

T/ACCEM

团 体 标 准

T/ACCEMXXXX—2024

前胡分子鉴定技术规程

Technical regulations for molecular identification of qianhu

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 实施

中国商业企业管理协会 发 布

目 次

前言 II

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 仪器设备及试剂 1

5 溶液配制 1

6 引物 1

7 操作程序 1

8 结果及判定 2

9 资料记录和档案管理 3

附录 A（资料性） 仪器设备及试剂..... 4

附录 B（资料性） 溶液配制..... 6

附录 C（资料性） CTAB 法提取总 DNA..... 8

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由皖西学院提出。

本文件由中国商业企业管理协会归口。

本文件起草单位：皖西学院、六安市食品药品检验中心、六安市质量和标准化研究所、华润三九（六安）中药材产业发展有限公司。

本文件主要起草人：赵群、刘文丽、孙传伯、夏征宇、赵成、蒋平、徐光沛、高武艺、温建云、楚庆霞、高巍、闫士猛。

前胡分子鉴定技术规程

1 范围

本文件规定了前胡分子鉴定的仪器设备、试剂、溶液配制、引物、操作程序、结果及判定、资料记录 and 档案管理。

本文件适用于前胡、紫花前胡（基源植物为 *Angelica decursiva*）、石防风（基源植物为 *Peucedanum terebinthaceum*）和藁本（基源植物为 *Ligusticum sinense*）之间分子鉴定。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 仪器设备及试剂

除非另有说明，本文件所用试剂均为分析纯。仪器设备及试剂参见附录 A。

5 溶液配制

所有用水按 GB/T 6682 的要求，相关溶液配制方法参见附录 B。

6 引物

6.1 通用引物 TY3s: 5' - GGAATGCGCCAAGG -3' 。

6.2 通用引物 TY3a: 5' - TGCGTTCAAAGACTCGA -3' 。

6.3 特异性引物 CP19s: 5' - TGGCCACTCCCGGATT -3' 。

6.4 特异性引物 CP19a: 5' - GCCTAAGGGTCCTGAATCTC -3' 。

7 操作程序

7.1 样品准备

随机抽取 5 个~10 个个体分别取样。对于干燥样品，取 50 mg；对于新鲜样品，取 100 mg。

7.2 DNA 提取

用 CTAB 法提取总 DNA。具体过程见附录 C。

7.3 PCR 扩增

7.3.1 反应体系

反应体系总体积为 25 μL ，反应组分配制如下：

- a) DNA 模板 0.5 μL (5 ng~50 ng)；
- b) 上游引物 1 μL (10 pmol)；
- c) 下游引物 1 μL (10 pmol)；
- d) 10 $\times$ PCR Buffer 2.5 μL ；
- e) MgCl_2 (25 mM) 1.5 μL ；
- f) dNTPs (10 mM) 0.5 μL ；
- g) *Taq* DNA 聚合酶 (5 U/ μL) 0.5 μL ；
- h) ddH₂O 补足至 25 μL 。

7.3.2 反应程序

反应程序可根据引物不同选择下列程序中的一种。

- a) 程序 1: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min、30 个循环 (每个循环包括 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s)、72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min；
- b) 程序 2: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min、23 个循环 (每个循环包括 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s)、72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。

注：通用引物 TY3s 和 TY3a 用程序 1，特异性引物 CP19s 和 CP19a 用程序 2。

7.4 DNA 质量检测

反应程序 1 结束后，分别取 5 μL 扩增反应产物，经琼脂糖凝胶电泳，在全自动凝胶成像分析仪中观察并拍照。实验中设置无模板 DNA 的空白对照、阴性对照和阳性对照。实验重复 3 次。

7.5 PCR 产物检测

反应程序 2 结束后，分别取 5 μL 扩增反应产物，经琼脂糖凝胶电泳，在全自动凝胶成像分析仪中观察并拍照。实验中设置无模板 DNA 的空白对照、阴性对照和阳性对照。实验重复 3 次。

7.6 数据采集

7.6.1 DNA 质量检测

能扩增出 DNA 条带的数据记录为 1；不能扩增出 DNA 条带的数据记录为 0。

7.6.2 PCR 产物检测

能扩增出 DNA 条带的数据记录为 1；不能扩增出 DNA 条带的数据记录为 0。

8 结果及判定

8.1 DNA 质量检测

如果数据记录为 1，判定为该样品的 DNA 质量合格，能用于后续实验；如果数据记录为 0，判定为该样品的 DNA 质量不合格，不能用于后续实验。

8.2 PCR 产物检测

如果数据记录为 1，则所述待测样品中含有中药前胡；如果数据记录为 0，则所述待测样品中不含有中药前胡。

9 资料记录和档案管理

9.1 资料记录

前胡分子鉴定中的 DNA 质量检测数据和 PCR 产物检测数据应做详细的记录。

9.2 档案管理

前胡分子鉴定资料应建立档案并由专人保管，长期保存。

附录 A
(资料性)
仪器设备及试剂

A.1 主要仪器设备

- A.1.1 PCR 扩增器。
- A.1.2 电泳仪。
- A.1.3 电子天平。
- A.1.4 微量移液器。
- A.1.5 微波炉。
- A.1.6 高压灭菌锅。
- A.1.7 pH 酸度计。
- A.1.8 台式高速离心机。
- A.1.9 制冰机。
- A.1.10 凝胶成像系统或紫外透射仪。
- A.1.11 水浴锅或金属浴。
- A.1.12 冰箱。
- A.1.13 紫外分光光度计。

A.2 试剂

除非另有说明，在分析中均使用分析纯试剂，所用水符合 GB/T 6682 的规定。

- A.2.1 乙二胺四乙酸二钠。
- A.2.2 Tris 碱。
- A.2.3 浓盐酸。
- A.2.4 氢氧化钠。
- A.2.5 *Taq* DNA 聚合酶 Buffer: 含 Mg^{2+} 。
- A.2.6 四种脱氧核苷酸 (dNTPs)。
- A.2.7 *Taq* DNA 聚合酶。
- A.2.8 特异性引物。
- A.2.9 通用引物。
- A.2.10 溴酚蓝。
- A.2.11 二甲苯氰 (FF)。
- A.2.12 甘油。
- A.2.13 硼酸。
- A.2.14 无水乙醇。
- A.2.15 冰醋酸。
- A.2.16 十六烷基三乙基溴化铵 (CTAB)。
- A.2.17 聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)。
- A.2.18 氯仿。
- A.2.19 异戊醇。

- A. 2. 20 异丙醇。
- A. 2. 21 RNA 酶。
- A. 2. 22 琼脂糖。
- A. 2. 23 液氮。
- A. 2. 24 DNA 分子标准-600 (DNA Marker)。

附录 B
(资料性)
溶液配制

B.1 DNA 提取溶液的配制

B.1.1 0.5 mol/L EDTA溶液

称取 186.1 g $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 溶于 800 mL 水中,用固体 NaOH 调节 pH 至 8.0,定容至 1 000 mL,高压灭菌。

B.1.2 1 mol/L Tris-HCl 溶液

称取 60.55 g Tris 碱溶于适量水中,加 HCl 调节 pH 至 8.0,定容至 500 mL,高压灭菌。

B.1.3 0.5 mol/L HCl 溶液

量取 25 mL 浓盐酸,加水定容至 500 mL。

B.1.4 2% CTAB

分别称取 CTAB 20 g、NaCl 81.816 g、PVP 20 g,分别量取 1 mol/L Tris-HCl 溶液 (pH=8.0) 100 mL,0.5 mol/L EDTA 溶液 (pH=8.0) 40 mL,定容至 1 000 mL。

B.1.5 NaCl 溶液

5 mol/L NaCl 溶于水中,加水定容至 500 mL。

B.1.6 氯仿—异戊醇 (24:1)

分别量取 240 mL 氯仿和 10 mL 异戊醇,将两者混匀。

B.2 PCR 扩增溶液的配制

B.2.1 特异性引物和通用引物

用超纯水分别配制前引物和后引物终浓度均为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的储存液,各量取 10 μL 混合。

注:干粉配制前应先快速离心。

B.2.2 6 $\times$ 凝胶加样缓冲液

分别称取 25 mg 溴酚蓝和 25 mg 二甲苯氰 FF,置于 15 mL 塑料离心管中。向离心管中加 6 mL 去离子水,充分搅拌溶解。加入 3 mL 甘油混匀,最终用去离子水定容至 10 mL,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 的环境下保存。

B.3 琼脂糖凝胶电泳溶液的配制

B.3.1 10 $\times$ TBE 缓冲液

分别称取 Tris 碱 108 g、硼酸 55 g,量取 0.5 mol/L EDTA 溶液 37 mL,定容至 1 000 mL。

B.3.2 1 $\times$ TBE缓冲液

量取 10 $\times$ TBE 缓冲液 500 mL,加水定容至 5 000 mL。

B.3.3 10 mg/mL 溴化乙锭溶液

称取 1 g 溴化乙锭溶于适量水中，定容至 100 mL。

B.4 琼脂糖凝胶的制备

称取适量琼脂糖粉，加入适量 1×TBE 缓冲液，在沸水浴中将琼脂糖悬浮物加热至琼脂糖完全溶解，配制成浓度为 1% 或 2% 的琼脂糖凝胶。

附 录 C
(资料性)
CTAB 法提取总 DNA

按以下步骤进行 DNA 提取：

- a) 将无霉变的干燥药材置于粉碎机中研磨粉碎，过 40 目筛；
- b) 将粉末转移到 2.0 mL 的微量离心管中，加入 900 μL 已灭菌的 CTAB 提取液（配方：2%(2 g/100mL)CTAB, 100 mmol/L Tris-HCl pH=8.0, 20 mmol/L EDTA, 1.4 mol/L NaCl)、0.02 g PVP 40000、10 μL β -巯基乙醇充分振荡混匀，65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 1.5 h~2 h，期间轻摇 2~3 次；
- c) 取出冷却至室温，加入 900 μL 氯仿-异戊醇（体积比 24: 1），充分振荡混匀，12 000 g 离心 10 min；
- d) 取上清液，加入等体积氯仿-异戊醇（体积比 24: 1），充分振荡混匀，12 000 g 离心 10 min；
- e) 取上清液，加入 2/3 体积预冷的异丙醇溶液，-20 $^{\circ}\text{C}$ 放置 0.5 h 以上；
- f) 取出上清液，12 000 g 离心 10 min，弃上清液；
- g) 沉淀用 70%（体积分数）乙醇洗涤两次，37 $^{\circ}\text{C}$ 挥干乙醇；
- h) 加入 1 μL RNAase 和 100 μL ddH₂O 溶解；
- i) 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的浓度和纯度；
- j) 稀释成工作液或 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

注：其他所获 DNA 质量能够符合 PCR 扩增需要的 DNA 提取方法都适用于本文件。
