附錄XV　DNA條形碼分子鑒定法

DNA指紋圖譜法是目前最可靠的中藥分子鑒定法之一。由於不同種植物來源的藥材基因組成具有獨特性，因此該方法不受生長年限、生長環境、採收時期、儲存條件等因素的影響。通過聚合酶鏈式反應（PCR）的技術，即使是納克級的DNA亦可以被擴增並產生足夠量的DNA範本用於分子鑒定。一般來說，基因組中目的地區域基因被擴增後，可通過凝膠電泳法測定其片段大小。到目前為止，已經報導了多種基於PCR的分子鑒定法用於藥材的鑒定，包括聚合酶鏈反應限制性片段長度多態性法（PCR-RFLP）和隨機擴增多態性DNA法（RAPD）等。

（1）儀器及材料

a) **熱循環儀** — 也稱為PCR儀，通過聚合酶鏈式反應擴增DNA片段

b) **DNA 膠槽** — 具有電極（正極和負極）的槽，用於盛裝電泳所用瓊脂膠。

c) **電源** — 連接DNA膠槽兩極的高壓電源。

d) **紫外透照器** — 通過紫外放射顯示DNA凝膠電泳過程中產生的條帶。亦可以與成像儀器相連，比如數碼相機等，使得凝膠的影像可被捕獲。

e) **引物** — 在DNA聚合酶的催化下，一小段核苷酸序列用於DNA合成的起始點。聚合反應起始於引物的3’端，引物與單鏈相應互補序列結合，然後在DNA聚合酶作用下進行延伸，如此重複循環。

f) **PCR反應混合物** — 包括$MgCl_2$緩衝液，碱基對（dATP—腺嘌呤、dTTP—胸腺嘧啶、dCTP—胞嘧啶、dGTP—鳥嘌呤）及DNA聚合酶。

g) **限制性內切酶** — 可以識別核酸序列中特殊位點的酶，該位點稱之為限制性位點。

(2) **PCR反應體系**：根據儀器說明書設置PCR反應條件，建議使用的PCR反應條件見表1。

表1 PCR反應條件

PCR 儀器	GeneAmp®PCR System 9700 (AB Applied Biosystems) or equivalent		
DNA 範本	10-50 ng		
預變性	95˚C, 4 min		
循環次數	30		
PCR 反應條件	**溫度 (°C)**	**時間 (分鐘)**	**步驟**
	95	0.5	變性
	58	0.5	退火
	72	0.5	延伸
	72	5	最後延長

(3) **酶切反應**：對PCR產物進行酶切的建議反應條件見表2。

表2 酶切反應條件

限制性內切酶	*Sma I* (10 U/μL)	
孵育溫度	37˚C	
孵育時間	1.5 hr	
反應混合物體系 (總體積為20 μL)	**反應成分**	**所需量**
	PCR 產物	6 μL
	Sma I	0.5 μL (10 U/μL)
	10 x 消化緩衝液	2 μL
	PCR超純水	11.5 μL

(4) **凝膠電泳及檢測條件** — 根據儀器說明書設置凝膠電泳及檢測條件，建議使用的凝膠電泳及檢測條件見表3。

表3 推薦的凝膠電泳及檢測條件

分離體系	1.2% 瓊脂糖凝膠 (0.001% SYBR DNA 凝膠染色劑)
上樣體積	10 μL
DNA 標準物	1 kb DNA ladder (10 μL)
檢測器	紫外燈
電壓	80 V
時間	30 min