

ICS 点击此处添加 ICS 号

CCS 点击此处添加 CCS 号

T/FDSA

中国食品药品企业质量安全促进会团体标准

T/FDSA XXXX—XXXX

中成药中大米源性成分定性检测方法 PCR 法

Identification of rice derived materials in Chinese medicine
PCR method

（征求意见稿）

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX – XX – XX 发布

XXXX – XX – XX 实施

中国食品药品企业质量安全促进会 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 原理 1

5 试剂与材料 2

6 仪器设备 3

7 试样选取与制备 4

8 检测方法 4

10 检测过程中防止交叉污染的措施 5

11 废弃物处理 5

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。

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。

本文件由中国食品药品企业质量安全促进会并归口。

本文件起草单位：南京江北新区生物医药公共服务平台。

本文件主要起草人：。

本文件为首次发布。

中成药中大米源性成分定性检测方法 PCR 法

1 范围

本文件规定了中成药中大米源性成分检测的 PCR 方法。

本文件适用于中成药中大米源性成分的检测。

本方法的检出限为 0.1%。

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

GB/T 27403—2008 实验室质量控制规范 食品分子生物学检测

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

PCR 法（Polymerase Chain Reaction Method）

聚合酶链式反应，指在 PCR 体系中加入扩增预混液，利用核酸电泳技术检测 PCR 扩增结果。

3.2

核酸电泳技术（Nucleic Acid Electrophoresis Technology）

利用核酸电泳技术鉴定 PCR 结果。

3.3

基因克隆及测序技术（Gene Cloning and Sequencing Technology）

利用基因测序仪确定 DNA 序列。

4 原理

利用裂解液提取中成药中大米源性 DNA，以提取的 DNA 为模板进行 PCR 扩增，琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物；PCR 阳性产物采用克隆测序进行确证。

5 试剂与材料

除另有规定外，试剂为分析纯或生化试剂，实验用水符合 GB 6682 的要求。

5.1 DNA 提取用试剂

5.1.1 大米源性鉴别引物：5' TTAGCCTCCCGCTGCAGA3'和 5' AGAGTCCACAAGTGCTCCCG3'；

5.1.2 阳性对照：用市售大米样品做阳性对照；

5.1.3 超纯水；

5.1.4 琼脂糖：电泳纯；

5.1.5 乙醇；

5.1.6 溴化乙锭；

5.1.7 异丙醇；

5.1.8 氯仿；

5.1.9 Tris-HCl；

5.1.10 EDTA.2Na·2H₂O；

5.1.11 十六烷基三甲基溴化铵（CTAB）；

5.1.12 氯化钠（NaCl）；

5.1.13 硼酸；

5.1.14 氯化镁（MgCl₂）；

5.1.15 浓盐酸；

5.1.16 氢氧化钠；

5.1.17 溴酚蓝。

5.2 溶液配制：

5.2.1 70%乙醇：取 70 ml 乙醇（5.1.5）与 30 ml 超纯水混匀（5.1.3）；

5.2.2 氯仿/异戊醇（24：1）抽提液：取 24 ml 氯仿（5.1.8）和 1 ml 异丙醇（5.1.7），混匀；

5.2.3 1 mol/L Tris-HCl（pH 8.0）：称取 Tris-HCl（5.1.9）121.1 g 溶解于约 800 ml 超纯水（5.1.3）中，加浓盐酸（5.1.15）或氢氧化钠（5.1.16）调节溶液 pH 值至 8.0，用超纯水（5.1.3）定容至 1 L，溶液经高温高压灭菌后，于室温下保存；

5.2.4 10 mmol/L Tris-HCl（pH 8.0）：称取 Tris-HCl（5.1.9）1.21 g 溶解于约 800 ml 超纯水（5.1.3）中，加浓盐酸（5.1.15）或氢氧化钠（5.1.16）调节溶液 pH 值至 8.0，用超纯水（5.1.3）定容至 1 L，溶液经高温高压灭菌后，于室温下保存；

5.2.5 0.5 mol/L EDTA（pH 8.0）：称取 EDTA.2Na·2H₂O（5.1.10）186.1 g 溶解于约 800 ml 超纯水（5.1.3）中，加氢氧化钠（5.1.16）调节溶液的 pH 值至 8.0，用超纯水（5.1.3）定容至 1 L，溶液经高温高压灭

菌后，于室温下保存；

5.2.6 1 mmol/L EDTA (pH 8.0)：称取 EDTA.2Na·2H₂O (5.1.10) 0.37 g 溶解于约 800 ml 超纯水 (5.1.3) 中，加氢氧化钠 (5.1.16) 调节溶液的 pH 值至 8.0，用超纯水 (5.1.3) 定容至 1 L，溶液经高温高压灭菌后，于室温下保存；

5.2.7 TE 缓冲溶液 (Tris-HCl、EDTA 缓冲液)：10 mmol/L Tris-HCl (5.2.4)，1 mmol/L EDTA (5.2.6)；

5.2.8 CTAB 提取缓冲液：CTAB (5.1.11) 10 g、NaCl (5.1.12) 40.91 g、1 mol/L Tris-HCl (5.2.3) 50 ml、0.5 mol/L EDTA (5.2.5) 20 ml，用 200 ml 超纯水 (5.1.3) 溶解，超纯水 (5.1.3) 定容至 500 ml，灭菌；

5.2.9 溴化乙锭贮存液：取溴化乙锭 (5.1.6)，用超纯水 (5.1.3) 配制成 10 mg/ml；

5.2.10 电解缓冲液：Tris-HCl (5.1.9) 54 g，硼酸 (5.1.13) 27.5 g，0.5 mol/L TE 缓冲溶液 (5.2.7) 20 ml，加超纯水 (5.1.3) 至 1000 ml，稀释 10 倍后使用；

5.2.11 dNTPs：脱氧腺苷三磷酸 (dAMP)，脱氧鸟苷三磷酸 (dGMP)、脱氧胞苷三磷酸 (dCMP) 和脱氧胸苷三磷酸 (dTMP)；

5.2.12 PCR 预混液 (2×)：Taq DNA 聚合酶 (0.05 U/μL)、反应缓冲液、4 mM MgCl₂ 和 0.4 mM dNTPs；

5.2.13 溴酚蓝指示剂 (0.25%)：加 1 g 溴酚蓝 (5.1.17) 于 100 ml 超纯水 (5.1.3) 中，搅拌至其完全溶解，另取 2.5 ml 上述溶液稀释至 10 ml，混匀。

6 仪器设备

6.1 常规 PCR 检测系统；

6.2 核酸电泳仪；

6.3 电子天平：感量 0.01 g；

6.4 高速离心机：离心力 12000 g；

6.5 微量移液器；

6.6 PCR 反应管；

6.7 恒温水浴锅；

6.8 核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计；

6.9 凝胶成像仪；

6.10 高速粉碎机；

6.11 筛网：100 目、60 目和 20 目；

6.12 离心管：1.5 ml；

6.13 量筒：100 ml；

6.14 微波炉；

6.15 DNA 测序仪。

7 试样选取与制备

选取出具有代表性的样品适量，用高速粉碎机粉碎至全部过筛网，使其粒径小于 2 mm，充分混合均匀，储存于洁净的样品袋中密封保存，供检测用。

8 检测方法

8.1 样品中 DNA 提取

称取粉碎后的样品（粒度为 100 目称取 50 mg，60 目称取 100 mg，20 目称取 200 mg），于 1.5 ml 离心管中，加入 600 μ l~800 μ l CTAB 提取缓冲液（5.2.8），65 $^{\circ}$ C 30 min，期间不时振荡，混匀；12000 g 离心 5 min，转移上清液 400 μ l 至洁净离心管中，加入 400 μ l 氯仿/异戊醇抽提液（5.2.2），混匀，12000 g 离心 5 min，取上清液；加 0.8 倍体积异丙醇（5.1.7），沉淀，12000 g 离心 5 min，弃上清液，70%乙醇（5.2.1）洗涤一次，晾干；加入 50 μ l TE 缓冲溶液（5.2.7），溶解沉淀，得模板 DNA 溶液。

备注：也可用等效的 DNA 提取试剂盒提取模板 DNA 溶液。

8.2 DNA 纯度和浓度的测定

取 5 μ l 模板 DNA 溶液加超纯水（5.1.3）稀释至 1 ml，使用核酸蛋白分析仪或紫外分光光度计分别检测 260 nm 和 280 nm 处的吸光值 A₂₆₀ 和 A₂₈₀。DNA 的浓度按式（1）计算：

$$C=A \times N \times 50/1000 \dots \dots \dots (1)$$

式中：

C——DNA 浓度，单位为微克每微升（ μ g/ μ l）；

A——260 nm 处的吸光值；

N——核酸稀释倍数。

当 A₂₆₀/A₂₈₀ 比值在 1.7~1.9 之间时，适宜于 PCR 扩增。

8.3 PCR 扩增

25 μ l 反应体系：取 PCR 预混液（5.2.12）12.5 μ l，鉴别引物（50 μ mol/L）（5.1.1）各 0.2 μ l，模板 DNA 溶液 2.1 μ l，超纯水（5.1.3）10 μ l 于 0.2 ml 的 PCR 反应管；每个样品平行制备 2 份。

PCR 反应条件随仪器不同略有改变，一般的反应程序为：95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min。95 $^{\circ}$ C 变性 30 s，62 $^{\circ}$ C 退火 30 s，72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s，40 个循环。72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min，4 $^{\circ}$ C 保存反应产物。

检测过程分别设阳性对照、阴性对照和空白对照。用已知米粉样品作阳性对照，用已知不含大米源性成分的样品作阴性对照，用等体积的超纯水代替模板 DNA 作空白对照。

8.4 PCR 扩增产物电泳检测

取 2 g 琼脂糖（5.1.4），于 100 ml 电泳缓冲液（5.2.10）中加热，充分熔化，加入溴化乙锭贮存液（5.2.9）至终浓度为 0.5 $\mu\text{g/ml}$ ，制胶。在电泳槽中加入电泳缓冲液（5.2.10），使液面刚刚没过凝胶。将 5 μl -8 μl PCR 扩增产物分别和适量加样缓冲液混合，点样。9 V/cm 恒压电泳，直至溴酚蓝指示剂（5.2.13）迁移至凝胶中部。紫外检测仪下观察电泳结果并记录。

8.5 基因克隆与测序

如果 PCR 扩增产物电泳检测结果阳性，采用 DNA 测序仪进行克隆测序确证。

使用商业化 PCR 产物克隆试剂盒，将 PCR 特征条带克隆到 T 载体上，用 Sanger 法进行序列测定，与大米参考序列进行比对分析。

9 结果判断与表述

9.1 PCR 扩增产物电泳检测结果

阳性样品的 PCR 扩增产物大小为 100 bp 左右。

9.2 克隆测序结果

阳性样品克隆测序结果与给定大米参考序列一致。若出现个别碱基差异，将克隆测序结果与 NCBI 数据库中其他大米序列进行比对，应 100%匹配。

9.3 结果表述

PCR 产物电泳检测结果及克隆测序确证都为阳性者判为含有大米源性成分，表述为检出大米源性成分；

PCR 产物为阴性者判为不含有大米源性成分，表述为未检出大米源性成分。

10 检测过程中防止交叉污染的措施

按照 GB / T 27403—2008 中附录 D 的规定执行。

11 废弃物处理

检测过程中的废弃物，收集后在焚烧炉中焚烧处理。

附录 A

(资料性附录)

PCR 产物测序结果

AGAGTCCACAAGTGCTCCCGCGCGTCCGAAGAAACCAACCACACTGCCGCTCTGCAGCGGGA
GGCTAA。
