

团 体 标 准

T/SZTCM XXX—20XX

鹿茸中驯鹿源性成分检测 qPCR 法

qPCR method for detecting *Rangifer tarandus*-derived components in Cervi Cornu
Pantotrichum

2025 – XX – XX 发布

2025 – XX – XX 实施

深圳市中药协会 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、缩略语 1

4 原理 1

5 试剂与溶液配制 1

6 仪器和设备 2

7 检验程序 2

8 系统适用性 3

9 结果判定 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、长春中医药大学、华润三九医药股份有限公司、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：

鹿茸中驯鹿源性成分检测 qPCR 法

1 范围

本文件规定了鹿茸中驯鹿源性成分的实时荧光定性PCR检测方法。
本文件适用于驯鹿源性DNA成分的定性检测。

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

T/CACM 1027.2-2016 中药分子鉴定通则 第2部分：中药提取与中成药

《中华人民共和国药典》（2025年四部）

3 术语和定义

3.1

实时荧光定性聚合酶链式反应 Qualitative real-time polymerase chain reaction: qPCR

在聚合酶链式反应体系中加入荧光基团，利用荧光信号的积累，实时监控整个PCR进程，并通过扩增曲线对未知模板进行定性分析的方法。

注：改写GB/T 19495.4-2018，定义3.1.5

3.2

Ct 值 cycle threshold

每个反应管内的荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数。

[GB/T 19495.5-2018, 3.1.3]

3.3

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。

4 原理

提取测试样品中的DNA，针对驯鹿物种特异性序列设计引物，通过特异性引物和标记荧光物质探针，对驯鹿源性的DNA进行实时荧光PCR扩增，根据PCR扩增反应中每一个循环产物荧光信号的强弱判定，实现对鹿茸中驯鹿源性成分的定性分析。

5 试剂和溶液配制

除非另有说明，所有试剂均为分析纯，试验用水应符合GB/T 6682中一级水的规定。

5.1 组织或血液基因组 DNA 提取试剂盒（离心柱法）或动物成分相关 DNA 提取试剂盒

采用组织或血液基因组DNA提取试剂盒（离心柱法）或动物成分DNA提取试剂盒。

5.2 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。

5.3 实时荧光PCR试剂盒，包括Taq酶、dNTPs、PCR体系缓冲液等，按试剂盒要求保存。

5.4 引物和探针

驯鹿引物探针

正向：TGCCCTAAGCTTACTAATCCGTGCT

反向：AGAAAAGAGGGAGGGAGAAGTCAG

探针：FAM-ATTGTAACCGCACATGCATTCGTAAT-MGB

内参引物探针

正向：GACCGTGCAAAGGTAGCATAA

反向：GTAAAGCTCCATAGGGTCTTCTC

探针：FAM-CTGTCTCTTACTTCCAAT-MGB

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。

6 仪器和设备

6.1 实时荧光PCR仪

激发/检测波长范围 350 nm-750 nm，可用 SYBR Green I 染料和 Taq Man 探针。

6.2 高速台式离心机

离心力 12000g 以上。

6.3 生物安全柜或超净工作台

6.4 电子天平

感量 0.01 g。

6.5 核酸检测仪

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

6.6 涡旋设备

能涡旋 1.5mL 和 2mL 离心管。

6.7 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。

7 检测步骤

7.1 粉碎

取测试样品适量，置球磨粉碎仪中充分研磨粉碎。必要时取带有外皮及皮茸部分的鹿茸片。

7.2 DNA 提取

取测试样品粉末适量置离心管中，用组织或血液基因组DNA提取试剂盒（离心柱型）提取DNA [加入缓冲液GA 200 μ L，振荡至彻底混匀；加入Proteinase K溶液20 μ L，混匀，在56 $^{\circ}$ C放置2小时，每小时颠倒混合样品数次；加入缓冲液GB 200 μ L，充分混匀，70 $^{\circ}$ C放置10分钟，溶液应变清亮，简短离心以去除管盖内壁水珠；加入200 μ L无水乙醇，充分振荡混匀15秒，此时可能会出现絮状沉淀，简短离心以去除管盖内壁水珠；将溶液和絮状沉淀加到CB3吸附柱上，将吸附柱放入收集管中，离心（转速为每分钟12000转）30秒，倒掉废液，将CB3吸附柱放回收集管中；加入已加入无水乙醇的缓冲液GD 500 μ L，离心（转速为每分钟12000转）30秒，倒掉废液，将CB3吸附柱放回收集管中；加入漂洗液PW 600 μ L，离心（转速为每分钟12000转）30秒，倒掉废液，将CB3吸附柱放回收集管中；再次加入漂洗液PW 600 μ L，离心（转速为每分钟12000转）30秒，倒掉废液，将CB3吸附柱放回收集管中；离心（转速为每分钟12000转）2分钟，倒掉废液。将CB3吸附柱置于室温放置数分钟，以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。取出吸附柱，放入新的1.5 mL离心管中；向吸附膜的中间部位悬空滴加100 μ L洗脱缓冲液TE，室温放置2~5 min 分钟，离心（转速为每分钟12000转）2分钟]，取洗脱液，作为供试品溶液，置-20 $^{\circ}$ C保存备用。分别另取鹿茸、驯鹿茸对照药材各约20mg，同法制成对照药材模板DNA溶液。

7.3 实时荧光 PCR 检测

7.3.1 内参基因检测

可先将试样DNA进行内参基因的实时荧光PCR检测，若检测结果为阳性，表明提取的试样DNA适宜进行PCR检测，可以进行动物内源基因的检测；若检测结果为阴性，表明提取的DNA不适宜进行PCR检测，应重新提取DNA。若重新检测结果仍为阴性，则本方法不适用于该试样检测。

7.3.2 实时荧光 PCR 反应

在200 μ L离心管中进行，反应总体积为20 μ L，反应体系包括2 $\times$ 荧光定量PCR酶混合液10 μ L，引物（10 μ mol/L）各0.2 μ L，模板1.0 μ L，无菌超纯水8.52 μ L。将离心管置于实时荧光PCR仪，反应参数为：50 $^{\circ}$ C 2min，95 $^{\circ}$ C 2min，后进行40个循环95 $^{\circ}$ C 10s，59 $^{\circ}$ C 1min。另取无菌超纯水，同法上述模板DNA检查PCR反应操作，作为空白对照。

7.4 平行试验

每种样品设置 3个样品孔进行重复，取三个孔的 Ct平均值作为结果。

8 结果判定

T/XXXX XXX—20XX

测试样品无荧光对数增长，或测试样品与驯鹿阳性对照和内参的 CT 值之差 >4.0 ，为未检出驯鹿源性成分；

测试样品有荧光对数增长，且测试样品与驯鹿阳性对照和内参的 CT 值之差 ≤ 4.0 ，为检出驯鹿源性成分。