附錄 XIV 脱氧核糖核酸（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** — 用於恒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，應使用具熱啓動特性的高保真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。