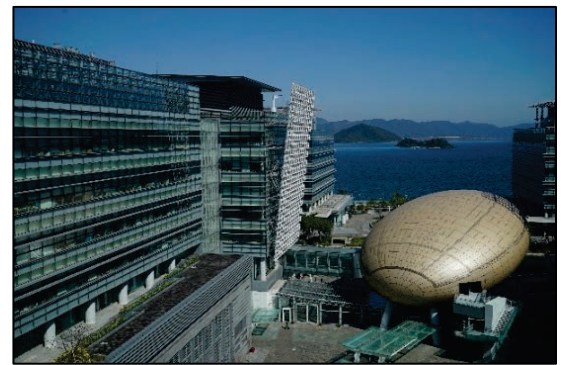




GCMTI RD-4:2024

利用聚合酶链式反应 限制性片段长度多态性 鉴别酸枣

政府中药检测中心方法



利用聚合酶链式反应限制性片段长度多态性鉴别酸枣

1 引言

- 1.1 本方法载列利用聚合酶链式反应限制性片段长度多态性（polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, 简称PCR-RFLP）鉴别酸枣（*Ziziphus jujuba* Mill. var. *spinosa* (Bunge) Hu ex H. F. Chou）。
- 1.2 酸枣为鼠李科枣属植物。根据中华人民共和国药典，酸枣仁为酸枣的干燥成熟种子。
- 1.3 由于酸枣仁资源紧缺，出现以外形相似的中草药冒充使用，包括理枣仁（为滇刺枣 *Ziziphus mauritiana* Lam.的干燥成熟种子）、广枣（为南酸枣 *Choerospondias axillaris* (Roxb.) Burt et Hill的干燥成熟果实）、枳椇子（为枳椇 *Hovenia acerba* Lindl.的干燥成熟种子），和补骨脂（为补骨脂 *Psoralea corylifolia* L.的干燥成熟果实）。
- 1.4 本方法首先以通用引物进行聚合酶链式反应（polymerase chain reaction, 简称PCR），扩增核糖体DNA第二内部转录间隔区（internal transcribed spacer 2, 简称ITS2），然后以限制酶 *BfmI* 进行限制性消化，产生酸枣特异性的脱氧核糖核酸（Deoxyribonucleic acid, 简称DNA）图谱。
- 1.5 本方法分为以下步骤：（1）样品制备；（2）DNA提取；（3）PCR分析；及（4）限制性消化分析。
- 1.6 本方法适用于完整或粉末状的原药材。

2 安全预防措施

- 2.1 本方法涉及使用危险物品。使用者有责任在处理相关物品时，根据物质安全资料表采取适当的防护措施，并戴上护眼及护手装备。如有需要，在抽气柜或生物安全柜进行分析。

3 试剂及材料

- 3.1 在可行的情况下，所使用的化学品或试剂须为分子生物或PCR等级。分析用水必须为分子生物等级。在可行的情况下，所使用的化学品、试剂及水须进行高压灭菌。操作人员须全程戴上无粉手套。建议使用含滤芯的移液器吸头以避免交叉污染。制备PCR试剂的层流柜，必须提供高效能空气微粒子过滤的单向空气，以防止污染。
- 3.2 《补充资料》载有本方法进行验证时所使用的试剂及材料，以供参考。

4 器具

4.1 《补充资料》载有本方法进行验证时所使用的仪器及器具，以供参考。

5 一般步骤

《补充资料》载有完整的实验步骤。对照应按第7段所述与样品同步进行检测，以检查分析试剂或样品之间有否出现DNA污染。

5.1 配制样品

5.1.1 配制样品、提取阳性对照（EPC，参考第7.1段）及提取阴性对照（EBC，参考第7.2段）。继续第5.2段。

5.2 DNA提取

5.2.1 为取得品质足以进行PCR分析的DNA提取物，建议从药材中去除以下成分：

5.2.1.1 核糖核酸；

5.2.1.2 多糖，例如纤维素、淀粉；

5.2.1.3 蛋白质；

5.2.1.4 脂质；以及

5.2.1.5 色素，例如酚类化合物。

5.2.2 使用分光光度法计算DNA提取物的量，然后把DNA浓度归一化。继续第5.3段。

5.3 PCR分析

5.3.1 以PCR阴性对照（PNC，参考第7.3段）作为对照，对样品、EPC和EBC的模板DNA进行PCR，扩增目标DNA区域。《补充资料》载有建议的引物对及PCR条件。

5.3.2 完成PCR后，使用电泳法检查PCR产物的谱带长度及数目。

5.4 限制性消化分析

5.4.1 以限制性消化阴性对照（RDNC，参考第7.4段）作为对照，对样品和EPC的PCR产物进行限制性消化。《补充资料》载有建议的限制酶及限制性消化条件。

5.4.2 完成限制性消化后，使用电泳法检查限制性消化产物的谱带长度及数目。

6 结果分析

6.1 结果是透过检视限制性消化分析所得的DNA谱带图谱。区分酸枣与其混淆品种（包括滇刺枣、南酸枣、枳椇、补骨脂）是基于限制性消化分析所得的DNA谱带图谱：

	物种	限制性消化分析所得的 DNA 谱带图谱	报告结果
(a)	(1) 酸枣 (<i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i>)	2 条谱带，长度分别约 200 个碱基对及约 300 个碱基对	阳性
(b)	(1) 滇刺枣 (<i>Z. mauritiana</i>) (2) 南酸枣 (<i>C. axillaris</i>) (3) 枳椇 (<i>H. acerba</i>) (4) 补骨脂 (<i>P. corylifolia</i>)	1 条谱带，长度约 500 个碱基对	阴性

6.2 质量控制

6.2.1 当平行样在PCR分析或限制性消化分析中出现不一致的结果时，表明样品只含有少量目标DNA，可能触及检测下限。对于不确定的数据，须重复分析以确认检测结果。

6.2.2 系统对照（包括EPC、EBC、PNC、RDNC）须在PCR分析中获得预期的扩增（参考第6.3段），以及须在限制性消化分析中获得预期的PCR产物切割（参考第6.4段），以确保测试结果有效。系统对照须显出下表所述的预期表现，若任何系统对照的结果跟其预期表现不一致，须重复分析。

系统对照	PCR 分析中的预期扩增	限制性消化分析中的预期 PCR 产物切割
提取阳性对照（EPC）	阳性	阳性
提取阴性对照（EBC）	阴性	不适用
PCR 阴性对照（PNC）	阴性	不适用
限制性消化阴性对照（RDNC）	不适用	阴性 ¹

¹ RDNC 在限制性消化分析中，不得显出 DNA 谱带（参考第 6.4.3.2 段）。

6.3 PCR分析的扩增

6.3.1 须以目视方式检查PCR分析中获得的DNA谱带来评估扩增。

6.3.2 当观察到一条长度约500个碱基对的DNA谱带时，扩增被视为阳性。

- 6.3.3 当观察不到一条长度约500个碱基对的DNA谱带时，扩增被视为阴性。
- 6.3.4 当样品和EPC的扩增是阴性，表示：
- 6.3.4.1 在DNA提取过程中，可能同时分离出存在于样品基质内的抑制物。在这种情况下，模板DNA在加入PCR预混液前须进行稀释，并须重复PCR分析；或
- 6.3.4.2 分离出的DNA可能已严重降解或被破坏，导致可扩增的模板DNA量低于检测下限。在这种情况下，须重复PCR分析，并增加模板DNA的投入量。
- 6.3.5 若执行了第6.3.4.1段或第6.3.4.2段的措施后，PCR分析的扩增仍维持阴性，须中止分析。待修正问题后重新开始分析。

6.4 限制性消化分析的PCR产物切割

- 6.4.1 须以目视检查限制性消化分析中获得的DNA谱带来评估PCR产物切割。
- 6.4.2 当观察到1条长度约200个碱基对和1条长度约300个碱基对的DNA谱带时，PCR产物切割被视为阳性。
- 6.4.3 当出现以下情况，PCR产物切割被视为阴性：
- 6.4.3.1 观察不到1条长度约200个碱基对和1条长度约300个碱基对的DNA谱带，但却观察到1条长度约500个碱基对的DNA谱带；或
- 6.4.3.2 观察不到DNA谱带。
- 6.4.4 当在样品和EPC观察不到DNA谱带（第6.4.3.2段），这可能表明PCR产物的投入量低于检测下限。在这种情况下，须重复限制性消化分析，并增加PCR产物的投入量。

7 品质控制参数

测试的分析性能是根据品质控制标准来进行评估，以确保分析结果可接受，并且满足方法的目的。为确保符合品质控制计划，根据DNA分析人员的合理的处理能力，使用者应决定在每批次的适当样品数量。每批样品或每15个样品（以较少者为准）须执行以下系统控制。

- 7.1 提取阳性对照（EPC）：为酸枣的参考物质。须纳入分析，这对照作为整个分析程序的质量控制。

可接收标准：预期的观察结果须为：

7.1.1 PCR分析的扩增为阳性；及

7.1.2 限制性消化分析的PCR产物切割为阳性。

7.2 提取阴性对照（EBC）：须纳入分析，分析数量最好是2。这对照须在DNA提取过程中与样品一同处理。

可接收标准：PCR分析的扩增须为阴性。

7.3 PCR阴性对照（PNC）：作为扩增空白对照，须纳入分析。在PCR分析中，以水代替模板DNA来制备PNC，分析数量最好是2。

可接收标准：PCR分析的扩增须为阴性。

7.4 限制性消化阴性对照（RDNC）：作为切割空白对照，须纳入分析。在限制性消化分析中，以水代替PCR产物来制备RDNC，分析数量最好是2。

可接收标准：限制性消化分析中的PCR产物切割须为阴性。

7.5 须至少包括一份随机的平行样对照，并须在整个过程中进行分析。

可接收标准：平行样的分析结果须为一致。

7.6 品质控制结果不符合上述规定的可接收标准时，须重新进行分析，直至符合标准。否则，应停止分析。在重新开始分析前识别并解决问题。

8 参考资料

8.1 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China Volume 1, 2020 ed. China Medical Science Press.

8.2 Chen SL, Yao H, Han JP, Liu C, Song JY, et al. (2010) Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. PLoS ONE 5(1): e8613.

8.3 Glass fiber plate DNA extraction. (n.d.). CCDB protocols. Retrieved from https://ccdb.ca/site/wp-content/uploads/2016/09/CCDB_DNA_Extraction.pdf

8.4 Yao H, Song JY, Liu C, Luo K, Han JP, Li Y, Pang XH, Xu HX, Zhu YJ, Xiao PG, Chen SL (2010) Use of ITS2 Region as the Universal DNA Barcode for Plants and Animals. PLoS ONE 5(10): e13102.