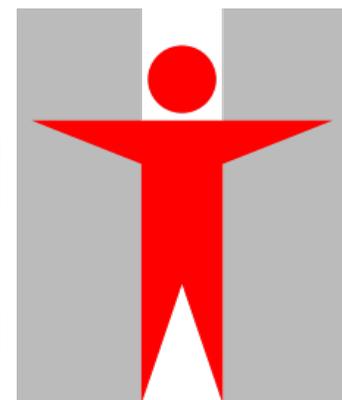




酸棗仁及其常見混淆品 DNA鑒別研究

2025年2月21日

香港特別行政區政府
衛生署 中醫藥規管辦公室
政府中藥檢測中心



酸棗仁及其常見混淆品DNA鑒別研究

內容

- 政府中藥檢測中心簡介
- 項目背景
- 檢測方法的介紹
 - 原理
 - 操作步驟
- DNA檢測的操作建議

政府中藥檢測中心

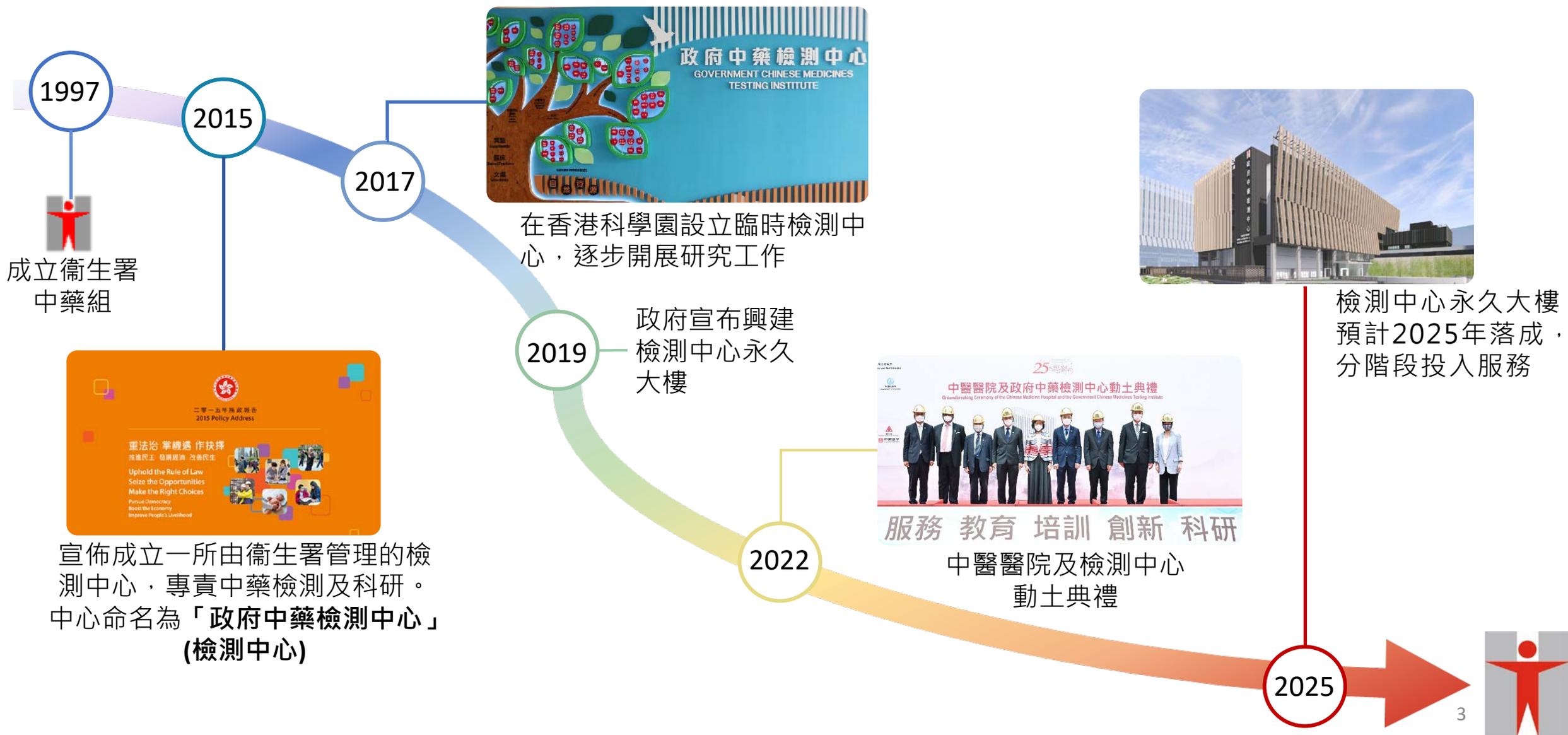
GOVERNMENT CHINESE MEDICINES
TESTING INSTITUTE

文化資源

自然資源



政府中藥檢測中心(檢測中心)的發展



檢測中心- 使命及目標

使命

- 利用先進的科技並通過科研，研發一系列國際認可的中藥及其產品的參考標準
- 透過技術轉移予中藥業界，加強業界對中藥及其產品的品質控制
- 建立香港中藥品牌形象



目標及功能



設立高科技實驗室
開展中藥的高端科技研究



設立
中藥標本實驗室



設立
培訓及技術轉移中心



制訂
中藥參考標準



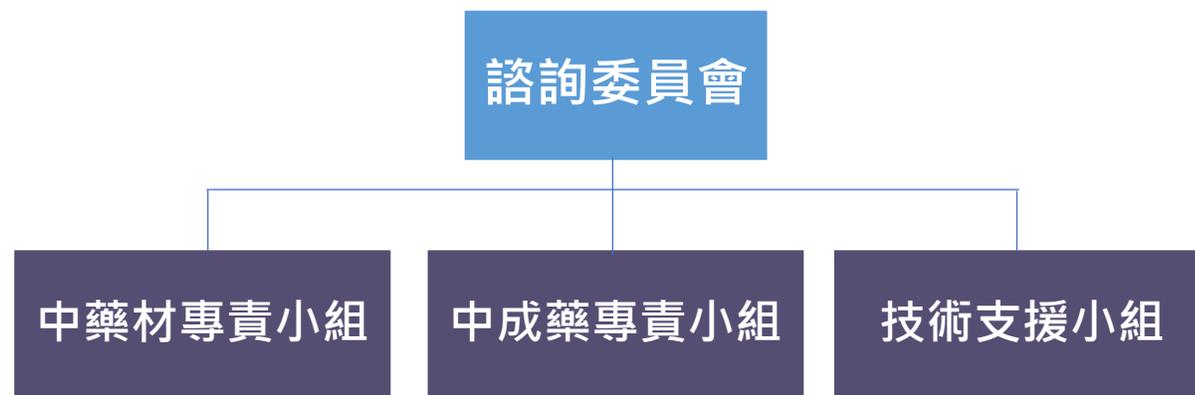
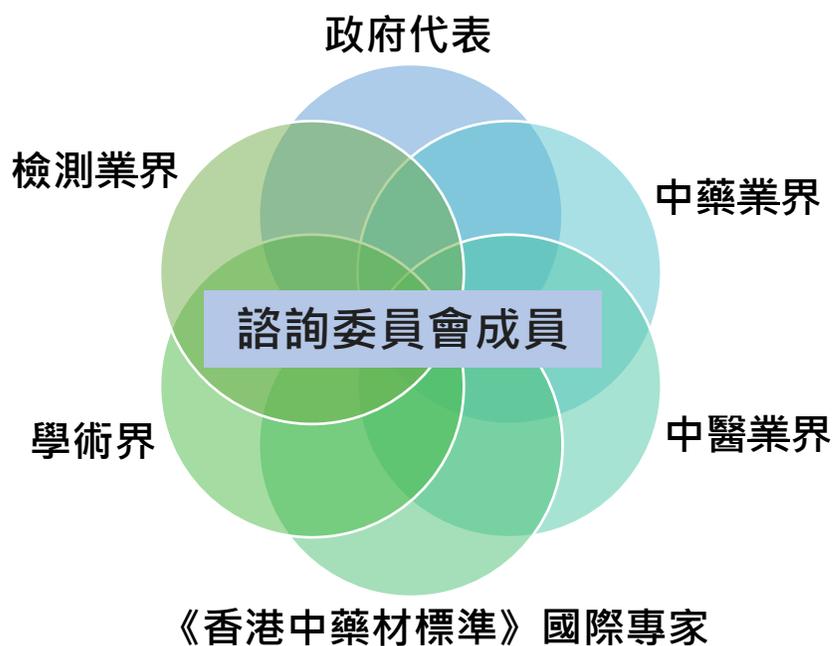
強化
與國際間之合作



檢測中心 - 諮詢架構

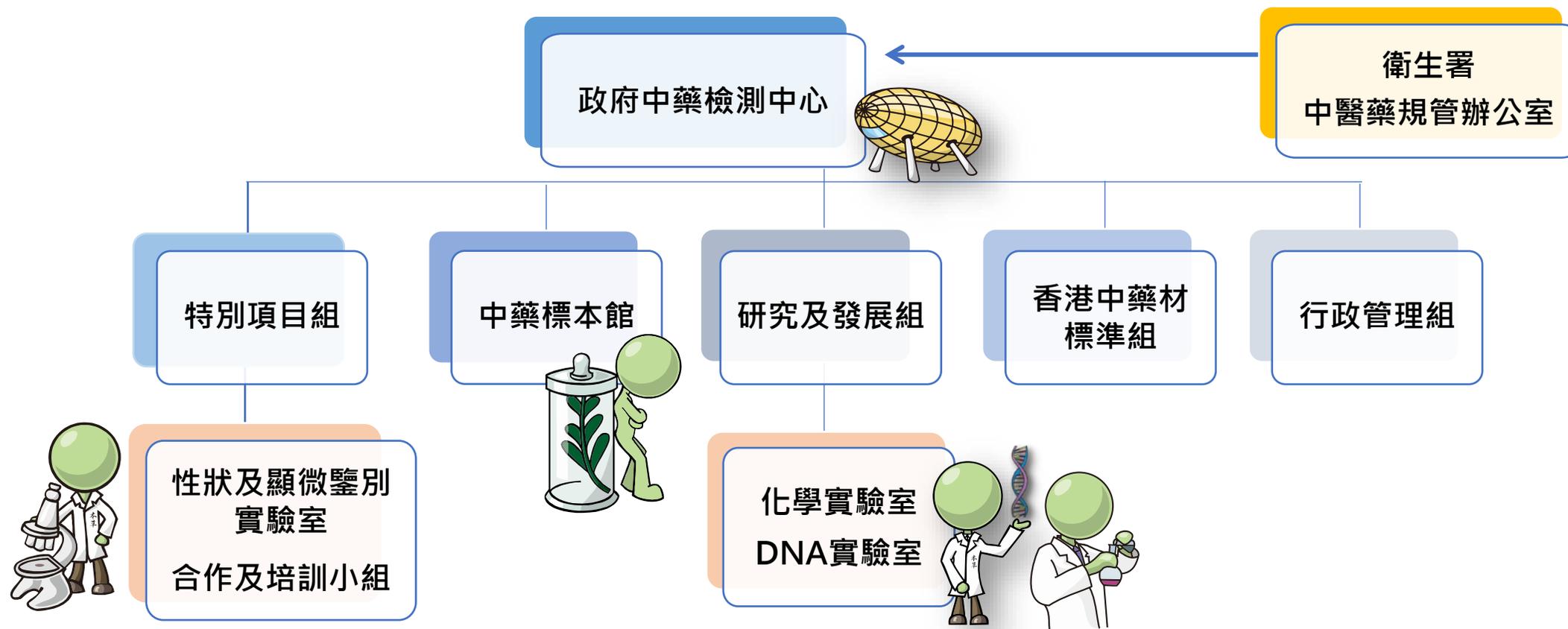
政府中藥檢測中心諮詢委員會

- 2017年成立，討論檢測中心的定位及工作目標
- 提供平台予持份者就檢測中心的長遠發展策略、措施及工作計劃提供意見
- 轄下小組就專門課題作聚焦討論，及就研究項目的技術問題提供專家意見



檢測中心- 組織架構

- 檢測中心現時由 5 個組別組成，下設 3 個實驗室
- 由不同學科的工作人員，包括化驗師、藥劑師、科學主任及植物分類學、生藥學、毒理學和 DNA 研究領域的專家，各自負責不同領域的研究工作



檢測中心- 實驗所認可資格

質量管理及認證

- 自2022年6月起，檢測中心已獲得香港認可處 (HKAS) 發出香港實驗所認可計劃 (HOKLAS) 的認可資格
- 符合國際標準ISO/IEC 17025:2017《測試及校正實驗所能力的通用規定》的要求

認可類別

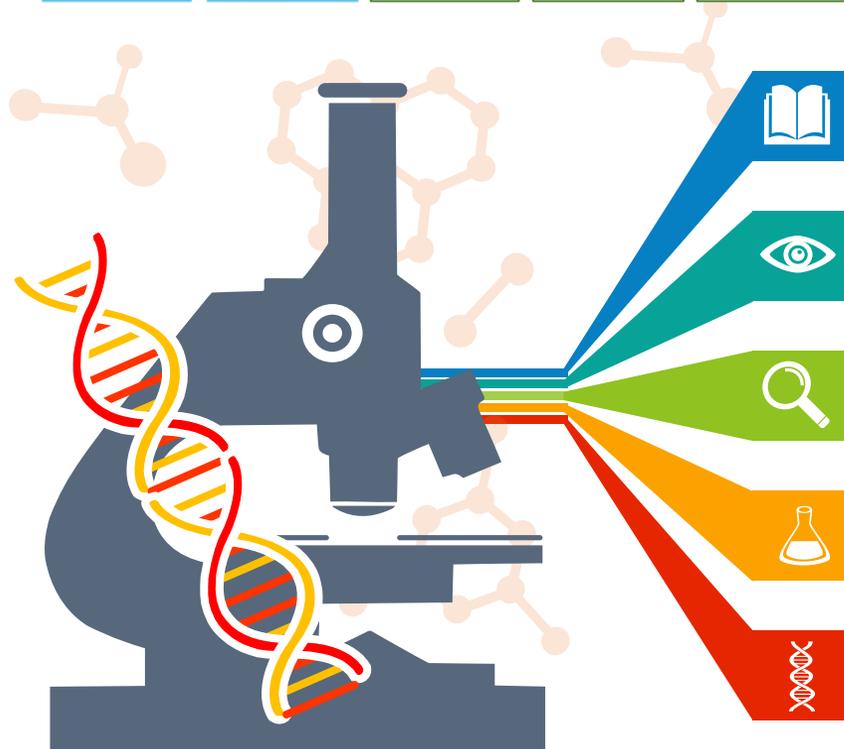
- 中藥測試

認可範疇

測試項目	認可活動	標準方法或應用技術
中成藥 (搽劑 - 藥油)	利用氣相色譜法檢測外用中藥藥油中的 α -蒎烯、桉油精、樟腦、薄荷醇和水楊酸甲酯含量	政府中藥檢測中心方法 RD-MTD-13
紅花 (粉末)	為紅花(粉末)進行顯微鑒別	《香港中藥材標準第六冊》
中藥材	以脫氧核糖核酸 (DNA) 測序技術鑒別三七	政府中藥檢測中心方法 RD-MTD-31



檢測中心 研究/專題項目



- 《香港中藥材標準》計劃
- 數碼化中藥資料平臺
- 收集中藥標本計劃
- 第四次全國中藥資源普查（香港地區）
- 開發鑒別及檢測中藥方法，包括性狀、顯微、化學及DNA技術
 - 香港容易混淆中藥的性狀及顯微鑒別研究
 - 酸棗仁及其常見混淆品性狀及顯微鑒別研究
 - 微細種子及果實類藥材的鑒定
 - 外用藥油中藥材指標成分的分析
 - 內服中成藥中藥材指標成分的分析 (枇杷膏)
 - 白鳳丸中藥材指標成分的分析
 - 含補骨脂和人參的中成藥化學指標成分的分析
 - 中藥複方顆粒的化學指標成分分析
 - **建立中藥材參考DNA序列庫**
 - **以DNA技術作為鑒別鹿茸的互補檢測方法**
 - **川貝母中常見摻雜品 – 平貝母的DNA 鑒別方法**
 - **酸棗仁及其常見混淆品DNA鑒別研究**
 - **鬼臼（桃兒七）及其混淆品的DNA鑒別研究**



DNA實驗室的研究項目- 建立中藥材參考DNA序列庫

- 以《中國藥典》《9107 中藥材DNA條形碼分子鑒定法指導原則》作為技術指引
- 提供3個DNA條形碼用作物種鑒別
- 動物類藥材：COI、CYTB 及 16S rRNA
- 植物類藥材：ITS2、*psbA-trnH* 及 *rbcL*



Reference DNA Sequence																			
Plant Specimens	Reference Detail																		
<p>DNA Information</p> <p>Internal transcribed spacer 2 of nuclear ribosomal RNA (ITS2)</p> <p>Bank ID: S150918-2</p> <p>Accession: J010000000</p> <p>Gene: ITS2</p> <p>Species: <i>Adiantum species</i></p> <p>Accession: J010000000</p> <p>Gene: ITS2</p> <p>Species: <i>Adiantum species</i></p>																			
<p>Reference Detail</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Description of reference material</th> <th>Plant specimen</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Scientific name</td> <td><i>Adiantum species</i></td> </tr> <tr> <td>Laboratory number</td> <td>AD101</td> </tr> <tr> <td>Sample no.</td> <td>AD101</td> </tr> <tr> <td>Locality</td> <td>Yunnan, Yunnan</td> </tr> <tr> <td>Collector</td> <td>Yunnan</td> </tr> <tr> <td>Accession number</td> <td>AD101</td> </tr> <tr> <td>Date</td> <td>1995</td> </tr> <tr> <td>Project</td> <td>BYV, 1995, 118Y</td> </tr> </tbody> </table> <p>Image</p>		Description of reference material	Plant specimen	Scientific name	<i>Adiantum species</i>	Laboratory number	AD101	Sample no.	AD101	Locality	Yunnan, Yunnan	Collector	Yunnan	Accession number	AD101	Date	1995	Project	BYV, 1995, 118Y
Description of reference material	Plant specimen																		
Scientific name	<i>Adiantum species</i>																		
Laboratory number	AD101																		
Sample no.	AD101																		
Locality	Yunnan, Yunnan																		
Collector	Yunnan																		
Accession number	AD101																		
Date	1995																		
Project	BYV, 1995, 118Y																		

應用

- 失去外形特徵的中成藥起始物料
- 多基源的中藥材 (含有多於一個品種的中藥材)
- 欠缺獨特化學指標成分的藥材

已完成的中藥材

- | | | | | |
|--------|--------|-------|-------|--------|
| • 人參 | • 使君子 | • 委陵菜 | • 紫草 | • 黃連 |
| • 西洋參 | • 川貝母 | • 白頭翁 | • 金錢草 | • 五味子 |
| • 三七 | • 暗紫貝母 | • 紅花 | • 當歸 | • 威靈仙 |
| • 桔梗 | • 梅花鹿 | • 西紅花 | • 酸棗仁 | • 廣金錢草 |
| • 防風 | • 馬鹿 | • 五加皮 | • 茵陳 | • 巴戟天 |
| • 天山雪蓮 | • 太子參 | • 川黃柏 | • 補骨脂 | • 紫花前胡 |

專論已上載至衛生署中醫藥規管辦公室的網頁:

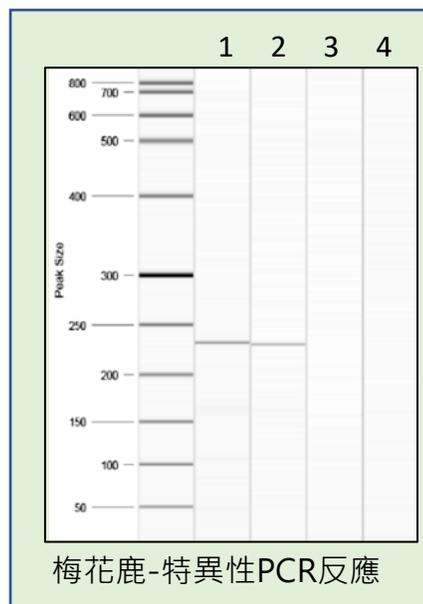
https://www.cmro.gov.hk/html/b5/useful_information/gcmti/research/btc/DNA_sequences.html



DNA實驗室的研究項目- 以DNA技術作為鑒別鹿茸的互補檢測方法

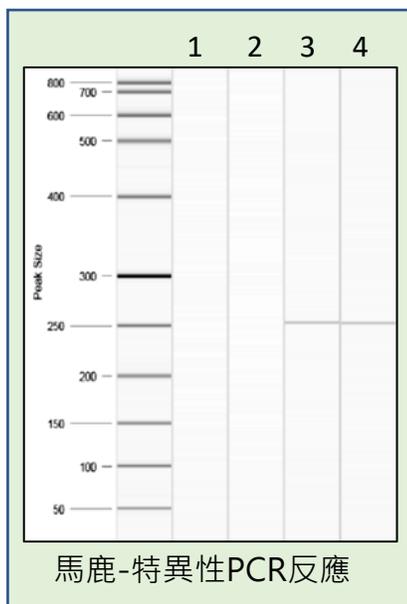
市場情況

- 大部分鹿茸均切片或磨成粉出售
- 因失去外型特徵，出現以較便宜品種訛稱是正品鹿茸出售



梅花鹿-特異性PCR反應

樣品 1, 2: 梅花鹿



馬鹿-特異性PCR反應

樣品 3, 4: 馬鹿

傳統鑒別方法

- 性狀鑒別能辨別原藥材，但不適用於切片或磨成粉的鹿茸
- 因欠缺獨特化學指標成分，化學分析方法不適用

檢測中心的方法

- 採用特異性-聚合酶鏈式反應技術 (specific PCR)
- 快速篩選鹿茸正品品種 - 梅花鹿和馬鹿
- 方法適用於不同鹿製品
- 無需DNA測序，操作流程較簡單，與傳統鹿茸鑒別法互補不足



方法已上載至衛生署中醫藥規管辦公室的網頁:

https://www.cmro.gov.hk/html/b5/useful_information/gcmti/research/testing_methods/index.html



DNA實驗室的項目- 川貝母中常見摻雜品 – 平貝母的DNA 鑒別方法

市場情況

根據香港《中醫藥條例》及《中國藥典》

川貝母	平貝母
源自貝母屬植物的乾燥鱗莖	源自平貝母的乾燥鱗莖
名貴中藥材	市場價格較低

- 市面上有川貝母被磨成粉末出售
- 出現川貝母摻入市場價格較低的平貝母

傳統鑒別方法

- 性狀鑒別能準確區分平貝母和川貝母原藥材
- 藥材粉末因失去明顯性狀特徵，在鑒別時較難作出準確判斷
- 不適用於混合樣品

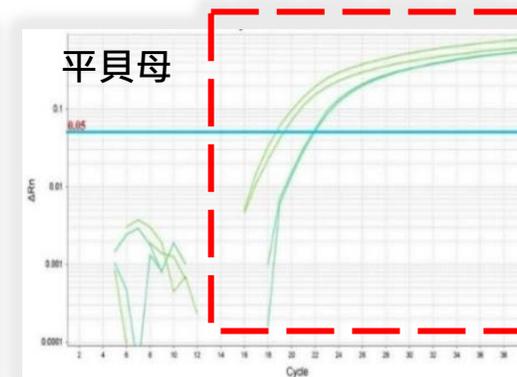
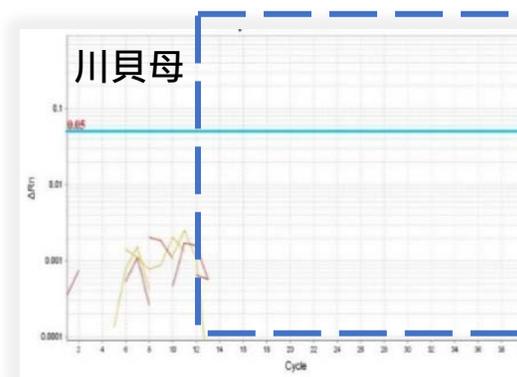
方法已上載至衛生署中醫藥規管辦公室的網頁:

https://www.cmro.gov.hk/html/b5/useful_information/gcmti/research/testing_methods/index.html



檢測中心的方法

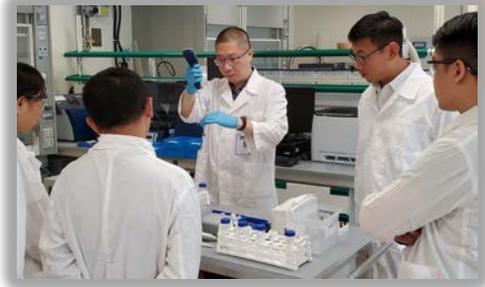
- 採用實時聚合酶鏈式反應 (real-time PCR) 技術，以特异性探針偵測平貝母
- 快捷及準確檢測偵測出川貝母中摻雜品



檢測中心- 技術轉移及宣傳教育工作



中醫藥文化短片



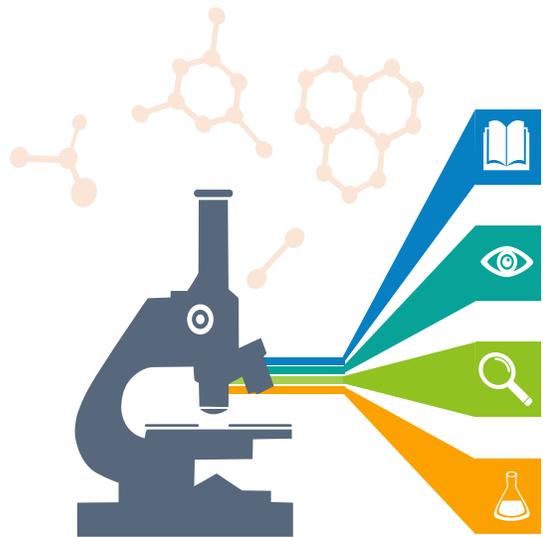
中藥鑒定技術轉移



研究項目成果推廣

公眾教育





項目背景



酸棗仁

來源

- 鼠李科植物酸棗 *Ziziphus jujuba* Mill. var. *spinosa* (Bunge) Hu ex H. F. Chou 的乾燥成熟種子
- 《中國藥典》2020年版收載的藥材

功能

- 養心補肝，寧心安神，斂汗，生津

市場情況

- 中成藥的原料，例如酸棗仁湯、歸脾丸
- 在市場上的使用量大，並會與外形相近的種子或果實類藥材產生混淆



酸棗仁的常見混淆品

名稱	來源	藥用部位	收載於	混淆原因
理棗仁 Ziziphi Mauritiana Semen	鼠李科植物滇刺棗 <i>Ziziphus mauritiana</i> Lam.	乾燥成熟種子	《雲南省中藥飲片標準》	外形相似
枳椇子 Semen Hoveniae	鼠李科植物枳椇 <i>Hovenia acerba</i> Lindl.	乾燥成熟種子	《中醫藥條例》附表2	外形相似
補骨脂 Fructus Psoraleae	豆科植物補骨脂 <i>Psoralea corylifolia</i> L.	乾燥成熟果實	《中國藥典》2020年版、《中醫藥條例》附表2	外形相似
廣棗 Choerospondias Fructus	漆樹科植物南酸棗 <i>Choerospondias axillaris</i> (Roxb.) Burtt et Hill	乾燥成熟果實	《蒙藏習用藥材》	名稱相似



酸棗仁的傳統鑒別方法

酸棗仁



紫紅色或紫褐色



中間有**1**條隆起的縱綫紋

理棗仁



黃棕色至紅棕色或棕色



中間無隆起的縱綫紋

枳椇子



暗棕色或黑棕色



一面較平坦，中間有**1**條縱綫紋

補骨脂



黑色、黑褐色或灰褐色

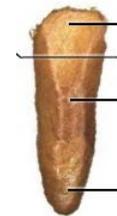


凹陷的一側有果梗痕

廣棗



淺黃棕色或棕色



平滑有光澤



酸棗仁及其常見混淆品DNA鑒別研究

業界意見及文獻考證

- 酸棗仁與部份混淆品親緣關係相近，業界建議檢測中心開發分子分析方法
- 雖然有文獻記載以DNA技術鑒別酸棗仁的可行性研究，但測試方法主要是針對單一混淆品種，未見相關常見混淆品的全面性研究

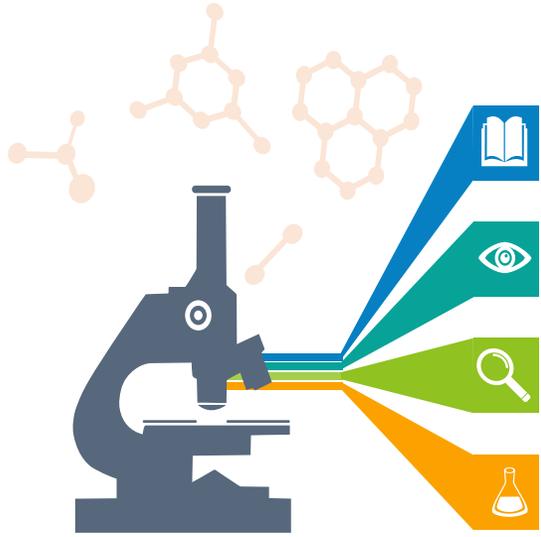
目標

- 所開發的DNA檢測方法應
 - 能區分酸棗仁及其常見混淆品，包括理棗仁、枳椇子、補骨脂和廣棗
 - 操作簡便，檢測成本較低

項目對中醫藥業的重要性

- 酸棗仁與混淆品的藥性可能存在一定差異，錯誤配發或使用混淆品有機會影響臨床處方及中成藥的療效
- 所開發的DNA檢測方法有助提供更全面的參考依據作區分酸棗仁及其常見混淆品，從而完善酸棗仁的鑒別體系，以確保中成藥的安全和品質





檢測方法的介紹



酸棗仁及其常見混淆品DNA鑒別研究

- 研究工作已全部完成
- 檢測中心開發了「利用聚合酶鏈式反應限制性片段長度多態性鑒別酸棗」(GCMTI RD-4:2024)
- 檢測方法已上載至衛生署中醫藥規管辦公室的網頁

下載檢測方法



檢測方法

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



酸棗仁 枳椇子

政府中藥檢測中心

第 1 頁，共 9 頁

補充資料

GCMTI RD-4:2024
(補充資料)

補充資料
(資訊性)

經政府中藥檢測中心內部驗證的方法

本方法經政府中藥檢測中心內部驗證，使用者自行更改任何程序，須充分驗證方法，並負責評估對測試項目的適用性。

本方法列出的品牌、供應商及產品編號僅供參考之用，並不構成或暗示政府中藥檢測中心對產品的認可，採用不在此列的試劑、材料或器具或可達到等效表現，惟實驗室有責任確保可滿足本方法所訂明的性能要求。

S1 步驟

S1.1 配製樣品

S1.1.1 一般情況下，20至100毫克的樣品或提取液性對照（簡稱EPC，參看第7.1段）足夠進行DNA提取，亦可根據其性質調整批量。

S1.1.2 對於粉末狀的樣品，宜將轉移至2毫升微量管，繼續第S1.2.1段。

S1.1.3 對於外觀完整的樣品應使用研鉢和研杵，研碎成粉末後轉移至2毫升微量管，另外，亦可使用研磨管以高速攪動來研碎樣品，但需研磨預熱數秒和時間設定為28赫茲和30秒，完成後把研磨管旋轉180度，再以28赫茲攪動30秒，繼續第S1.2.1段。

S1.1.4 凍存空白2毫升微量管，作為提取液性對照（簡稱EBC，參看第7.2段）。

S1.1.5 EPC及EBC在DNA提取過程中，與樣品同步處理，繼續第S1.2段。

S1.2 DNA提取

S1.2.1 轉移樣品、EPC及EBC。

S1.2.2 把提取液混合（簡稱LB，參看S5）與蛋白酶K（20毫克/毫升）按10:1:1的比例混合，新鮮配成蛋白酶K-提取液（簡稱

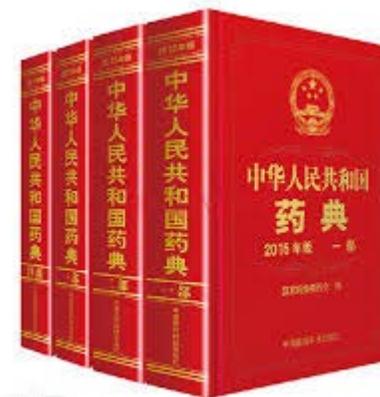
第 1 頁，共 14 頁

https://www.cmro.gov.hk/html/b5/useful_information/gcmti/research/btc/ziziphi_spinosae_semen.html



DNA鑒別技術

- 國際及國內機構接納採用脫氧核糖核酸 (DNA) 鑒別技術檢測草藥
- 作為傳統鑒別技術的補充方案



優勢	限制
分辨能力強，能有效鑒別物種	無法對中藥材的品質進行評估
適用於容易混淆、多來源物種、沒有獨特化學成分標記的中藥材	不適用於礦物類中藥材
生物各部位的DNA序列一致，而且不受生物環境及年齡所限制	由於物種各部位的DNA序列一致，因此無法分辨不同部位，例如蓮葉、蓮子、蓮鬚



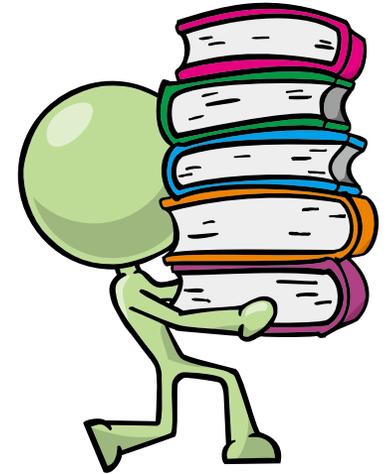
DNA鑒別技術分類

DNA測序

- 需要進行DNA測序，儀器投資和檢測成本高
- DNA條形碼 (DNA barcoding)
- DNA特徵序列 (DNA signature sequence, DSS)

非DNA測序

- 省去DNA測序程序
- ➔ • 聚合酶鏈式反應-限制性片段長度多態性 (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)
- 特異性聚合酶鏈式反應 (specific-polymerase chain reaction, specific-PCR)
- 實時聚合酶鏈式反應 (real-time polymerase chain reaction, real-time PCR)



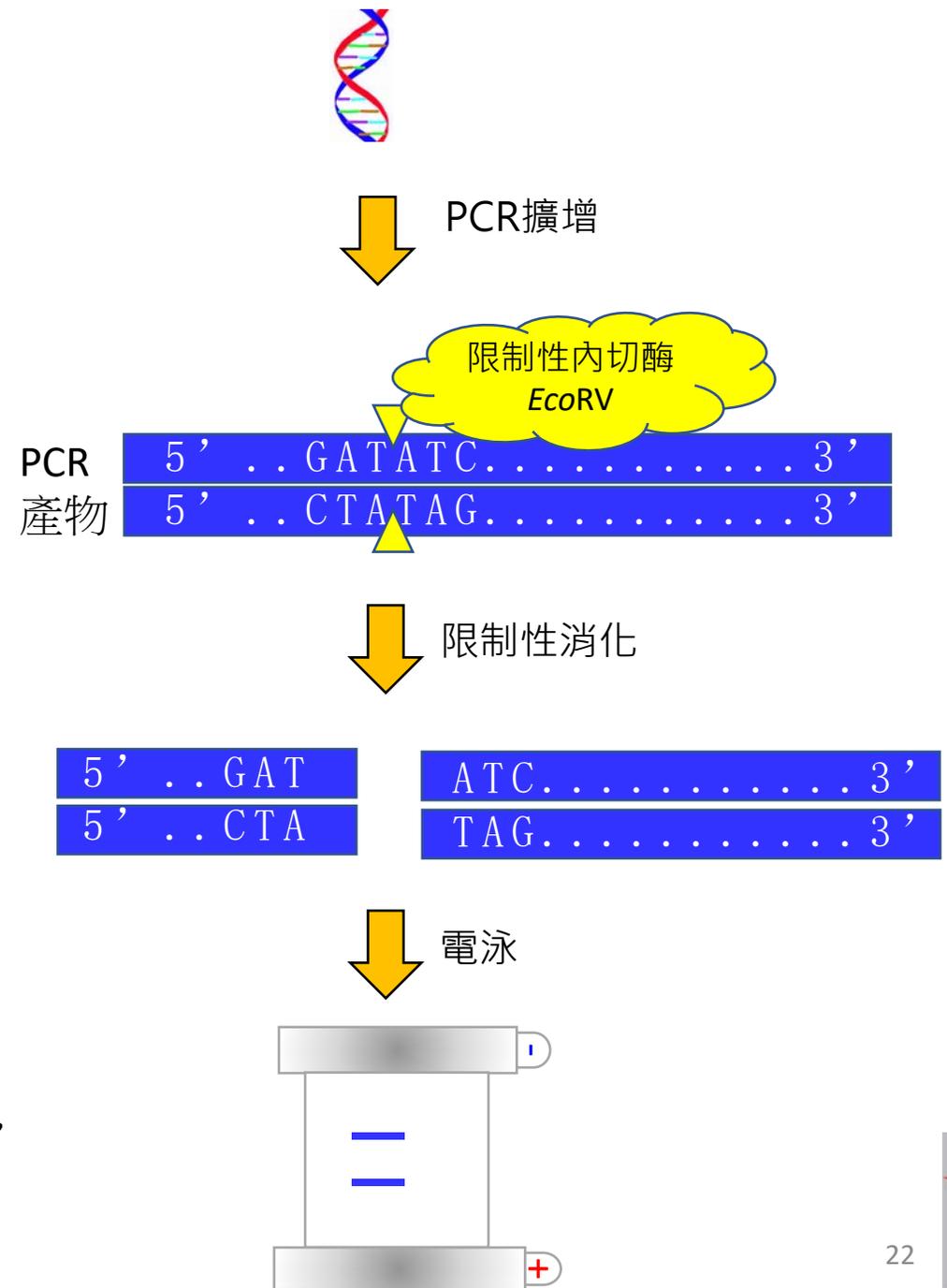
甚麼是PCR-RFLP?

原理

- 一種結合PCR和RFLP的DNA技術
- 首先進行PCR，將包含酶切位點的DNA區域擴增
- 加入限制性內切酶，對PCR產物進行限制性消化
- 經電泳後得出DNA圖譜
- 根據DNA圖譜上獨特的、多態性的DNA片段，作出物種鑒別

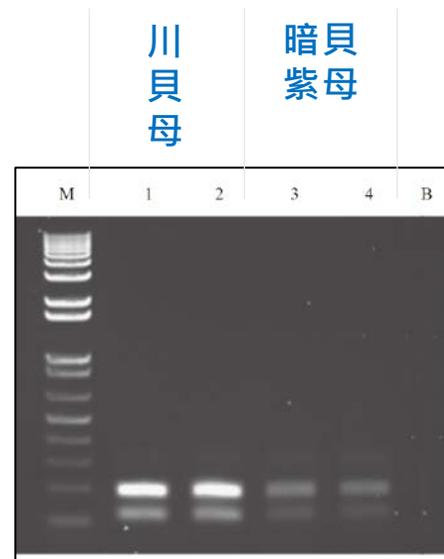
優點及限制

- 相對DNA測序，實驗步驟簡單，但所獲取的DNA序列訊息有限
- 相對特異性PCR或實時PCR，對於熱循環儀的溫度精確度的要求較低，但因增加了一個酶切步驟，所以實驗時間較長



PCR-RFLP檢測中藥材的例子

藥材	物種	引物 (5'→3')	限制性內切酶	鑒別	收載
川貝母	川貝母 <i>Fritillaria cirrhosa</i> 、暗紫貝母 <i>F. unibracteata</i> 、甘肅貝母 <i>F. przewalskii</i> 、梭砂貝母 <i>F. delavayi</i> 、太白貝母 <i>F. taipaiensis</i> 或瓦布貝母 <i>F. unibracteata</i> var. <i>wabuensis</i>	i) CGTAACAA GGTTTCCG TAGGTGAA ii) GCTACGTT CTTCATCG AT	<i>Sma</i> I (5' CCCGGG 3')	川貝母在 100~250鹼基 對(bp)應有兩 條DNA譜帶	《中國藥 典》2020 年版、《 港標》(第 七期)
石斛	金釵石斛 <i>Dendrobium nobile</i> 、霍山石斛 <i>D. huoshanense</i> 、鼓槌石斛 <i>D. chrysotoxum</i> 或流蘇石斛 <i>D. fimbriatum</i> 的栽培品及其同屬植物近似種	i) ATTCTTCA TCAAGTTT AGTGCATT C ii) AGAGCTG ATGGGCCT TTGA	<i>Alu</i> I (5' AGCT 3')	霍山石斛在 100~200 bp間 應有單一 DNA條帶， 且PCR產物與 酶切產物條帶 位置一致	《中國藥 典》2020 年版



《港標》(第七期)以PCR-RFLP鑒別川貝母的示例圖



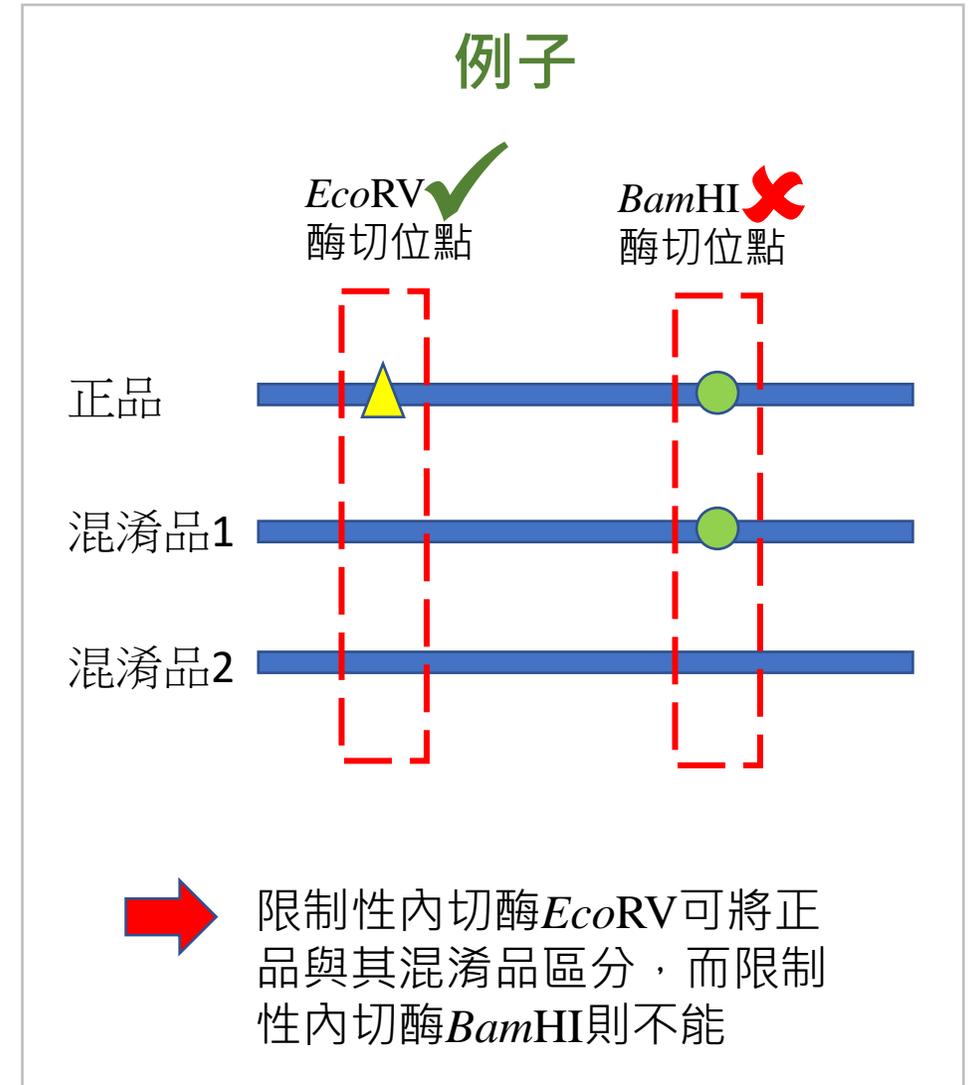
開發PCR-RFLP檢測方法的流程

找出酶切位點

- 從DNA數據庫，下載正品及其混淆品的DNA序列
- 進行序列比對，找出序列差異處
- 透過分析序列差異處，找出可用於區分正品和其混淆品的限制性內切酶

確認引物及限制性內切酶

- 設計PCR引物，利用所收集的樣品，對目標區域進行PCR，確保所設計的引物可同時PCR擴增正品及其混淆品
- 進行DNA測序，確定正品及其混淆品上的序列差異穩定
- 利用所收集的樣品，進行限制性消化酶切，確保正品及其混淆品的DNA圖譜穩定



PCR分析的技術要求

引物的通用性

- 能夠同時擴增正品及其混淆品的目標DNA區域
 - 若引物與目標DNA區域未能完全互補，應進行實驗確保目標DNA區域能夠被PCR擴增

目標DNA區域

- PCR產物長度的適合範圍: ~300 至 ~600 bp
 - 最少應達300個鹼基對(bp)，否則經酶切後DNA譜帶太小，難以檢查
 - 不能太大(如>1000 bp)，因為中藥材的DNA大部份已降解，目標區域過大會降低PCR擴增的成功率



限制性消化分析的技術要求

限制性內切酶

- 只使用一種限制性內切酶，簡化操作程序

殘留的PCR試劑

- 如果DNA圖譜受殘留在PCR產物中的PCR試劑所影響，必須在限制性消化分析前，加入純化PCR產物的步驟

PCR產物上的酶切位點

- 數目不能太多，否則圖譜過於複雜，難以分析
- 如果只有一個酶切位點，該位點不應在PCR產物的正中間位置



酶切產物

- 經限制性消化後，所產生的每條DNA譜帶的長度，應達~100 bp或以上，否則難以在圖譜上觀察
- 每段酶切產物之間，大小相差應達~50 bp，若差距太少，圖譜上的譜帶或會出現重疊，影響結果觀察及判斷



本檢測方法的技術參數

技術參數	數值/描述	能否達到定下的技術要求?
目標DNA區域	核糖體DNA第二內部轉錄間隔區 (Internal transcribed spacer 2, ITS2)	不適用
PCR的引物	正向引物: ITS2F 反向引物: ITS3R	能夠同時擴增正品及混淆品的目標DNA區域 ✓
PCR產物長度 (bp)	酸棗仁: 487; 理棗仁: ~483; 枳椇子: ~481; 補骨脂: ~510; 廣棗: ~550	PCR產物長度的適合範圍: ~300 至 ~600 bp ✓
限制性內切酶	<i>BfmI</i> 5' ... C [▼] TRYA G ...3' 3' ... G AYRT [▲] C ...5' ▼ ▲ :代表切割位置	只使用一種限制性內切酶 ✓
PCR產物上的酶切位點	酸棗仁: 1個位點, 位於第284至289 bp; 理棗仁、枳椇子、補骨脂和廣棗: 沒有 <i>BfmI</i> 酶切位點	1) 數目不能太多 2) 如果只有一個酶切位點, 該位點不應在PCR產物的正中間位置 ✓
限制性片段長度 (bp)	酸棗仁: 203 及 284 bp; 理棗仁、枳椇子、補骨脂和廣棗: 與其PCR產物長度一致	1) 每條DNA譜帶應 > 100 bp 2) 每段酶切產物相差應 > 50 bp ✓



試劑

DNA提取

- DNA提取試劑盒，或手動提取所需的試劑，包括離心柱、硫氰酸胍、曲拉通X-100、聚山梨酯-20等
- 蛋白酶 K、核糖核酸酶A、 α -澱粉酶

PCR分析

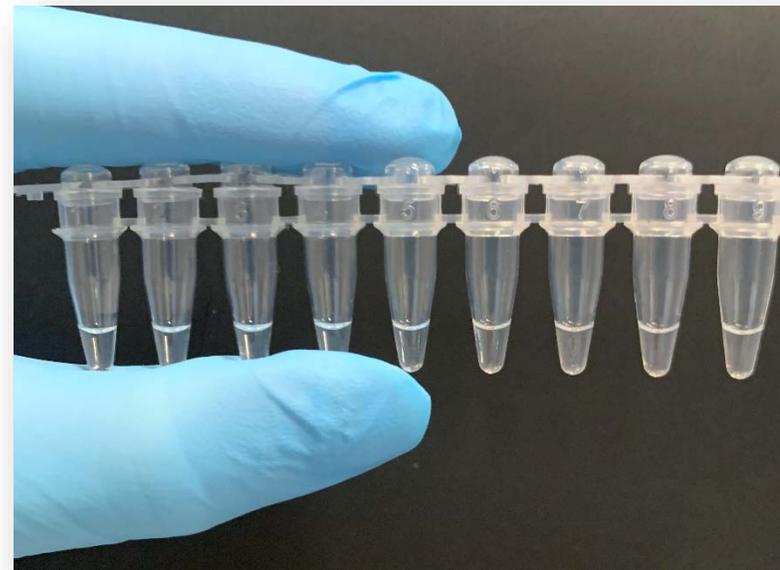
- DNA聚合酶、脫氧核糖核苷三磷酸、引物

限制性消化分析

- 限制性內切酶 *Bfml* (5' CTRYAG 3')

電泳

- 毛細管電泳試劑盒、DNA分子量標記



參考物質



儀器及設備

- 高壓斧
- 粉碎機、研磨機、研磨管
- 恆溫混勻儀
- 移液器
- 離心機
- 紫外-可見光分光光度計
- 層流櫃
- 熱循環儀
- 毛細管電泳儀



研磨機



紫外-可見光
分光光度計



層流櫃



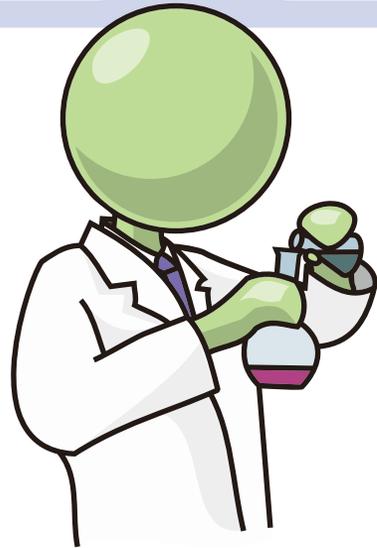
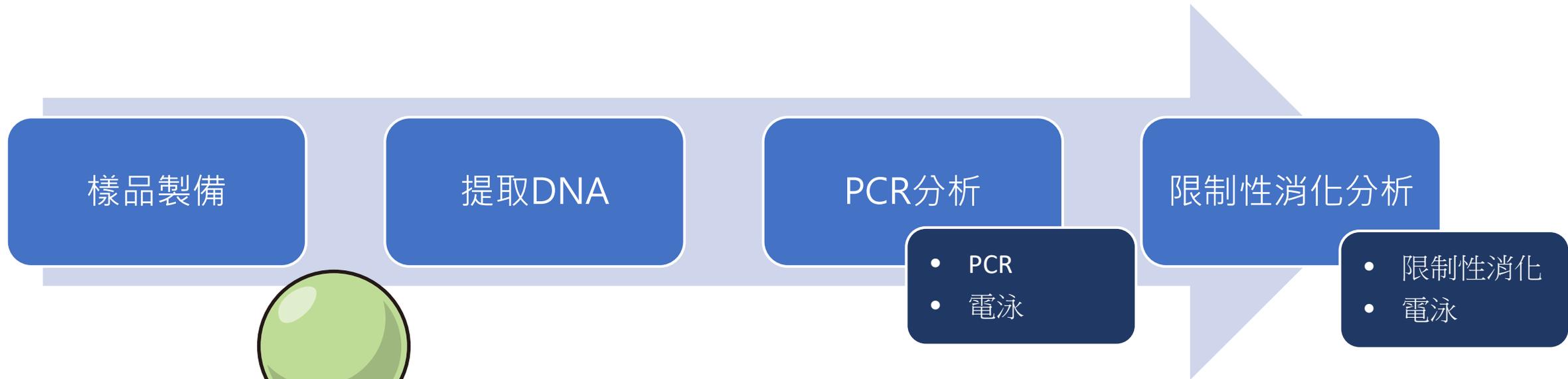
熱循環儀



毛細管電泳儀



方法步驟

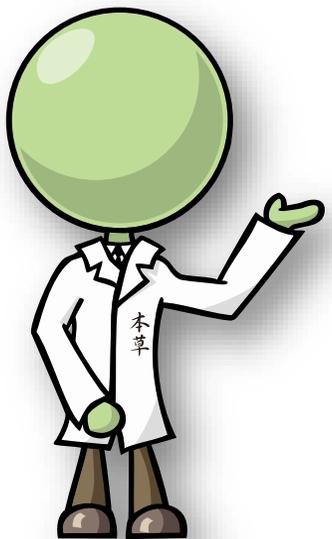


系統對照

名稱	性質	步驟
提取陽性對照 (EPC)	酸棗的參考物質	整個過程
提取陰性對照 (EBC)	空白	DNA提取、PCR分析
PCR陰性對照 (PNC)	水	PCR分析
限制性消化陰性對照 (RDNC)	水	限制性消化分析
隨機的平行樣對照	樣品	整個過程



樣品制備



樣品

- 約100 mg (視乎樣品大小)
- 確定樣品磨成粉末狀

提取陽性對照 (EPC)

- 酸棗的參考物質
- 約100 mg

提取陰性對照 (EBC)

- 空的微量離心管，加入DNA提取液

重覆
反應 (X2)



研磨機



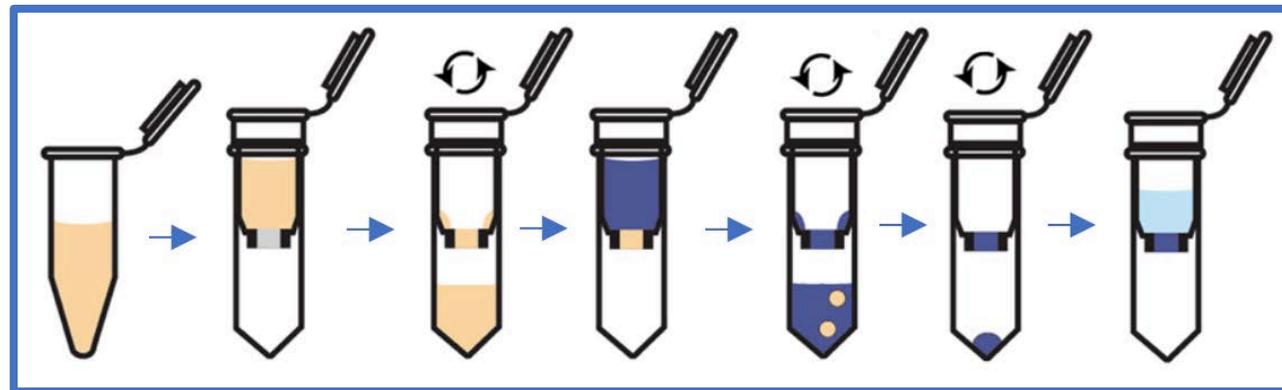
參考物質



提取DNA

方法

- DNA提取試劑盒
- GCMTI所提供的方法
 - GCMTI RD-4:2024
 - 離心柱型



離心柱型DNA提取法

均一化DNA

- 量度DNA濃度
- 以純水將樣品的DNA提取物，均一化至10 ng/ μ L



紫外-可見光分光光度計



PCR分析(1)

PCR試劑條件

試劑	最終濃度
10X高保真PCR緩衝液	1 X
硫酸鎂 (50毫摩爾每升)	2.0毫摩爾每升
脫氧核糖核苷三磷酸 (5毫摩爾每升)	0.2毫摩爾每升 @ dNTP
正向引物 (10微摩爾每升)	0.1微摩爾每升
反向引物 (10微摩爾每升)	0.1微摩爾每升
高保真Taq DNA聚合酶 (每微升5U)	每反應1.0 U
模板DNA	-
水	連同模板DNA計算，加至體積為25微升-

引物資訊

引物名稱	引物方向	寡核苷酸DNA序列 (5' - 3')	擴增子長度	目標DNA區域
ITS2F	正向	ATGCGATACTTG GTGTGAAT	約500 bp	植物核糖體DNA第二內部轉錄間隔區 (ITS2)
ITS3R	反向	GACGCTTCTCC AGACTACAAT		



熱循環儀



PCR分析(2)

PCR熱循環條件

溫度	時間	循環次數
94 °C	5分鐘	1
94 °C	30秒	40
56 °C	30秒	
72 °C	45秒	
72 °C	10分鐘	1
4 °C	∞	-

毛細管電泳

- Qiagen QIAxcel Advanced
- QIAxcel DNA High Resolution Kit
- QX DNA Size Marker 50–800 bp v2.0
- QX Alignment Marker 15 bp/1 kb
- OM500 method



毛細管電泳儀



限制性消化分析

限制性消化試劑條件

試劑	最終濃度	每個限制性消化所需的體積/量
10X反應緩衝液 (10X Buffer Tango)	1X	2.0微升
<i>BfmI</i> 限制酶 (每微升10U)	每反應 10.0 U	1.0微升
PCR產物	-	8.0微升
水	-	連同PCR產物計算， 加至體積為20微升

無須純化
PCR產物

限制性消化條件

溫度	時間	循環次數
37 °C	2小時	1
4 °C	∞	-

毛細管電泳

- Qiagen QIAxcel Advanced
- QIAxcel DNA High Resolution Kit
- QX DNA Size Marker 50–800 bp v2.0
- QX Alignment Marker 15 bp/1 kb
- OM500 method



毛細管電泳儀



PCR分析的擴增

判斷

- 陽性結果
 - 在電泳圖譜上，在約500 bp相應的位置應有一條DNA譜帶
- 陰性結果
 - 在電泳圖譜上，在約500 bp相應的位置沒有DNA譜帶
- 當樣品和EPC的擴增是陰性，表示：
 - 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
 - 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
 - 若採取了上述手段，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



限制性消化分析的PCR產物切割

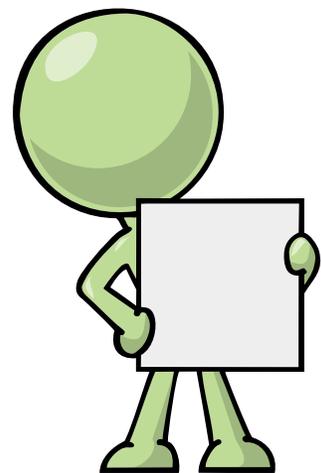
判斷

- 陽性結果
 - 在電泳圖譜上，在約200 bp和約300 bp相應的位置應各有一條DNA譜帶
- 陰性結果
 - 在電泳圖譜上，在約200 bp和約300 bp相應的位置沒有DNA譜帶，而在約500 bp相應的位置應有一條DNA譜帶；或
 - 觀察不到DNA譜帶
- 當在樣品和EPC觀察不到DNA譜帶，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



質量控制

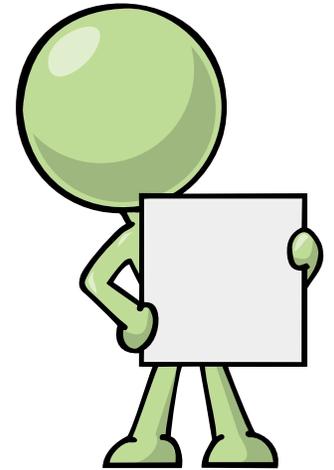
系統對照	PCR分析中的預期擴增	限制性消化分析中的預期PCR產物切割
提取陽性對照(EPC)	陽性	陽性
提取陰性對照(EBC)	陰性	不適用
PCR陰性對照(PNC)	陰性	不適用
限制性消化陰性對照(RDNC)	不適用	陰性



結果分析

檢視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 bp及約300 bp	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 bp	陰性



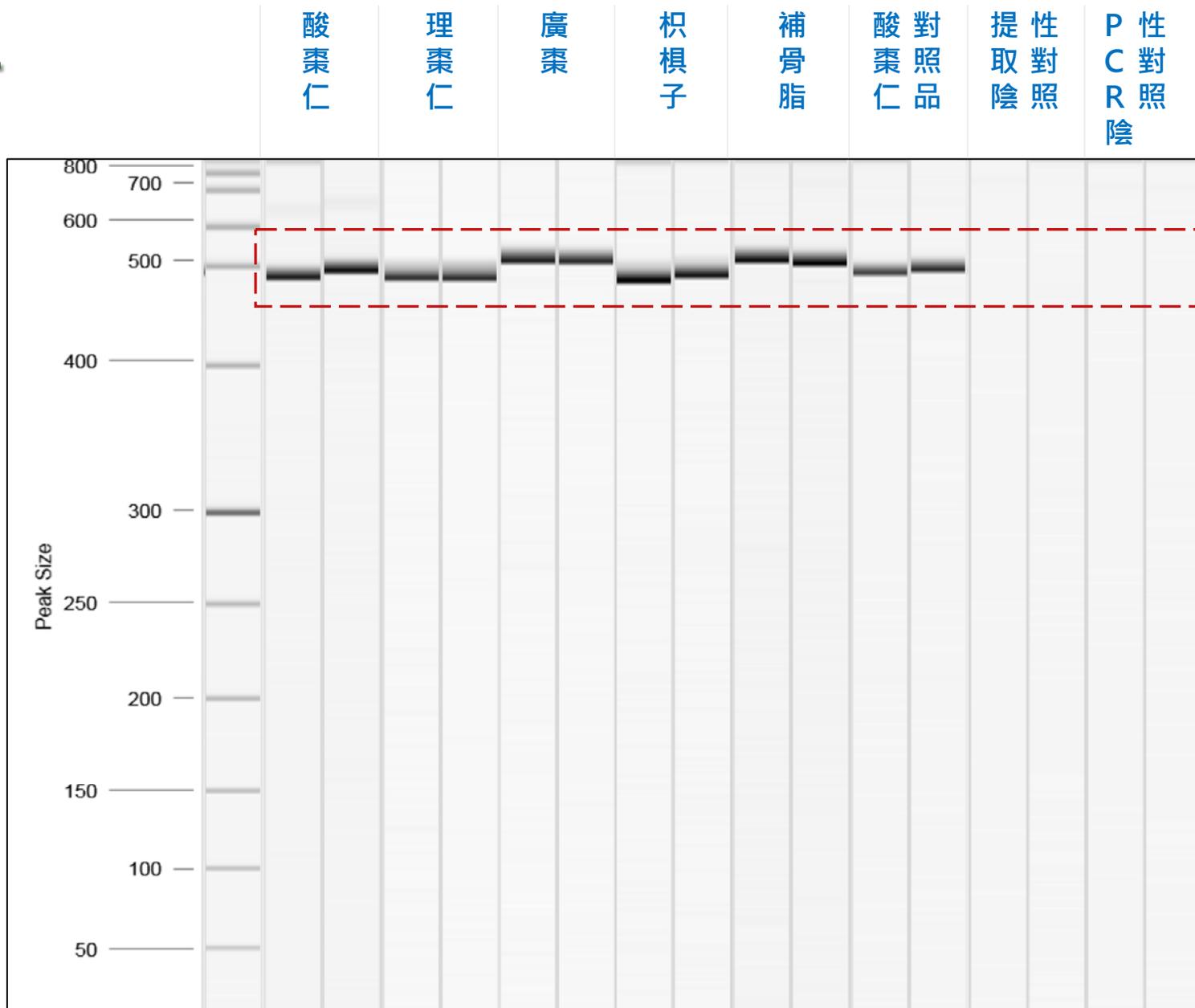
PCR擴增圖譜例子

毛細管電泳條件

- Qiagen QIAxcel Advanced
- QIAxcel DNA High Resolution Kit
- QX DNA Size Marker 50–800 bp v2.0
- QX Alignment Marker 15 bp/1 kb
- OM500 method



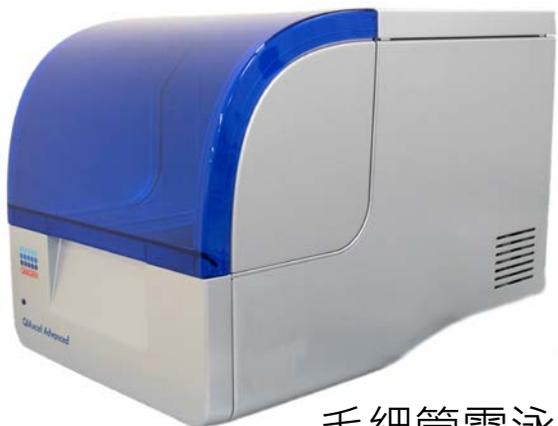
毛細管電泳儀



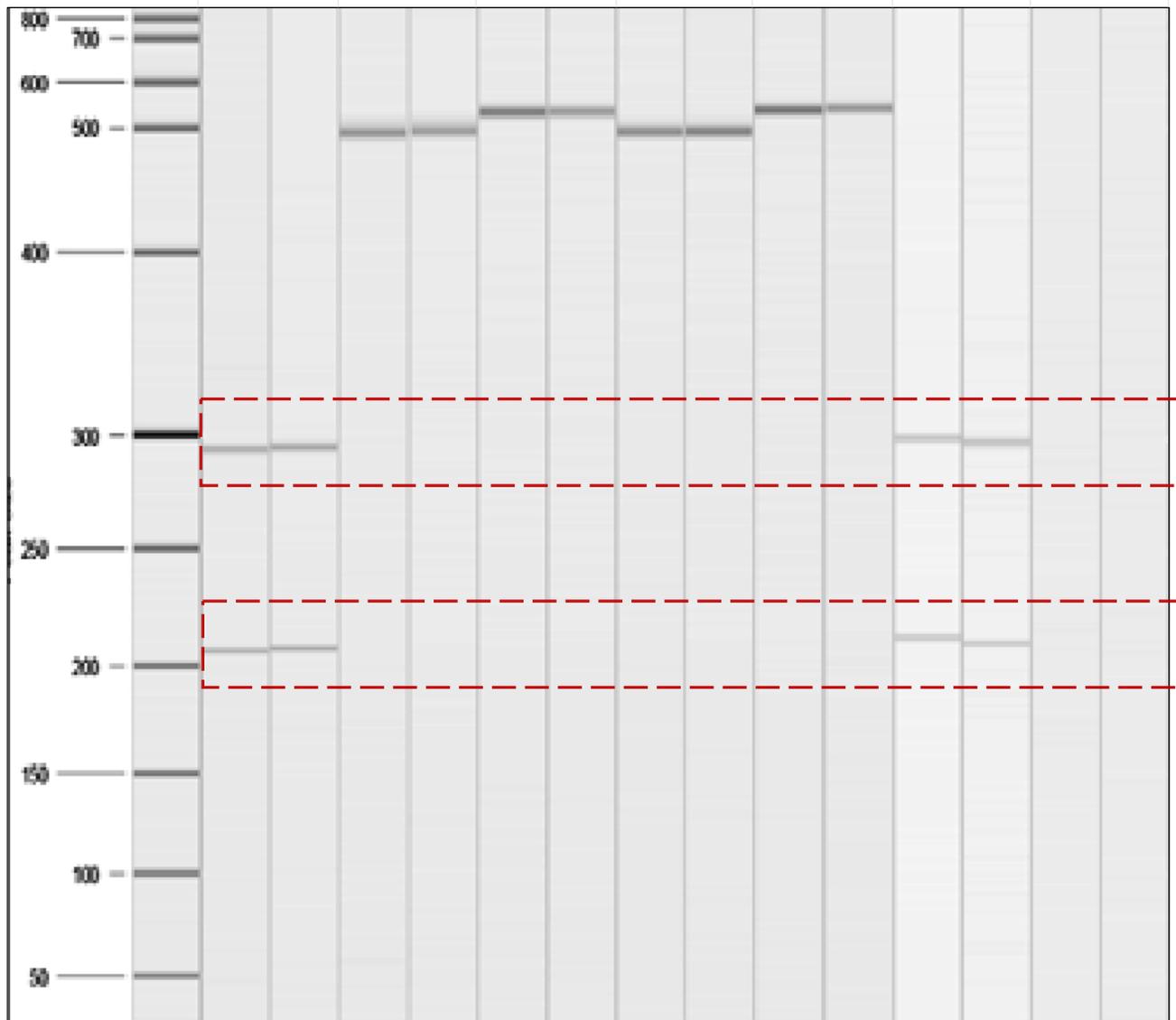
限制性消化圖譜例子

毛細管電泳條件

- Qiagen QIAxcel Advanced
- QIAxcel DNA High Resolution Kit
- QX DNA Size Marker 50–800 bp v2.0
- QX Alignment Marker 15 bp/1 kb
- OM500 method



毛細管電泳儀



限制性消化圖譜例子

酸棗仁

理棗仁

廣棗

補骨脂

枳椇子

酸棗仁
對照品

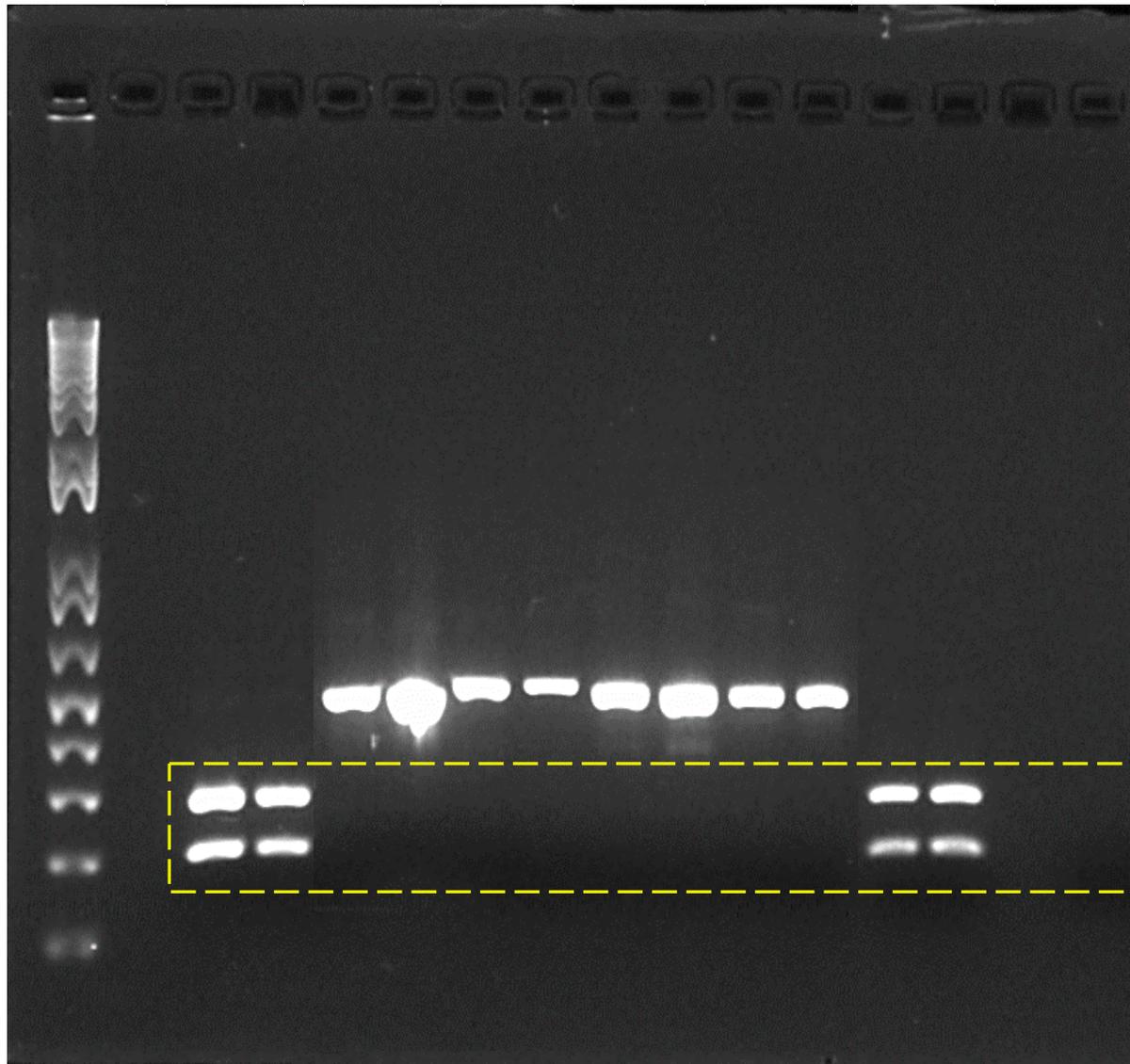
陰
性
對
照
化

凝膠電泳條件

- 凝膠: ~1.5%
- 1X TBE
- GelRed
- 130V for 30 min



凝膠成像系統



方法學考察 (1)

交叉反應 (cross-reactivity)

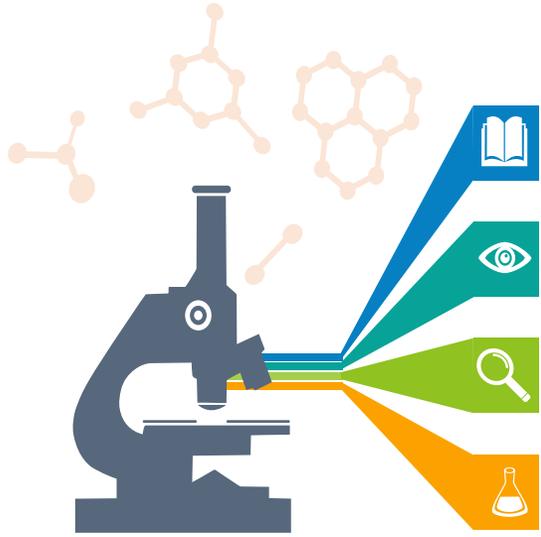
組別	中藥材	實驗結果	
		PCR分析	限制性消化分析
目標物種	酸棗仁	+	+
酸棗仁混淆品	理棗仁、枳椇子、補骨脂、廣棗	+	-
非目標物種(植物)	人參、三七、西洋參、桔梗、防風、天山雪蓮、使君子、川貝母(川貝母)川貝母(暗紫貝母)、孩兒參、委陵菜白頭翁、紅花、西紅花	+	-
非目標物種(動物)	鹿茸、雞、烏梢蛇、蕪蛇	-	-
非目標物種(真菌)	靈芝	+	-
	靈芝孢子、冬蟲夏草	-	-



方法學考察 (2)

項目	考察內容	考察結果
靈敏度 (Sensitivity)	評估檢測限 (limit of detection, LOD)	最少投入量為: 每反應0.048納克的酸棗仁模板 DNA
準確度 (Accuracy)	評估不同來源的酸棗仁樣品所獲得的測試結果	沒有發現假陰性
重複性 (Repeatability)	評估在不同時期或由不同操作人員所獲得的測試結果	獲得一致結果
穩健性 (Robustness)	評估系統會否因步驟中實驗參數的輕微故意變化而崩潰	獲得一致結果
可行性 (Feasibility)	評估從本地市場收集的酸棗仁樣品所獲得的測試結果	方法可應用於市場樣品
實驗室間比對 (Interlaboratory study)	評估由獨立的實驗室所獲得的測試結果	獲得一致結果





DNA檢測的 操作建議



DNA檢測的考慮

污染來源

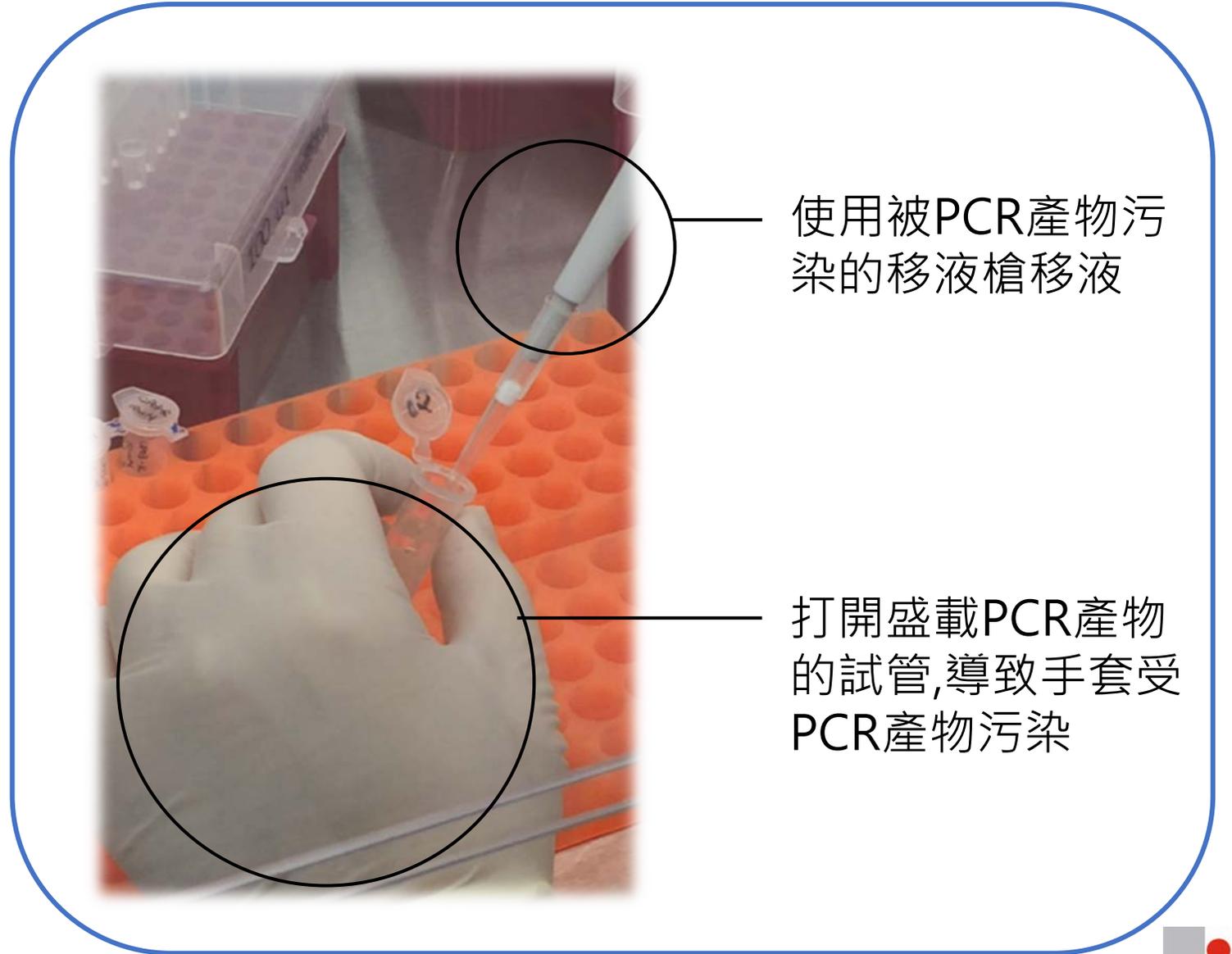
- 樣品交叉污染
- 樣品受環境污染
- 試劑污染
- PCR擴增物污染



污染途徑

PCR擴增物污染

- 最常見及主要原因
- 經PCR擴增後，PCR產物濃度高
- PCR擴增物氣懸膠體污染途徑
 - 打開盛載PCR擴增物的試管
 - 移液槍移液



守則

- 根據所進行的測試，將操作環境分成前PCR區和後PCR區
- 採用單向流程處理樣品

前PCR 後PCR

樣品處理、提取DNA

PCR擴增

電泳、測序、酶切



實驗室環境

- 最理想的情況下，不同功能的工作區劃分在獨立工作室
 - 試劑儲存和準備區
 - 樣品製備區
 - 核酸提取區
 - 擴增區
 - 擴增產物分析區
- 若受限制需在同一工作室，每個區應有適當設施，防止交叉污染



參考物質



試劑盒



樣品



測試中間產物



分裝試劑



防止污染措施

存放

- 樣品、對照物應與試劑應分開存放
- 試劑分裝儲存
- 存放測試中間產物在特定的位置
- 不能將PCR擴增物，帶到前PCR區域，污染源頭

位置

- 操作器材專用，不可隨意拿到其他區域
- 消毒儀器應在前PCR區
- 試劑的配製和存放在前PCR區



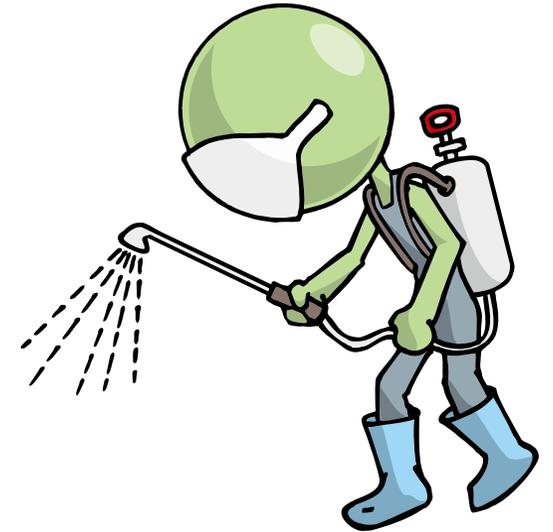
防止污染措施

保護裝備

- 戴手套和穿實驗袍

操作

- 樣品前處理時，每次只處理一份，避免交叉污染。處理下一份樣品前，更換手套
- 器具要高溫高壓消毒，或使用一次性已消毒用具
- 用有濾芯的吸頭
- 製備PCR混合液，分裝，最後才加入DNA模板
- 只可在後PCR區打開盛載PCR擴增物的試管
- 用70%酒精清理檯面，BSC和PCR櫃用完後照射紫外光



防止污染措施

使用層流櫃

- 用作PCR試劑備製或加入模板DNA
- 層流裝置保護試劑及模板DNA，減低受外界污染的機會
- 應配備高效濾網和紫外光燈

器具清潔

- 實驗枱面
- 離心機
- 混勻儀
- 層流櫃、生物安全櫃、通風櫃
- 電泳儀
- 紫外透射儀



層流櫃



清潔物品



謝謝

政府中藥檢測中心

網址

<https://www.cmro.gov.hk/html/b5/index.html>

電郵地址

gcmti@dh.gov.hk

