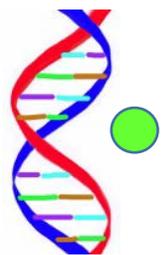
# 實時-聚合酶鏈式反應 (Real-time PCR)

## 定義

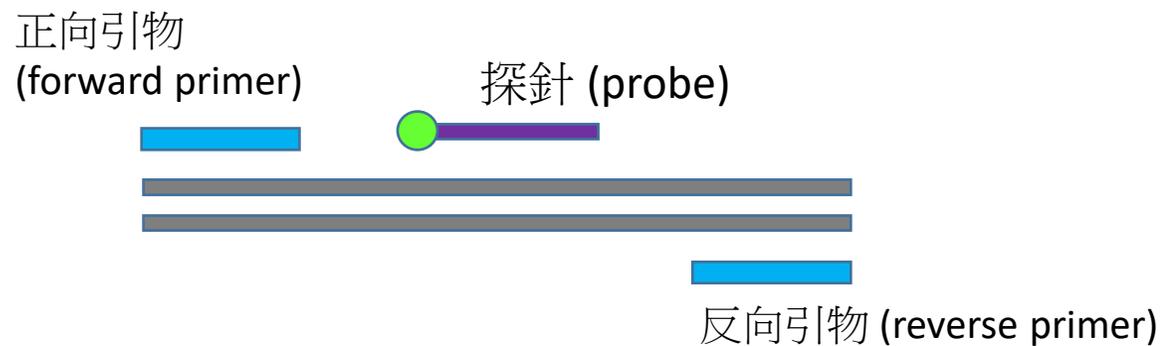
- “實時 (real-time)”+ “聚合酶鏈式反應 (PCR)”
- 螢光試劑 (fluorescent reagent)
- 螢光訊號會隨著PCR產物的累積而增加
- 實時-聚合酶鏈式反應儀
  - 進行PCR
  - 每一個循環完成後，量度螢光訊號
    - 擴增曲線 (amplification plot)



# Real-time PCR 的化學



- DNA-染劑結合式 ✓



- 引物/ 探針-染劑連接式
  - TaqMan 探針 ✓
  - Molecular beacons
  - Scorpion probes
  - Hybridization probes



# DNA - 染劑結合式

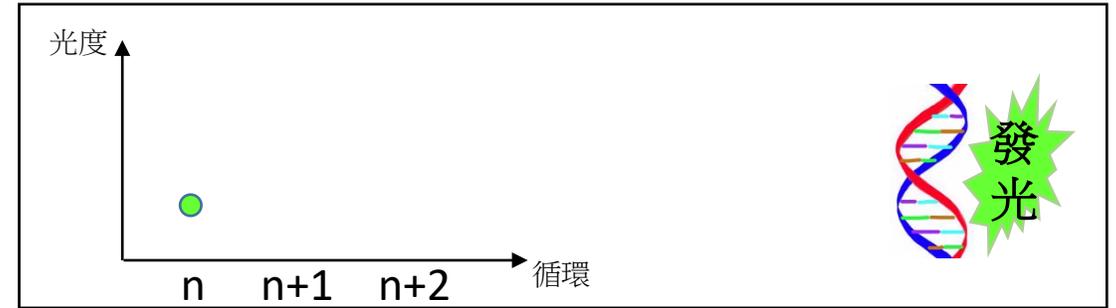
## 螢光物質

- 在反應中，加入螢光物質
- SYBR Green
  - 與雙股DNA嵌合，發出螢光
- 雙股DNA量增加，螢光訊號隨之增加

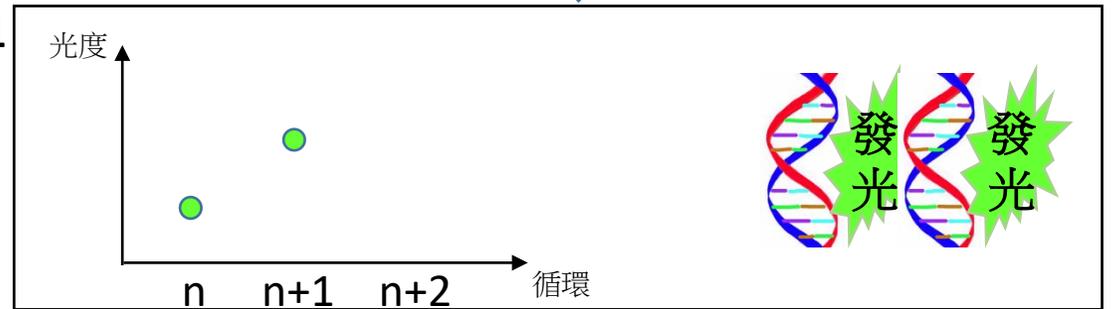
## 缺點

- 非專一性嵌合 (例如引物二聚體 (primer dimer))

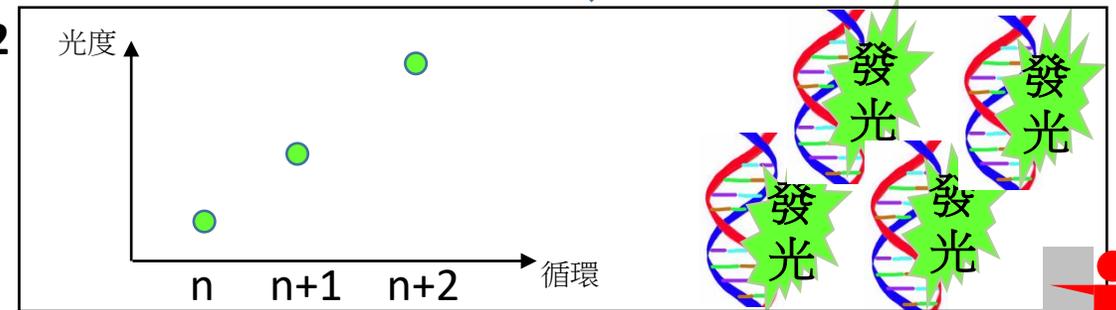
循環n



循環n+1



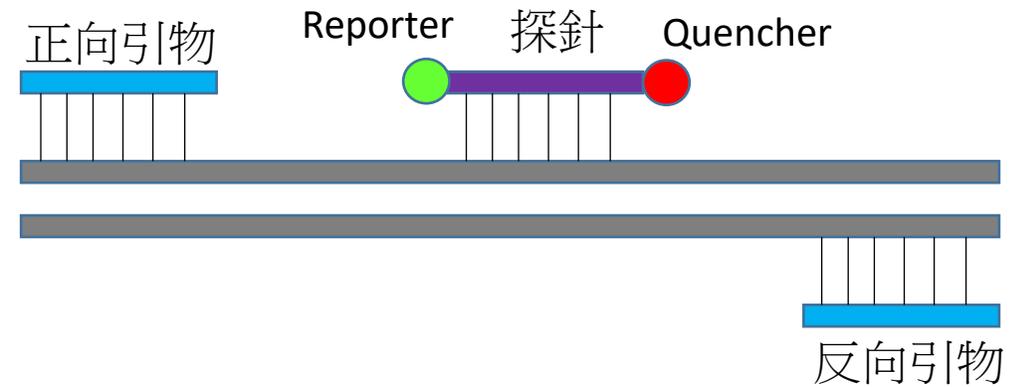
循環n+2



# TaqMan 探針

## 探針結構

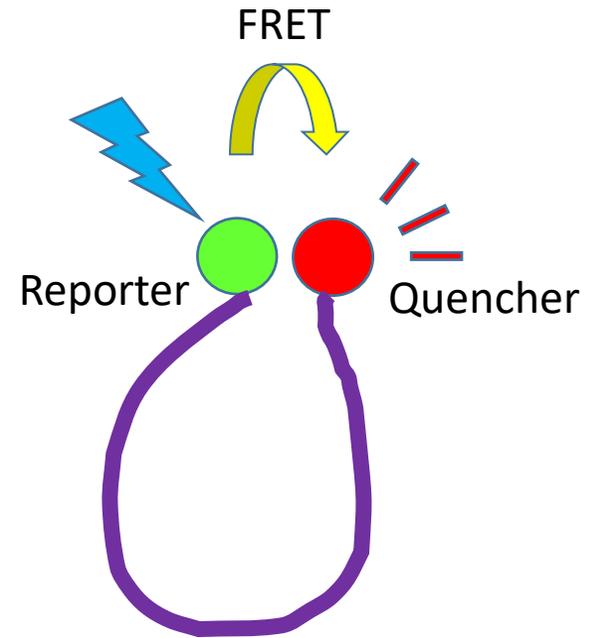
- 探針和引物一樣，屬於寡核苷酸 (oligonucleotide)
- 探針設計成跟PCR產物的一段互補
- 探針兩端都以共價鍵接上螢光物質
  - 5' 端接上 Reporter，能階(energy level) 較高，波長 (wavelength) 較短
    - 例如FAM、HEX、TET等
  - 3' 端接上Quencher，能階較低，波長較長
    - 例如NFQ、BHQ-1、DABCYL等



# Quencher 和 Reporter

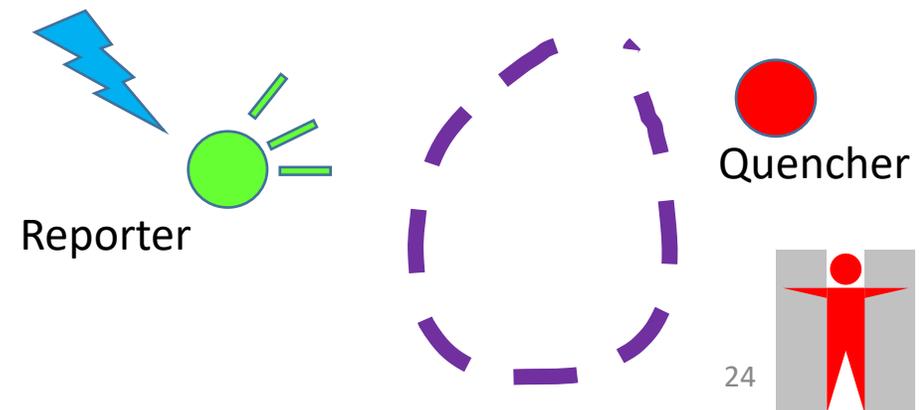
## 兩者被探針連着時

- 在游離態的狀態下，Reporter 發出的光在螢光共振能量轉移 (FRET) 的作用下，轉移至 Quencher
- Reporter 的光被遮蔽



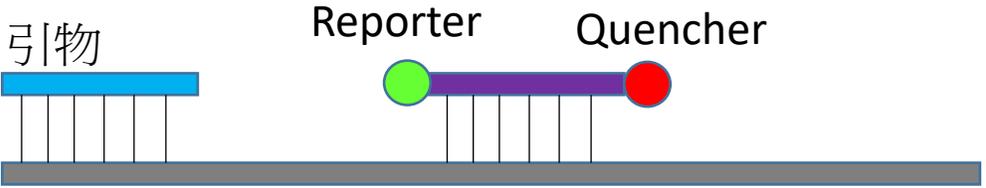
## 兩者分離時

- 當探針被水解後，Reporter 和 Quencher 分離
- 沒有螢光共振能量轉移(FRET)作用
- Reporter 的光被偵測

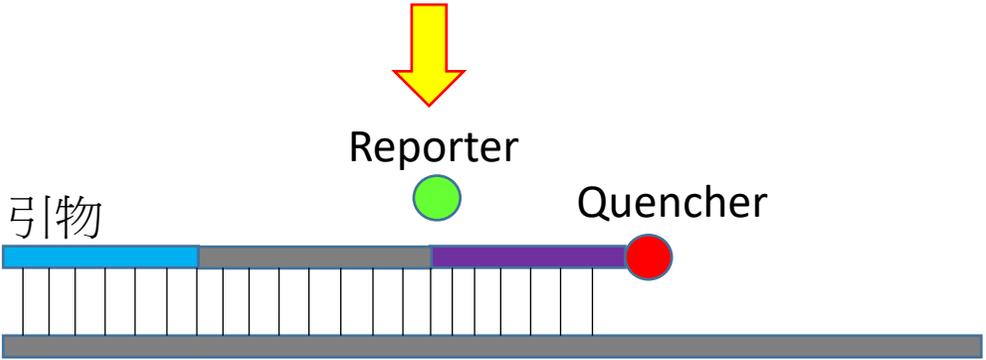


# TaqMan 探針

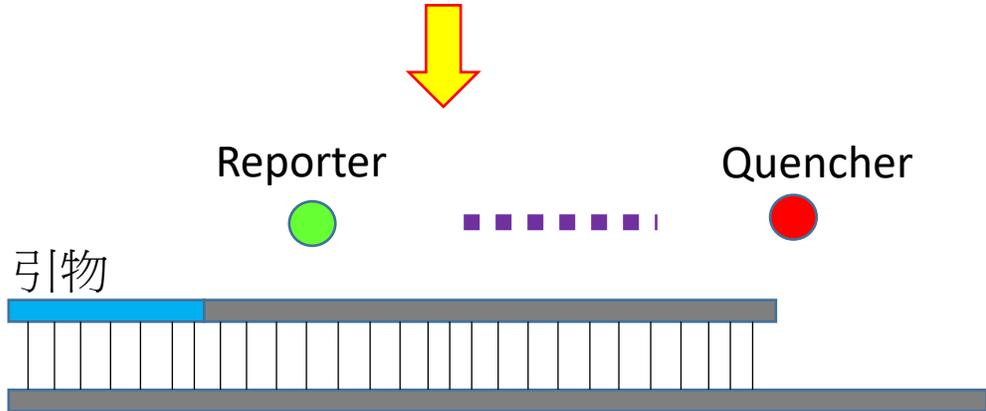
1



2



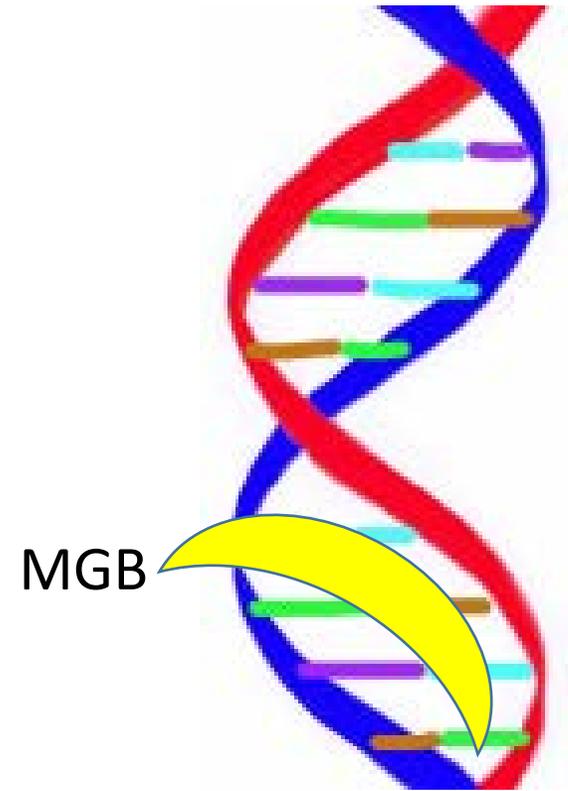
3



# Minor groove binder (MGB)

## 原理

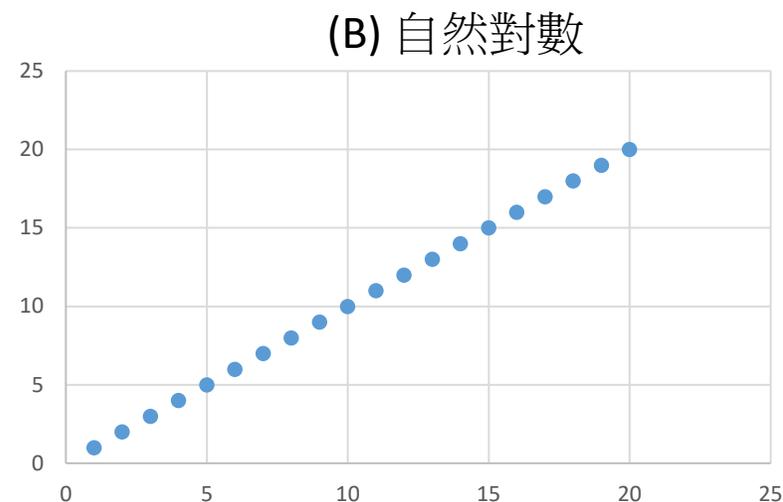
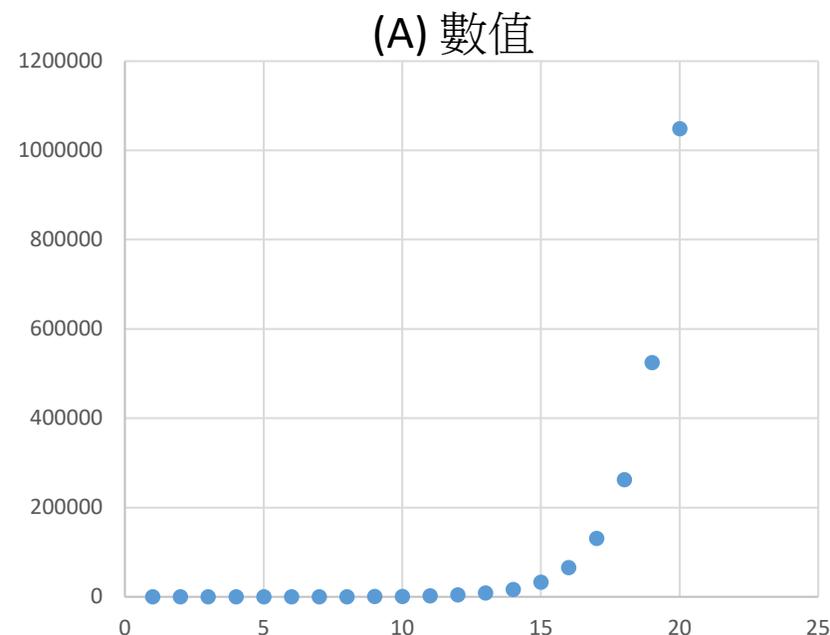
- 呈新月狀的分子
- 結合到DNA的小溝 (minor groove)
- 增加探針的熔解溫度 (melting temperature)
- 探針更短
- 增加分辨能力
- 區分物種



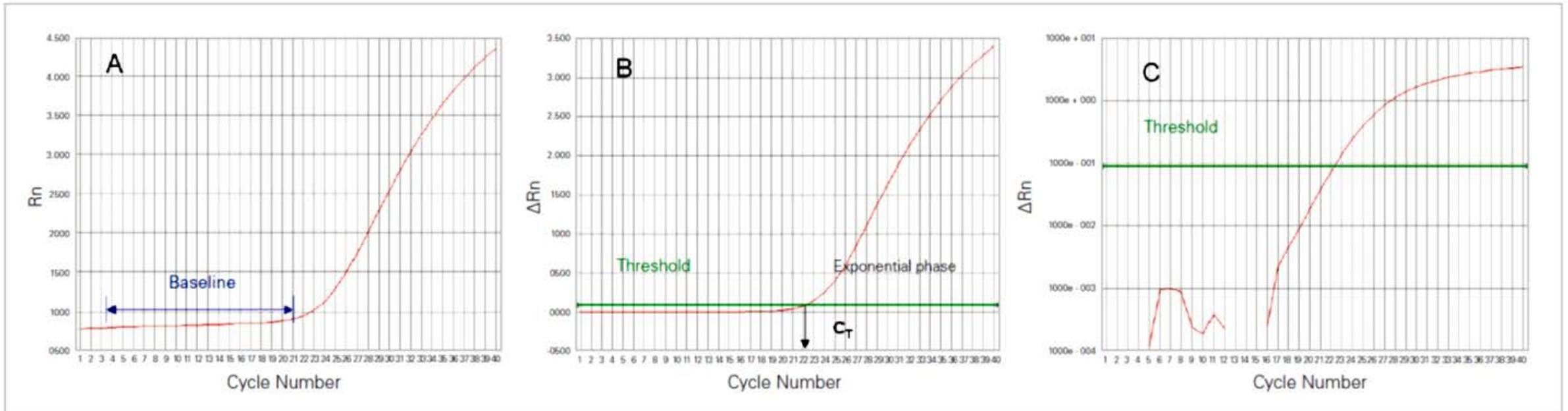
# Real-time PCR 產物生成量

## 表達方式

- 以對數增長 (基數為2)
- $2^1$ 、 $2^2$ 、 $2^3$ 、 $2^4$ 、 $2^5$ 、 $2^6$ 、 $2^7$ ..... $2^{20}$ 
  - $2^{20}$  的數值為1,048,576
- 2種圖表
  - 數值
  - 自然對數 (natural logarithm)



# Real-time PCR 擴增曲線



Rn: 螢光訊號

$\Delta Rn =$  螢光訊號 - 基線 (baseline)

$\text{Log}(\Delta Rn)$

Application note: real-time PCR: understanding Ct.  
Applied Biosystems 05/2008 Publication 136AP01-01



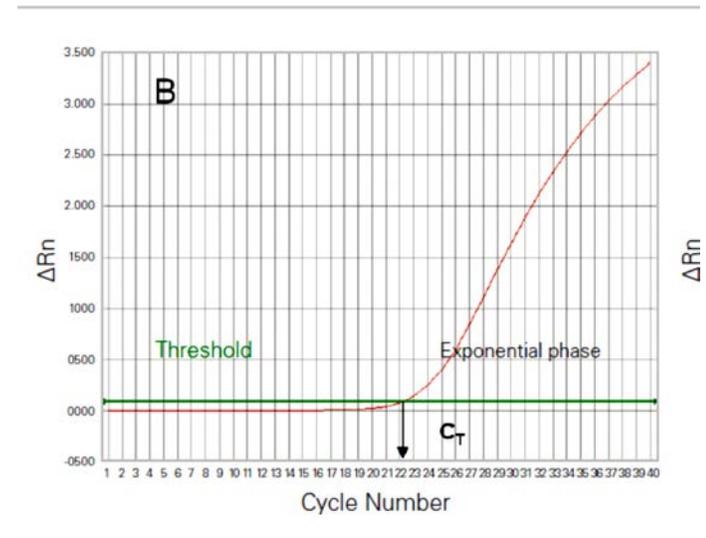
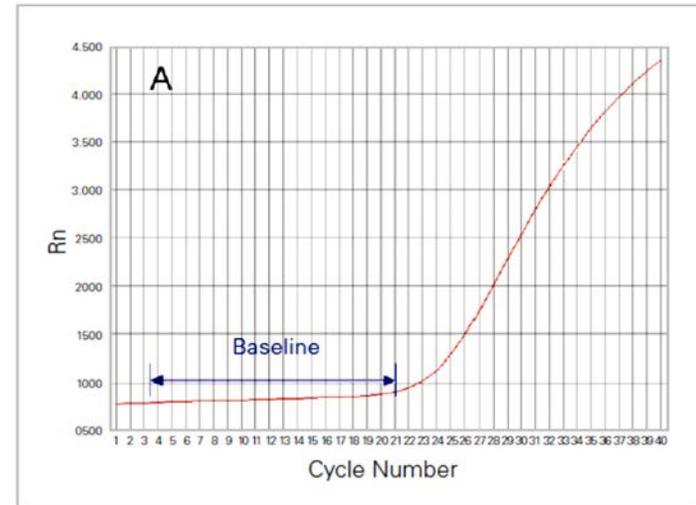
# Real-time PCR 擴增曲線

## 基線 (Baseline)

- Real-time PCR 起始期，模板DNA濃度低
- 螢光訊號只有少量變化
- Real-time PCR 的背景訊號
- 第 3 – 15 循環數

## $\Delta Rn$

- 減去基線



Application note: real-time PCR: understanding Ct.  
Applied Biosystems 05/2008 Publication 136AP01-01



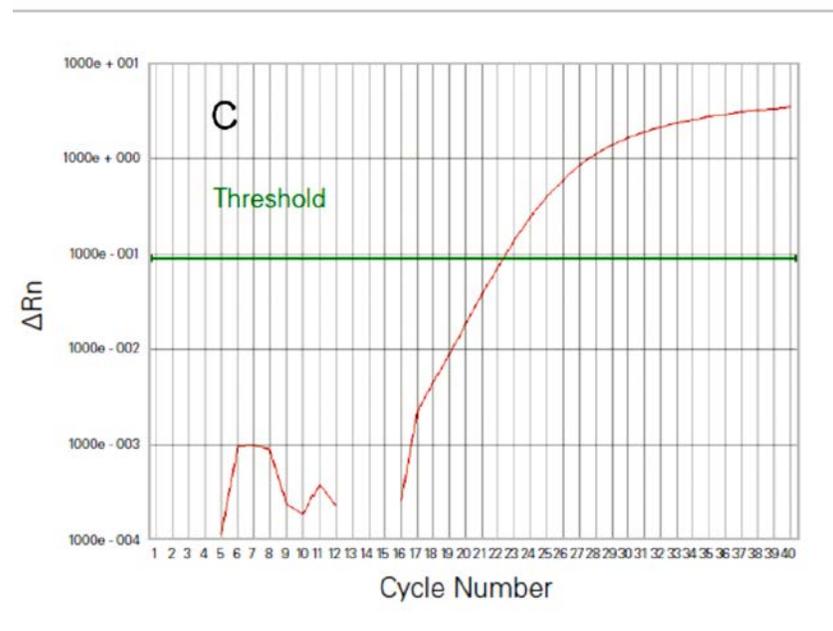
# 閾值 (Threshold value)

## 定義

- 又名臨界值
- 螢光訊號量
- 跟背景訊號量有明顯差異

## 設定

- real-time PCR對數增長期 (exponential phase) 的任何一點
- 以理論值進行對數擴增
- 能夠代表PCR循環數與PCR產物生成量的關係



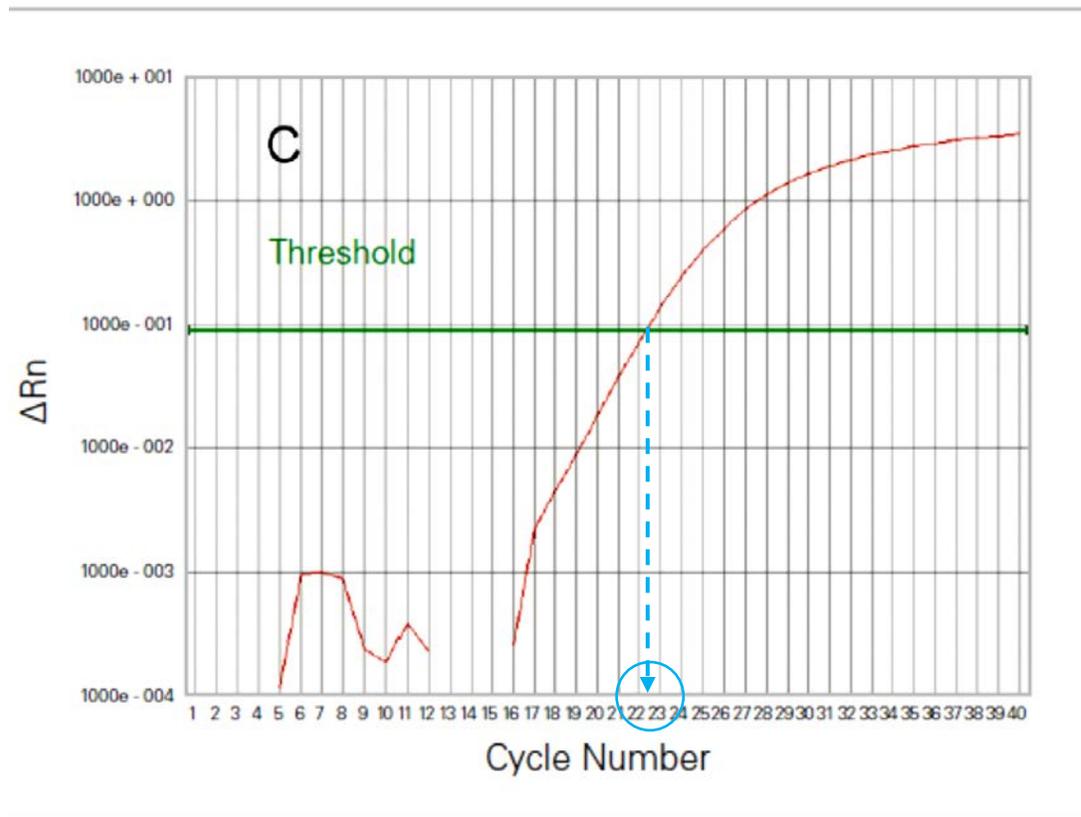
Application note: real-time PCR: understanding Ct.  
Applied Biosystems 05/2008 Publication 136AP01-01



# Ct值

## 定義

- 或稱 Cq值、Cp值
- 螢光訊號與臨界值交叉位置上，相對應的循環數
  - “real-time PCR 在那一個循環數可檢出陽性結果”



Application note: real-time PCR: understanding Ct.  
Applied Biosystems 05/2008 Publication 136AP01-01



# Real-time PCR 抑制物

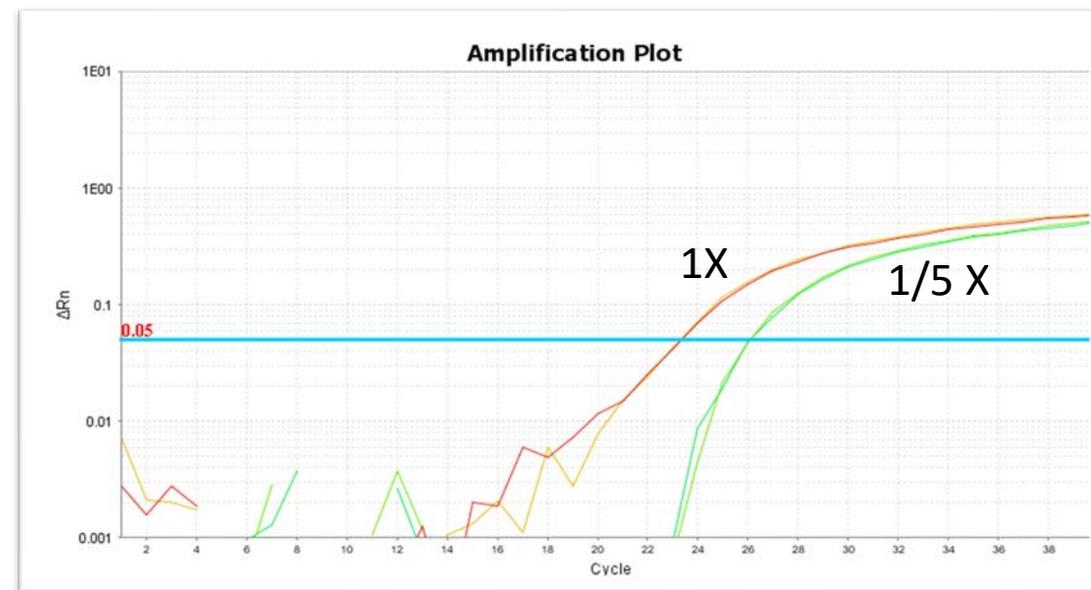
## 影響

- 假陰性結果、或 Ct值增加
- DNA提取物純度不足，抑制 real-time PCR

## 如何發現

- 跟稀釋了的 DNA 模板對比

沒有抑制物



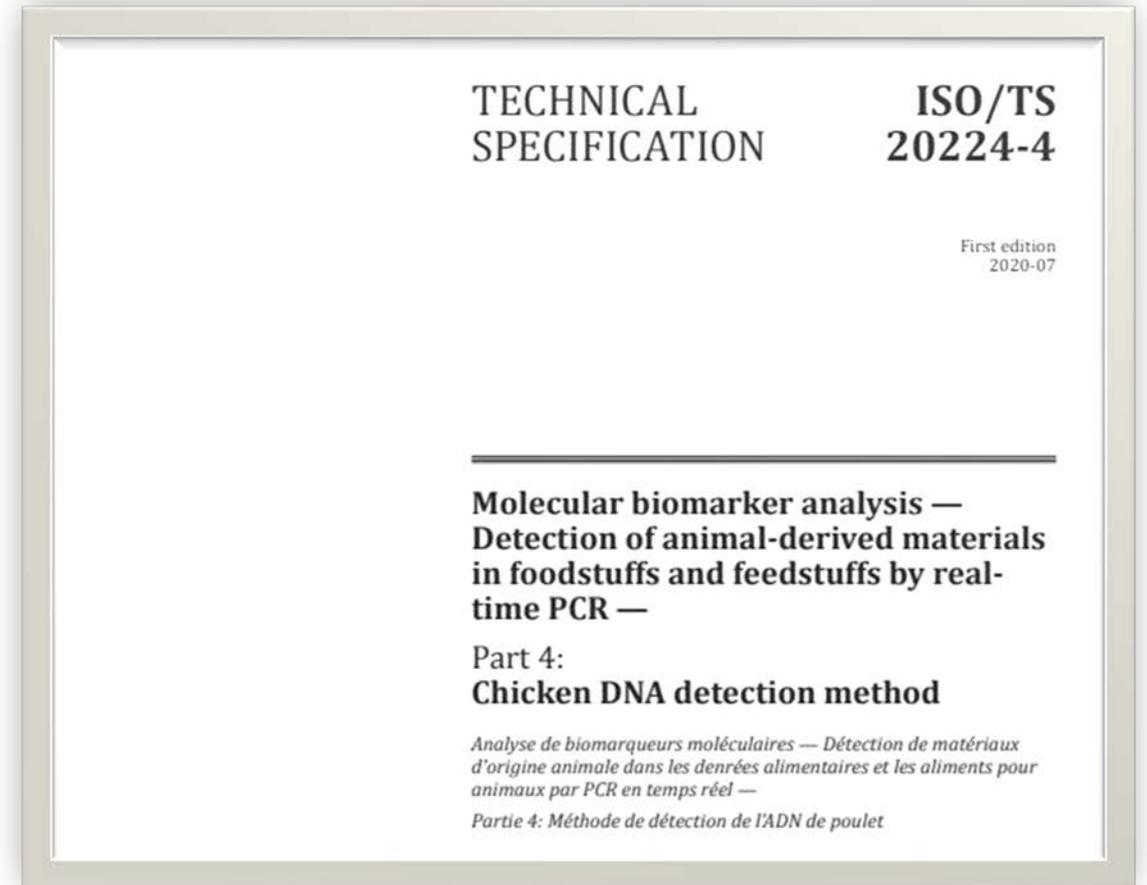
# 定性 real-time PCR

## 特點

- 偵測特定物種
- 解答“有/沒有”問題
- 無需建立標準曲線

## 例子

- ISO/TS 20224-4
  - 檢測家雞 (*Gallus gallus domesticus*)  
和原雞 (*Gallus gallus*)



ISO/TS 20224-4:20202, International Organization for Standardization



政府中藥檢測中心  
GOVERNMENT CHINESE MEDICINES  
TESTING INSTITUTE

# 方法介紹

實驗  
Experiments  
臨床  
Clinical Practices  
文獻  
Literatures

文化資源

自然資源



# 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



# 方法簡介

## 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	✗	✓



# 引物/探針組合

分析	引物/探針	序列 (5'-3')	最終濃度	目標區域位置
特異性擴增分析 (SA)	正向引物	TCCTTAATGTTTACTTCTGC TTTATCCTTGT	900 nM	引物位於平貝母 ( <i>F. ussuriensis</i> ) 葉綠體基因組 (NCBI 登記號 KY646166.1) 的 5 端方向第 118239 至 118357 個鹼基對。探針目標位置為第 118284 至 118306 個鹼基對。
	反向引物	GTCGATGAGTTAAACCAG ATAGTTATATGAGT	900 nM	
	探針	ATGTGTAGTAAAAAGAGA AAATC	250 nM	
內源陽性擴增對照分析 (IPAC)	正向引物	CGGACGAGAATAAAGAG AGAGT	900 nM	引物位於平貝母 ( <i>F. ussuriensis</i> ) 葉綠體基因組 (NCBI 登記號 KY646166.1) 的 5 端方向第 45480 至 45602 個鹼基對。探針目標位置為第 45544 至 45558 個鹼基對。
	反向引物	TATTGGGGATAGAGGGAC TTGA	900 nM	
	探針	AAAAGGAAAATCCGT	250 nM	



# 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



# 試劑

- DNA提取試劑盒，或手動提取所需的試劑，包括離心柱、GuSCN、NaCl、Tris-HCl、EDTA、TritonX-100、Tween-20
- Proteinase K、RNAse、 $\alpha$ -amylase
- SA 的 Assay ID：APGZHAC\*
- IPAC 的 Assay ID: APNKWA7\*
- TaqMan master mix
- 純水

\*為Thermo scientific 公司的 Assay ID編號，列出僅供參考，使用者可按GCMTI RD-1:2022 所載規格，自行向其他公司合成引物/探針組合



# 方法步驟

提取DNA

PCR擴增

結果分析



# 操作流程

## 樣品

- 約100 mg
- 確定樣品磨成粉末狀

## 提取陽性對照

- 約100 mg

## 提取陰性對照

- 空的微量離心管，加入  
DNA提取液

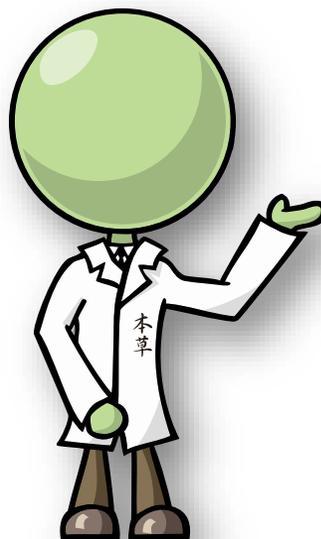
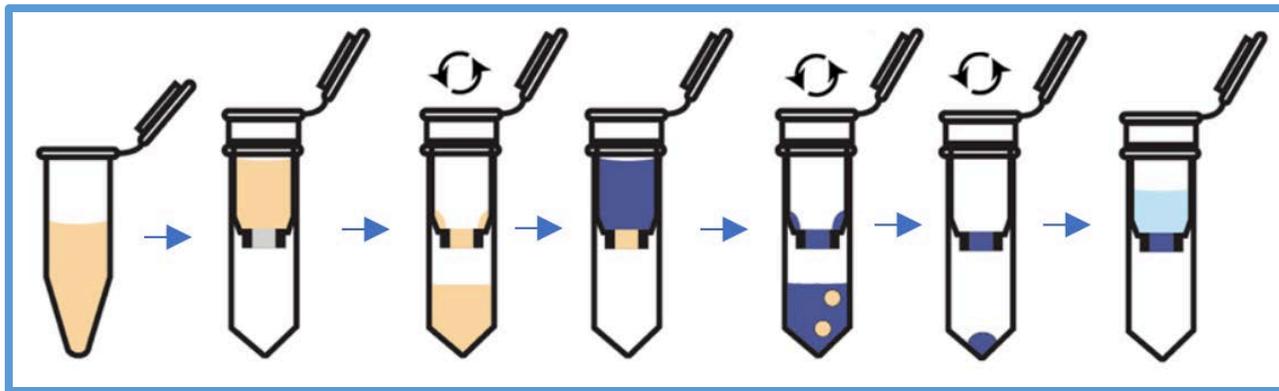
重覆反應 (X2)



# 操作流程

## DNA提取

- DNA提取試劑盒
- GCMTI所提供的方法
  - GCMTI RD-1:2022, Annex A
  - 離心柱型



# 操作流程

## DNA提取物

- 紫外-可見分光光度計
- DNA提取物純度
  - A260/A280
  - A260/A230

波長	物質
215-230 nm	緩衝液及溶劑
260 nm	核酸
280 nm	芳香族氨基酸



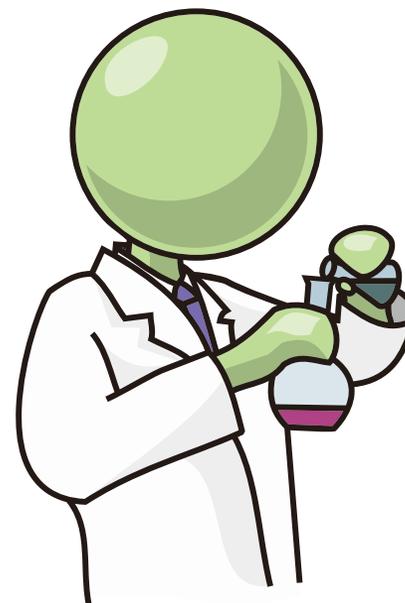
# 樣品DNA濃度

## 均一化DNA

- 以純水將樣品的DNA提取物，均一化至  
10 ng/ $\mu$ L

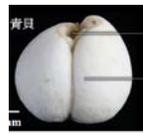
## 5倍稀釋DNA

- 以純水將樣品的均一化DNA，稀釋5倍





样品1



样品2

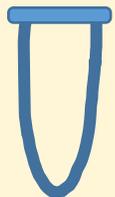
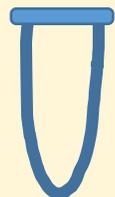
样品1-A

样品1-B

样品2-A

样品2-B

DNA提取物



→ 計算濃度

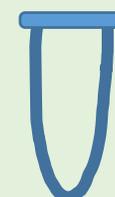
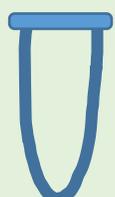
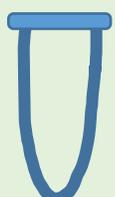
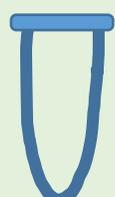
样品1-A

样品1-B

样品2-A

样品2-B

均一化DNA



→ 進行real-time PCR

样品1-A

样品1-B

样品2-A

样品2-B

5倍稀釋DNA



→ 進行real-time PCR



# PCR試劑條件

組分	特異性擴增分析 (SA)	內源陽性擴增對照分析 (IPAC)
20X 分析試劑，含 5 $\mu$ M 探針和 18 $\mu$ M 引物	0.5 $\mu$ L	0.5 $\mu$ L
2X PCR 預混液	5.0 $\mu$ L	5.0 $\mu$ L
模板 DNA	4.5 $\mu$ L	4.5 $\mu$ L
總反應體積	10.0 $\mu$ L	10.0 $\mu$ L

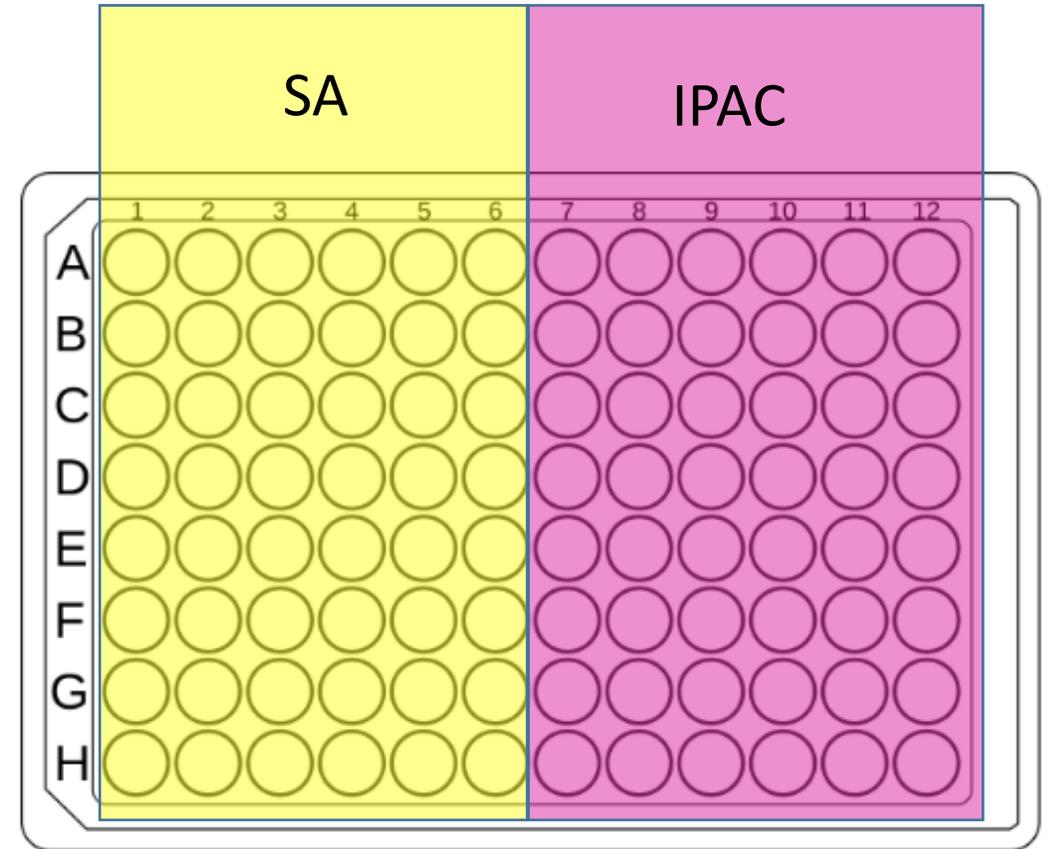


# 製備real-time PCR反應板

## 要點

- 96孔板劃分為二部份
  - SA
  - IPAC
- 樣品的均一化DNA
- 樣品的5倍稀釋DNA
- 陽性對照
- 陰性對照

兩個重覆反應



# PCR反應條件

溫度	時間	循環次數
50°C	120秒	1
95°C	120秒	1
95°C	1秒	40
65°C	20秒	



# 數據分析

## 擴增曲線分析設定

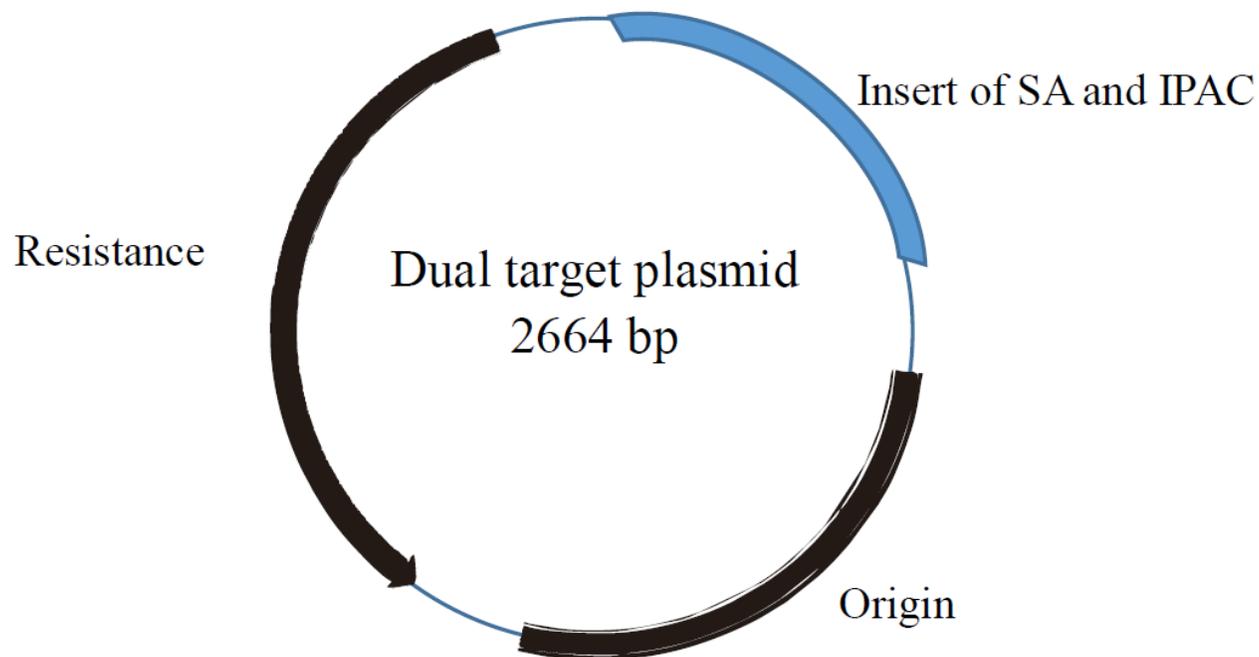
	SA	IPAC
臨界值 (threshold)	0.05	0.04
基線 (baseline)	3-15	3-15



# 質體DNA (plasmid DNA)

## 設定

- 450,000 拷貝數 (copy number)
- SA 的 Ct 值:  $20.4 \pm 0.18$
- IPAC 的 Ct 值  $19.0 \pm 0.27$

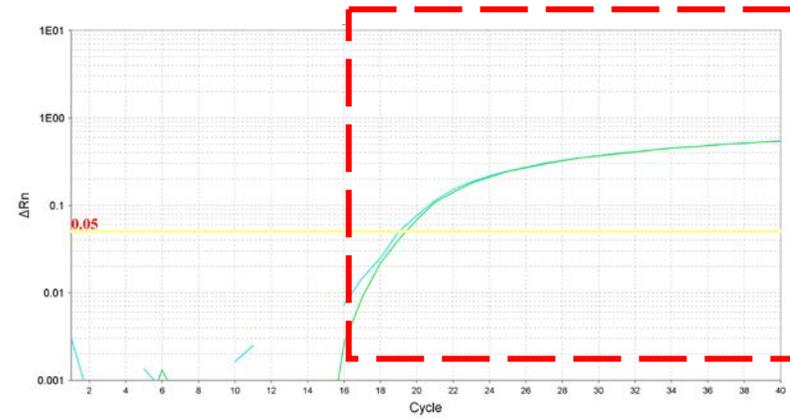


Map of the dual target plasmid

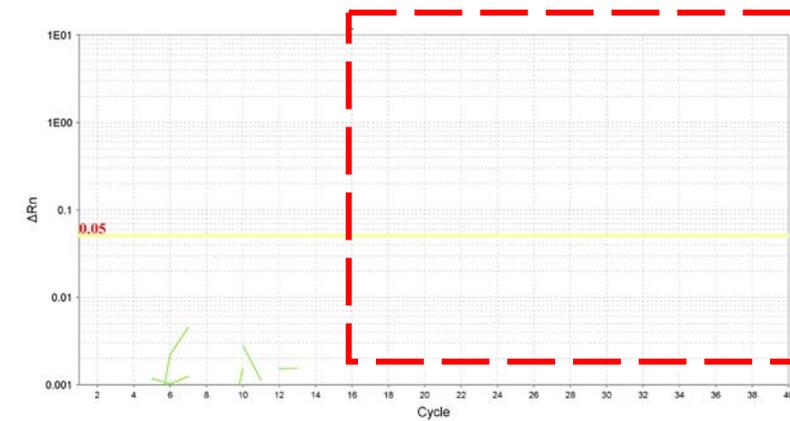


# 例子

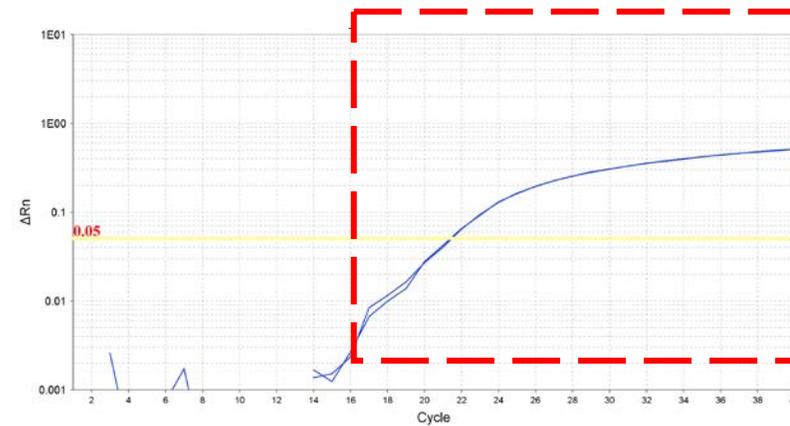
A) 平貝母樣本



B) 川貝母樣本



C) 在川貝母樣本  
摻入平貝母



# 結果判定

## 根據Ct值判定

Ct 值	判定
“未確定” (undetermined)	陰性
$\leq 37$	陽性
$> 37$ (高 Ct 值)	弱陽性



# 結果判定－樣品分析

	模板DNA量	SA的Ct值	IPAC的Ct值	檢測結果*	判斷或後續行動
1	正常	≤37	≤37	檢出	檢測出平貝母的DNA
	稀釋	≤37	≤37		
2	正常	>37	>37	檢出	檢測出平貝母的DNA，但模板DNA含PCR抑制物
	稀釋	≤37	≤37		
3	正常	“未確定”	≤37	未能檢出	未檢測出平貝母的DNA
	稀釋	“未確定”	≤37		
4	正常	高Ct值	≤37	不確定及 需進一步 測試	重覆檢測
	稀釋	高Ct值	≤37		若重覆檢測的結果相同，表示檢測結果為”檢出“，即檢測出平貝母DNA。若為結果為”未確定“，則表示”未能檢出“即不含平貝母DNA
5	正常	“未確定”	>37	不確定及 需進一步 測試	模板DNA含PCR抑制物
	稀釋	“未確定”	>37		重新對樣品進行DNA提取，並應改進過程以提高DNA質量才進行real-time PCR



# 結果判定－品質控制

	來源	分析	有效Ct值
環境對照 (EC)	環境樣本	SA	“未確定”
		IPAC	“未確定”
提取陽性對照 (EPC)	平貝母樣品	SA	Ct值 ≤ 37
		IPAC	Ct值 ≤ 37
提取陰性對照 (ENC)	DNA提取空管	SA	“未確定”
		IPAC	“未確定”
陽性DNA目標對照 (P)	平貝母的DNA	SA	Ct值 ≤ 37
		IPAC	Ct值 ≤ 37
陰性DNA目標對照 (N)	川貝母的DNA	SA	“未確定”
		IPAC	Ct值 ≤ 37
無模板陰性對照 (NTC)	水	SA	“未確定”
		IPAC	“未確定”



# 方法學考察 - 貝母屬

貝母屬品種	SA	IPAC
平貝母	D	D
川貝母	ND	D
暗紫貝母	ND	D
甘肅貝母	ND	D
梭砂貝母	ND	D
太白貝母	ND	D
瓦布貝母	ND	D
新疆貝母	ND	D
伊犁貝母	ND	D
浙貝母	ND	D
湖北貝母	ND	D

D: 檢出  
ND: 未檢出



# 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



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，詳的任何潛在危險，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
- 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
- 內服中成藥中藥材指標成分的分析(枇杷膏)
- 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  
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

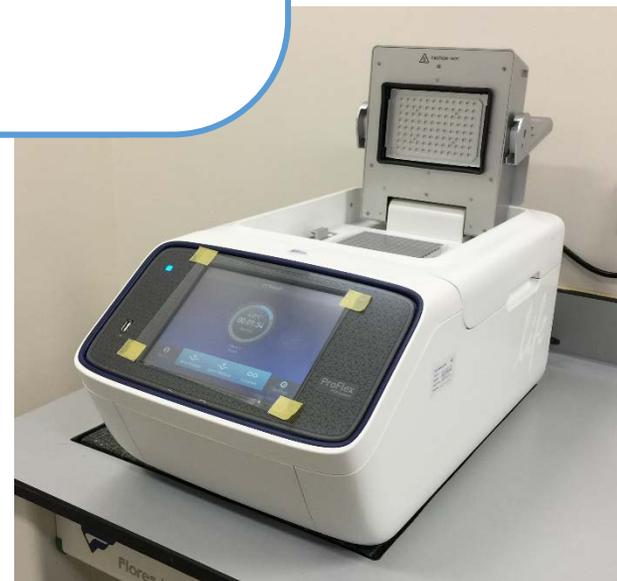
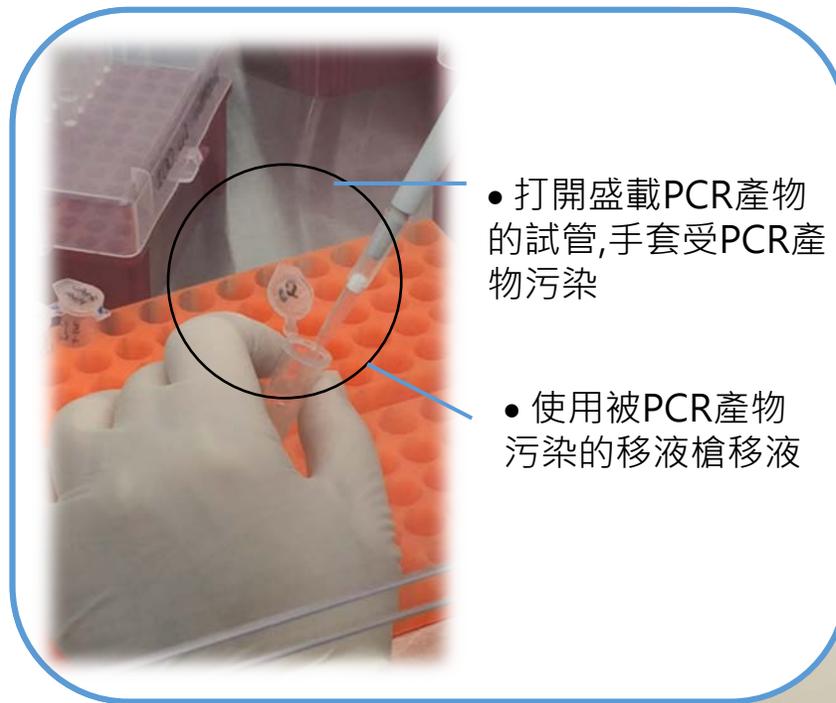
- 樣品交叉污染
- 樣品受環境污染
- 試劑污染
- PCR擴增物污染



# 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



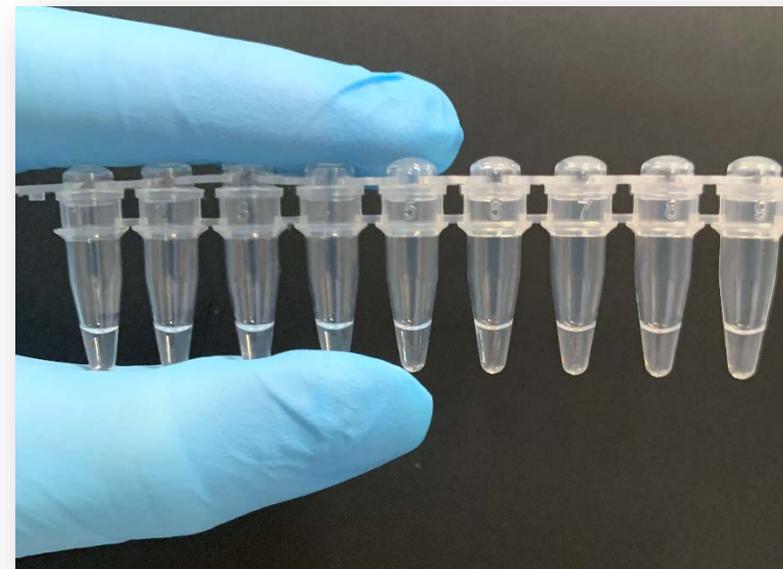
# 防止污染措施

## 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 real-time 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



政府中藥檢測中心  
GOVERNMENT CHINESE MEDICINES  
TESTING INSTITUTE

多謝

實驗  
Experiments

臨床  
Clinical Practices

文獻  
Literatures

文化資源

自然資源

