

团 体 标 准

T/SZTCM XXX—XXXX

鸡内金中家鸡源性成分检测快速 PCR 法

Rapid PCR method for detecting Gallus gallus domesticus-derived
components in Galli Gigerii Endothelium Corneum

XXXX—XX—XX 发布

XXXX—XX—XX 实施

深圳市中药协会 发 布

目 次

前言 错误！未定义书签。

1 范围 错误！未定义书签。

2 规范性引用文件 错误！未定义书签。

3 术语和定义 错误！未定义书签。

4 原理 2

5 试剂和溶液配制 2

6 仪器和设备 2

7 检验步骤 3

8 结果判定 4

9 质量控制 4

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。

本文件由深圳市药品检验研究院提出。

本文件由深圳市中药协会归口。

本文件起草单位：深圳市药品检验研究院、中国中医科学院中药研究所、广州中医药大学、华润三九医药股份有限公司、深圳市中药协会、深圳市和顺本草药业有限公司、广州至信药业股份有限公司、九信中药集团有限公司、深圳市华辉药业有限公司。

本文件主要起草人：

鸡内金中家鸡源性成分检测 快速 PCR 法

1 范围

本文件规定了鸡内金中家鸡源性成分的快速 PCR 检测方法。
本文件适用于家鸡源性成分的鉴定。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是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

《中华人民共和国药典》（2025年版一部和四部）

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

鸡内金 Galli Gigerii Endothelium Corneum

雉科动物家鸡 *Gallus gallus domesticus* Brisson 的干燥沙囊内壁。

3.2

碱裂解法 alkaline lysis method

一种应用最为广泛的制备DNA的方法，利用DNA分子在不同pH环境下的复性差异完成分离。

3.3

聚合酶链式反应（PCR） polymerase chain reaction

一种用于扩增特定DNA片段的分子生物学技术，即DNA片段的特异性体外扩增过程，其特异性依赖于与目的DNA片段两端互补的寡核苷酸引物。

3.4

琼脂糖凝胶电泳 agarose gel electrophoresis

一种以琼脂糖为支持介质，用于分离大分子核酸的电泳技术，具有分子筛效应和电荷效应，通过凝胶孔径差异实现DNA片段分离。

3.5

核酸荧光染料 nucleic acid fluorescent dye

一种对双链 DNA (dsDNA) 具有高度选择性结合并发光的生物试剂，可用于dsDNA的荧光检测和定量。

3.6

阳性对照 positive control

使用对照样品代替检验样品同法DNA提取、靶核酸扩增和产物检测过程，用于证明鉴定过程可获得目标核酸片段的操作。

3.7

阴性对照 negative control

使用常见伪品药材代替检验样品同法DNA提取、靶核酸扩增和产物检测过程，用于确认检测系统能够满足鸡内金鉴别的操作。

3.8

空白对照 blank control

以水代替检验样品同法DNA提取、靶核酸扩增和产物检测过程，用以证明提取过程中没有核酸污染的操作。

4 原理

鸡内金中家鸡源性成分快速PCR鉴定应采用抽取有代表性的供试品与对照样品比较的验证方式，即依据家鸡DNA位点差异，使用SNP（单核苷酸多态性）标记法进行鉴定。利用碱裂解法提取鸡内金DNA，以鸡内金DNA为模板进行PCR扩增，采用荧光检测或琼脂糖凝胶电泳检测PCR扩增产物。

5 试剂和溶液配制

实验用水应符合GB/T 6682无菌超纯水的要求。

5.1 碱裂解缓冲液

含有 $0.5\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠 (NaOH)、1%聚乙烯吡咯烷酮 40 (PVP40)、1%聚乙二醇辛基苯基醚 (Triton X-100) 溶液：在 800mL 超纯水中溶解 20.0g NaOH，冷却至室温后加入 10.0g PVP40 和 10mL Triton X-100，溶解后加超纯水定容至 1000mL，过滤除菌分装使用。

5.2 中和缓冲液

含有 $0.1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三羟甲基氨基甲烷盐酸 (Tris-HCl) (pH 8.0) 溶液：本方法采用的 $0.1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH 8.0) 溶液为商品化的 $0.1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH 8.0) 溶液。

5.3 DNA聚合酶预混液

检测用 Taq 酶应无 3' → 5' 核酸外切酶活性。本方法采用的 DNA 聚合酶预混液为商品化的高保真 DNA 聚合酶预混液，于 -20℃ 下保存，使用时置于冰上操作。

5.4 检测用引物对序列

J2F: 5' -CCCTCCTTCCTTCTCCTACTAGCCTCATCT-3'。

J2R: 5' -TAATGAAAAGATGGCTAGGTCTACTGATGC-3'。

按照引物说明书，用无菌超纯水将上述引物溶解至 $10\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ，置 4℃ 保存。

5.5 1×TAE（三羟甲基氨基甲烷-冰醋酸-乙二胺四乙酸二钠）电泳缓冲液

取 20mL 50×TAE 电泳缓冲液，加无菌超纯水定容至 1000mL。

6 仪器和设备

6.1 研磨设备

至少能匀浆 20mL 的匀浆机，或至少能研磨 20mg 的研磨设备。

6.2 电子天平

最大称量值至少应为 1g，可读性精度至少应为 1mg。

6.3 连续可调微量移液枪

应包括 0.1 μ L~2.5 μ L、0.5 μ L~10.0 μ L、10 μ L~100 μ L、100 μ L~1000 μ L 规格，并包括配套的一次性吸头。

6.4 涡旋设备

能涡旋 1.5mL 和 2mL 离心管。

6.5 恒温加热设备

温度范围应包含室温至 100℃。

6.6 离心设备

能离心 200 μ L PCR 管、1.5mL 和 2mL 离心管。

6.7 核酸检测仪

波长范围应包含 200nm~400nm，检测样品量至少应为 0.1 μ L，检测精度应不低于 2ng $\cdot\mu$ L⁻¹。

6.8 保温设备

应包含 4℃与-20℃温区。

6.9 PCR仪

使用前应进行温度校准。

6.10 手持式紫外灯

能发出波长为 365nm 的紫外光。

6.11 电泳仪

电源应为具有稳压器的直流电源，电压 100V~500V。

6.12 凝胶成像系统

系统应包含密封暗箱、摄像头、白光和紫外光（UV）254nm、302nm、365nm 光源，UV 保护挡板。

7 检验步骤

7.1 取样

按照《中华人民共和国药典》（2025 年版四部）药材和饮片取样法（通则 0211）进行取样。去除药材和饮片表面附着物，依次使用 75%乙醇和无菌超纯水擦拭表面后晾干。

7.2 粉碎

将供试品置于乳钵、匀浆机或球磨粉碎仪中充分研磨粉碎，必要时加适量液氮研磨。

7.3 DNA提取

称取经预处理的检验样品 20mg 置于 2.0mL 离心管中；加入 200 μ L 碱裂解缓冲液，充分混匀，煮沸 10~15s，取出；加入 800 μ L 中和缓冲液，充分混匀；12000r $\cdot$ min⁻¹ 离心 1min；转移 50 μ L 上清液至一新的 1.5mL 离心管，加入 450 μ L 中和缓冲液，充分混匀作为 DNA 模板待测或-20℃保存备用。每个供试品应设置两份平行样。

注：使用碱裂解法提取的鸡内金 DNA 可在 4℃下保存 3 天或-20℃下保存 7 天，不宜长期保存，不宜使用琼脂糖凝胶电泳法检测 DNA 质量。

7.4 PCR扩增

7.4.1 PCR反应体系

在 200 μ L 的 PCR 管中进行，反应总体积为 25 μ L，包括高保真 DNA 聚合酶预混液 12.5 μ L，鉴别引物各 0.5 μ L (10 μ mol $\cdot$ L⁻¹)，DNA 模板 1 μ L (60ng $\cdot$ μ L⁻¹)，无菌超纯水补足。将反应液充分混匀，瞬时离心。分别另取对照药材和无菌超纯水，同法上述模板 DNA 检查 PCR 反应操作，作为阳性对照和空白对照。

7.4.2 PCR反应参数

PCR 反应参数为：98℃变性 10s，68℃退火延伸 20s，25 次循环。

7.5 扩增产物检测

7.5.1 荧光染料显色检测

PCR 反应结束后，在 PCR 扩增产物内加入 2 μ L 100 $\times$ SYBR Green I 染料，混匀后于 365nm 紫外波长下检测荧光。

7.5.2 琼脂糖凝胶电泳检测

称取琼脂糖约 0.42g，加入 1 $\times$ TAE 电泳缓冲液 35mL，加热至完全溶解，冷却至 65℃左右加入核酸凝胶染色剂 (SYBR Green) 1.5 μ L，充分混匀，小心地倒入内槽板上，使胶液缓慢展开，直到整个玻璃板表面形成无泡均匀胶层，插入梳子，室温下静置直至凝胶完全凝固。垂直拔出梳子，将凝胶及内槽放入电泳槽中，添加 1 $\times$ TAE 电泳缓冲液至没过胶面约 3mm 处。在 Parafilm 上将扩增产物 5 μ L 与 Loading buffer 混合后加入点样孔中。调节电压至 120V，电泳约 20min。将凝胶转移至紫外凝胶成像系统中观察。

8 结果判定

荧光染料显色检测结果判定：若 PCR 产物出现与阳性对照相同的荧光即为阳性结果，否则为阴性。若荧光染料法显色为阴性结果，还应通过琼脂糖凝胶电泳检测方法进行确证。

琼脂糖凝胶电泳检测结果判定：在阴性对照、阳性对照和空白对照结果符合规定的情况下，若供试品凝胶电泳图谱中，在 100~200bp 之间出现与鸡内金对照药材相同的单一 DNA 条带则判定结果为阳性，否则为阴性。

9 质量控制

检测结果应来自同一实验室供试品的两份平行样。当一份供试品的结果为阳性，另一份为阴性时，应重新测试。可以适当调整核酸扩增反应体系中各成分的用量，使两份样品得到相同结果。每个供试品应至少检测 2 份平行样，核酸定量检测仪检测模板 DNA 的纯度和浓度，DNA 浓度应高于 10ng $\cdot$ μ L⁻¹。也可采用常规的血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒对比提取供试品 DNA 的质量，保证 DNA 的提取效率，

避免出现假阴性结果。如果经过两次以上从核酸提取开始的重复检测，检测结果不一致，可在检测报告中注明检测低限，检测低限应符合最低含量水平。