



GCMTI RD-4:2024

利用聚合酶鏈式反應
限制性片段長度多態性
鑒別酸棗

政府中藥檢測中心方法



利用聚合酶鏈式反應限制性片段長度多態性鑒別酸棗

1 引言

- 1.1 本方法載列利用聚合酶鏈式反應限制性片段長度多態性 (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, 簡稱PCR-RFLP) 鑒別酸棗 (*Ziziphus jujuba* Mill. var. *spinosa* (Bunge) Hu ex H. F. Chou)。
- 1.2 酸棗為鼠李科棗屬植物。根據中華人民共和國藥典，酸棗仁為酸棗的乾燥成熟種子。
- 1.3 由於酸棗仁資源緊缺，出現以外形相似的中草藥冒充使用，包括理棗仁 (為滇刺棗 *Ziziphus mauritiana* Lam.的乾燥成熟種子)、廣棗 (為南酸棗 *Choerospondias axillaris* (Roxb.) Burt et Hill的乾燥成熟果實)、枳椇子 (為枳椇 *Hovenia acerba* Lindl.的乾燥成熟種子)，和補骨脂 (為補骨脂 *Psoralea corylifolia* L.的乾燥成熟果實)。
- 1.4 本方法首先以通用引物進行聚合酶鏈式反應 (polymerase chain reaction, 簡稱PCR)，擴增核糖體DNA第二內部轉錄間隔區 (internal transcribed spacer 2, 簡稱ITS2)，然後以限制酶 *BfmI* 進行限制性消化，產生酸棗特異性的脫氧核糖核酸 (Deoxyribonucleic acid, 簡稱DNA) 圖譜。
- 1.5 本方法分為以下步驟：(1) 樣品製備；(2) DNA提取；(3) PCR分析；及(4) 限制性消化分析。
- 1.6 本方法適用於完整或粉末狀的原藥材。

2 安全預防措施

- 2.1 本方法涉及使用危險物品。使用者有責任在處理相關物品時，根據物質安全資料表採取適當的防護措施，並戴上護眼及護手裝備。如有需要，在抽氣櫃或生物安全櫃進行分析。

3 試劑及材料

- 3.1 在可行的情況下，所使用的化學品或試劑須為分子生物或PCR等級。分析用水必須為分子生物等級。在可行的情況下，所使用的化學品、試劑及水須進行高壓滅菌。操作人員須全程戴上無粉手套。建議使用含濾芯的移液器吸頭以避免交叉污染。製備PCR試劑的層流櫃，必須提供高效能空氣微粒子過濾的單向空氣，以防止污染。
- 3.2 《補充資料》載有本方法進行驗證時所使用的試劑及材料，以供參考。

4 器具

4.1 《補充資料》載有本方法進行驗證時所使用的儀器及器具，以供參考。

5 一般步驟

《補充資料》載有完整的實驗步驟。對照應按第7段所述與樣品同步進行檢測，以檢查分析試劑或樣品之間有否出現DNA污染。

5.1 配製樣品

5.1.1 配製樣品、提取陽性對照（EPC，參考第7.1段）及提取陰性對照（EBC，參考第7.2段）。繼續第5.2段。

5.2 DNA提取

5.2.1 為取得品質足以進行PCR分析的DNA提取物，建議從藥材中去除以下成分：

5.2.1.1 核糖核酸；

5.2.1.2 多糖，例如纖維素、澱粉；

5.2.1.3 蛋白質；

5.2.1.4 脂質；以及

5.2.1.5 色素，例如酚類化合物。

5.2.2 使用分光光度法計算DNA提取物的量，然後把DNA濃度歸一化。繼續第5.3段。

5.3 PCR分析

5.3.1 以PCR陰性對照（PNC，參考第7.3段）作為對照，對樣品、EPC和EBC的模板DNA進行PCR，擴增目標DNA區域。《補充資料》載有建議的引物對及PCR條件。

5.3.2 完成PCR後，使用電泳法檢查PCR產物的譜帶長度及數目。

5.4 限制性消化分析

5.4.1 以限制性消化陰性對照（RDNC，參考第7.4段）作為對照，對樣品和EPC的PCR產物進行限制性消化。《補充資料》載有建議的限制酶及限制性消化條件。

5.4.2 完成限制性消化後，使用電泳法檢查限制性消化產物的譜帶長度及數目。

6 結果分析

6.1 結果分析是透過檢視限制性消化分析所得的DNA譜帶圖譜。區分酸棗與其混淆品種（包括滇刺棗、南酸棗、枳椇、補骨脂）是基於限制性消化分析所得的DNA譜帶圖譜：

	物種	限制性消化分析所得的 DNA 譜帶圖譜	報告結果
(a)	(1) 酸棗 (<i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i>)	2 條譜帶，長度分別約 200 個鹼基對及約 300 個鹼基對	陽性
(b)	(1) 滇刺棗 (<i>Z. mauritiana</i>) (2) 南酸棗 (<i>C. axillaris</i>) (3) 枳椇 (<i>H. acerba</i>) (4) 補骨脂 (<i>P. corylifolia</i>)	1 條譜帶，長度約 500 個鹼基對	陰性

6.2 質量控制

6.2.1 當平行樣在PCR分析或限制性消化分析中出現不一致的結果時，表明樣品只含有少量目標DNA，可能觸及檢測下限。對於不確定的數據，須重複分析以確認檢測結果。

6.2.2 系統對照（包括EPC、EBC、PNC、RDNC）須在PCR分析中獲得預期的擴增（參考第6.3段），以及須在限制性消化分析中獲得預期的PCR產物切割（參考第6.4段），以確保測試結果有效。系統對照須顯出下表所述的預期表現，若任何系統對照的結果跟其預期表現不一致，須重複分析。

系統對照	PCR 分析中的預期擴增	限制性消化分析中的預期 PCR 產物切割
提取陽性對照（EPC）	陽性	陽性
提取陰性對照（EBC）	陰性	不適用
PCR 陰性對照（PNC）	陰性	不適用
限制性消化陰性對照（RDNC）	不適用	陰性 ¹

¹ RDNC 在限制性消化分析中，不得顯出 DNA 譜帶（參考第 6.4.3.2 段）。

6.3 PCR分析的擴增

6.3.1 須以目視方式檢查PCR分析中獲得的DNA譜帶來評估擴增。

6.3.2 當觀察到一條長度約500個鹼基對的DNA譜帶時，擴增被視為陽性。

- 6.3.3 當觀察不到一條長度約500個鹼基對的DNA譜帶時，擴增被視為陰性。
- 6.3.4 當樣品和EPC的擴增是陰性，表示：
- 6.3.4.1 在DNA提取過程中，可能同時分離出存在於樣品基質內的抑制物。在這種情況下，模板DNA在加入PCR預混液前須進行稀釋，並須重複PCR分析；或
- 6.3.4.2 分離出的DNA可能已嚴重降解或被破壞，導致可擴增的模板DNA量低於檢測下限。在這種情況下，須重複PCR分析，並增加模板DNA的投入量。
- 6.3.5 若執行了第6.3.4.1段或第6.3.4.2段的措施後，PCR分析的擴增仍維持陰性，須中止分析。待修正問題後重新開始分析。

6.4 限制性消化分析的PCR產物切割

- 6.4.1 須以目視檢查限制性消化分析中獲得的DNA譜帶來評估PCR產物切割。
- 6.4.2 當觀察到1條長度約200個鹼基對和1條長度約300個鹼基對的DNA譜帶時，PCR產物切割被視為陽性。
- 6.4.3 當出現以下情況，PCR產物切割被視為陰性：
- 6.4.3.1 觀察不到1條長度約200個鹼基對和1條長度約300個鹼基對的DNA譜帶，但卻觀察到1條長度約500個鹼基對的DNA譜帶；或
- 6.4.3.2 觀察不到DNA譜帶。
- 6.4.4 當在樣品和EPC觀察不到DNA譜帶（第6.4.3.2段），這可能表明PCR產物的投入量低於檢測下限。在這種情況下，須重複限制性消化分析，並增加PCR產物的投入量。

7 品質控制參數

測試的分析性能是根據品質控制標準來進行評估，以確保分析結果可接受，並且滿足方法的目的。為確保符合品質控制計劃，根據DNA分析人員的合理的處理能力，使用者應決定在每批次的適當樣品數量。每批樣品或每15個樣品（以較少者為準）須執行以下系統控制。

- 7.1 提取陽性對照（EPC）：為酸棗的參考物質。須納入分析，這對照作為整個分析程序的質量控制。

可接收標準：預期的觀察結果須為：

7.1.1 PCR分析的擴增為陽性；及

7.1.2 限制性消化分析的PCR產物切割為陽性。

7.2 提取陰性對照（EBC）：須納入分析，分析數量最好是2。這對照須在DNA提取過程中與樣品一同處理。

可接收標準：PCR 分析的擴增須為陰性。

7.3 PCR陰性對照（PNC）：作為擴增空白對照，須納入分析。在PCR分析中，以水代替模板DNA來製備PNC，分析數量最好是2。

可接收標準：PCR 分析的擴增須為陰性。

7.4 限制性消化陰性對照（RDNC）：作為切割空白對照，須納入分析。在限制性消化分析中，以水代替PCR產物來製備RDNC，分析數量最好是2。

可接收標準：限制性消化分析中的 PCR 產物切割須為陰性。

7.5 須至少包括一份隨機的平行樣對照，並須在整個過程中進行分析。

可接收標準：平行樣的分析結果須為一致。

7.6 品質控制結果不符合上述規定的可接收標準時，須重新進行分析，直至符合標準。否則，應停止分析。在重新開始分析前識別並解決問題。

8 參考資料

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.