

团 体 标 准

T/SZTCM XXX—XXXX

哈蟆油中东北林蛙源性成分检测 快速 PCR 法

Rapid PCR method for detecting *Rana chensinensis* derived components in
Ranae oviductus

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 试剂和耗材制备 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（深圳市医疗器械检测中心）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、广州中医药大学、中国中医科学院中药研究所、长春中医药大学、华润三九医药股份有限公司、深圳市中药协会

本文件主要起草人：

哈蟆油中东北林蛙源性成分检测 快速 PCR 法

1 范围

本文件规定了哈蟆油中东北林蛙源性成分的快速 PCR 检测方法。
本文件适用于东北林蛙源性成分的鉴定。

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

哈蟆油 *Ranae Oviductus*

蛙科动物东北林蛙 *Rana dybowskii* Günther 雌蛙的干燥输卵管。

3.2

滤纸纯化法 *filter paper purification method*

一种利用滤纸作为过滤介质，通过物理阻隔实现物质分离的方法，可用于快速提取中药材DNA。

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哈蟆油鉴别的操作。

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

哈蟆油中东北林蛙源性成分快速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，即依据东北林蛙特异性DNA位点差异，使用SNP（单核苷酸多态性）标记法进行鉴定。利用滤纸纯化法提取哈蟆油DNA，以哈蟆油DNA为模板进行PCR扩增，采用琼脂糖凝胶电泳检测PCR扩增产物。

5 试剂和耗材制备

实验用水应符合GB/T 6682无菌超纯水的要求。

5.1 动物裂解缓冲液

含有 $1.5\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸胍（GuHCl）、 $100\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠（NaCl）、1%聚山梨酯-20（Tween-20）、 $50\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐（Tris-HCl）（pH 8.0）、 $5\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙二胺四乙酸（EDTA）：在300mL 50℃左右超纯水中溶解 71.65g GuHCl，冷却至室温后依次加入 25mL $1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl（pH 8.0）、0.73g EDTA，搅拌溶解后加超纯水定容至 500mL，过滤除菌分装使用。

5.2 清洗缓冲液

含有 $10\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三羟甲基氨基甲烷（Tris）（pH 8.0）、0.1%聚山梨酯-20（Tween-20）：在 800mL 超纯水中依次加入 10mL $1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris（pH 8.0）、1mL Tween-20，搅拌溶解后加超纯水定容至 1000mL，过滤除菌分装使用。

5.3 DNA聚合酶预混液

检测用 DNA 聚合酶应无 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 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

RDF: 5' -GGACGACCAGATCTACAATGTTATCGTCACT-3'。

RDR: 5' -ACCTGCTCCAGCTTCAACTGTAGAGGAGGCT-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。

5.6 滤纸条

用剪刀将滤纸裁剪成44mm×2mm的长方形滤纸条，将其一端浸入加热融化的石蜡中，使其晾干后形成40mm×2mm的疏水区，放入密封袋中干燥保存。

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 电泳仪

电源应为具有稳压器的直流电源，电压 100V~500V。

6.11 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 检测步骤

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

称取经预处理的供试品 25mg 置于 2.0mL 离心管中；加入 500 μ L 裂解缓冲液裂解样品 7s，将滤纸条核酸结合区浸入裂解液中 3s 以吸附核酸，再将滤纸条转移至 1750 μ L 清洗缓冲液中 3s 以清洗表面杂质，最后将滤纸条转移至配制好的 PCR 扩增体系中 3s，以洗脱核酸。每个供试品应设置两份平行样。

注：使用滤纸纯化法提取的哈蟆油 DNA 应随提随用，且无法调整和检测 DNA 浓度。

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 50 μ L，包括 DNA 聚合酶预混液 25 μ L，鉴别引物各 1 μ L ($10\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)，无菌超纯水补足。在体系中洗脱核酸后，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 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10s，68 $^{\circ}\text{C}$ 退火延伸 20s，30 次循环。

7.5 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 $^{\circ}\text{C}$ 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

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 100～250bp 之间出现与哈蟆油对照药材相同的单一 DNA 条带则判定测试结果为阳性，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。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。