

## 附錄 XIV 脫氧核糖核酸 (DNA) 鑒定法

DNA 指紋圖譜法是中藥分子鑒定法之一，該方法不受生長年限、生長環境、採收時期、儲存條件的因素影響。通過聚合酶鏈式反應 (polymerase chain reaction, PCR) 技術，即使極其微量的 DNA 模板亦可以被擴增並用於一般 DNA 分析。作為 DNA 分析的方法之一，DNA 指紋圖譜通過產生特異性的 DNA 片段以進行特定樣品的鑒定。透過基因組中的位點變化，DNA 指紋圖譜能夠鑒別個體、菌株、物種等。根據生物基因組現有的知識，多種分子技術可用來進行中藥鑒定，包括聚合酶鏈式反應 — 限制性片段長度多態性 (PCR-RFLP)、隨機擴增多態性 DNA — 特徵序列擴增區域 (RAPD-SCAR)，簡單重複序列 (SSR) 和擴增片段長度多態性 (AFLP) 等。

### (1) 儀器及材料

- (a) **孵育箱或控溫攪拌器** — 用於恆溫孵育以裂解樣品製備核酸的儀器。
- (b) **微型離心機** — 用於高速離心小體積樣品 (少於 2 mL) 的儀器。
- (c) **紫外-可見光分光光度計** — 用於測量 DNA 濃度及純度的儀器。
- (d) **熱循環儀** — 也稱為 PCR 儀，通過聚合酶鏈式反應技術擴增 DNA 片段。
- (e) **DNA 凝膠槽** — 放置瓊脂糖凝膠並具有電極以進行凝膠電泳的儀器。
- (f) **電源** — 用於在 DNA 凝膠槽兩極之間產生電場的高壓電源。
- (g) **紫外透照儀** — 通過紫外放射顯示瓊脂糖凝膠中的 DNA 的透照器。
- (h) **凝膠成像系統** — 由紫外透照儀、圖像採集器和光源所組成的系統，用於記錄瓊脂糖凝膠中的核酸圖像。
- (i) **分子生物等級水** — 用於 PCR 反應的水應為分子生物等級。
- (j) **PCR 試劑** — 用於聚合酶鏈式反應的試劑，包含 DNA 聚合酶、dNTP、反應緩衝液和 DNA 聚合酶的輔助因子。

- (k) **引物** — 用於 DNA 合成起始點的一段短的單鏈 DNA，一般長度為 15 至 30 個核酸。
- (l) **DNA 聚合酶** — 用於合成 DNA 的酶。在聚合酶鏈式反應中，DNA 聚合酶從 3' 端開始複製。於 DNA 鑒定時，應使用具熱啟動特性的高保真 DNA 聚合酶，以降低複製錯誤率。
- (m) **DNA 分子量標記物** — 由一組不同分子量的雙鏈 DNA 組成，作為 DNA 分子量參考。分析 PCR 產物一般採用 100 bp 梯度和分子量範圍 100 - 1000 bp 的標記。PCR 產物分子量需在 DNA 分子量標記的範圍內。
- (n) **DNA 染料** — 用於染色 DNA 的試劑，如溴化乙錠和 SYBR 凝膠染色劑。
- (o) **瓊脂糖** — 可形成網狀結構的多糖，在膠電泳的過程中分離不同分子量的 DNA。
- (p) **電泳緩衝液** — 用於凝膠電泳的緩衝液。常用電泳緩衝液的有 TAE (Tris-乙酸-EDTA) 和 TBE (Tris-硼酸-EDTA)。
- (q) **加樣緩衝液** — 用於瓊脂糖凝膠的樣品上樣，含有高密度物質和追蹤染料的緩衝液。
- (2) **實驗要求** — 採用 PCR 技術進行檢測的優勢是高敏感度。然而，如實驗環境中受到污染，便會導致不準確或錯誤的實驗結果。故此，必須採取良好的實驗室操作和適當的預防措施。
- (a) 應把實驗室劃分獨立區進行不同的實驗操作：
- PCR 前處理區 — 應分成不同工作間，分別進行準備樣品、提取樣品、配備試劑和進行 PCR 反應；
  - PCR 後處理區 — 用於處理 PCR 後的產物製備和分析。

- (b) 實驗材料或核酸樣品應以單向流程運作 (即從PCR前處理區到PCR後處理區作檢測), 避免將高濃度的PCR產物帶進PCR前處理區造成污染。
- (c) 每個區或工作間應有專用的儀器和材料, 不應交叉使用; 當儀器和材料出入每區或工作間時, 必須進行消毒。
- (d) 樣品和試劑應儲存在對應的工作間。

### (3) 實驗操作程序

- (a) 一般來說, DNA鑒定程序可分為樣品處理和製備、DNA提取、DNA擴增、擴增產物檢測和結果分析。
- (b) DNA提取是鑒定過程中最關鍵的步驟。樣品應與兩個品質控制對照樣品 — 包括陽性提取對照和陰性提取對照進行平行測驗 (對照樣品配備詳情請參考第4部份)。DNA提取產量和純度應採用分光光度法或螢光檢測進行評估。
- (c) DNA擴增
  - 應按照專論中推薦的PCR試劑份量、DNA模板量和PCR反應條件進行。
  - 陽性提取對照、陰性提取對照和PCR反應陰性對照應與核酸樣品進行平行測驗 (詳情參考第4部份)。
  - 除DNA模板外, 將PCR試劑混合配成預混液 (master mix), 加到每個反應管中。在相應的試管中加入樣品, 陽性提取對照, 陰性提取對照和水 (用於PCR反應陰性對照)。
- (d) 擴增產物檢驗 — 按專論中推薦的凝膠電泳條件分離PCR擴增產物, 並記錄電泳圖譜。

#### (4) 品質控制

- (a) 進行DNA指紋圖譜定性分析時，每個樣品應以平行雙樣進行試驗。
- (b) 對照樣品 — 對照樣品須與每批樣品(例如每批20個樣品)進行平行試驗。於進行平行試驗時，至少有一組或最好兩組的對照樣品，每組對照樣品須包括：

- **陽性提取對照**

陽性提取對照是DNA提取過程中的陽性對照，主要是檢驗試劑或DNA提取實驗操作時出現的問題。陽性提取對照可來自具有已知分類特徵的標準樣本或經過博物館、國家權威機構、大學或研究所等廣泛認受之樣品。

- **陰性提取對照**

陰性提取對照是DNA提取過程中的陰性對照。該對照是不加入任何樣品和應於每批DNA提取樣品的最後試管內進行。

- **PCR陰性對照**

PCR陰性對照是PCR擴增過程中的陰性對照，主要是檢驗試劑或PCR擴增實驗時出現的問題，以確保使用的PCR試劑沒有被其他核酸污染。該對照是以無菌水代替DNA範本。

- (5) **結果分析** — 樣品和品質控制的測試結果應如下：

- (a) 樣品和陽性提取對照的測試結果應符合專論中的規定。
- (b) 樣品應顯出與陽性提取對照相應的DNA條帶。
- (c) 陰性提取對照和PCR陰性對照的測試結果應不可有任何條帶。
- (d) DNA分子標記的條帶應顯示清晰和良好分離。