

团体标准

T/SZTCM XXX—20XX

鹿茸片中驯鹿源性成分检测 PCR 法

PCR 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 1

4 原理 1

5 试剂与溶液配制 1

6 仪器和设备 2

7 检验步骤 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：

鹿茸片中驯鹿源性成分检测 PCR 法

1 范围

本文件规定了鹿茸中驯鹿源性成分的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年版四部）

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

聚合酶链式反应 polymerase chain reaction: PCR

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片段两段互补的寡核苷酸引物。

4 原理

本文件针对驯鹿种属特异序列设计特异性引物进行PCR扩增，根据凝胶电泳后条带有无判断每个反应体系的扩增结果，进而对驯鹿源性成分进行定性判定。

5 试剂与溶液配制

除非另有说明，所有试验仅使用分析纯及以上试剂和无DNase/RNase的重蒸馏水或符合GB/T 6682 二级水以上标准的水。

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 驯鹿源性成分检测用引物对序列

质控引物：

XLZKF: 5' - TGGTGCTGAGCAGGCATAGTAGG - 3'

T/XXXX XXX—20XX

XLZKR: 5' - TGTRATTCCGGCTGCTAGTACAGG-3'

检查引物:

XLJCF: 5' - TGCCCTAAGCTTACTAATCCGTGCT - 3'

XLJCR: 5' - AGAAAAGAGGGAGGGAGAAGTCAG - 3'

5.3 引物溶液

用无菌双蒸水将上述引物溶解至10 μ mol/L。

5.4 琼脂糖（电泳纯）

5.5 DNA 分子量标准

选择可用于200~300bp、500~700bp目标片段定性参照的DNA分子量标准，如DL100 DNA分子量标准经琼脂糖凝胶电泳后出现100bp、200bp、300bp、400bp、500bp、700bp、1000bp大小的指示条带。

6 仪器和设备

6.1 离心机

离心机最高速度应 $\geq$ 12000 r/min

6.2 金属浴

金属浴可放置2.0 mL离心管，也可使用水浴锅替代。

6.3 制冰机

6.4 涡旋振荡器

6.5 超纯水发生器（分子生物学级别）

6.6 高压灭菌锅

6.7 PCR 仪

PCR仪使用前应进行温度校准。

6.8 电泳仪及其附件

附件应包括水平电泳槽、制胶器、鲨鱼齿梳等。

6.9 凝胶成像仪

6.10 核酸蛋白仪

6.11 电子天平（感量 0.01g）

6.12 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。

6.13 低温冰箱

温度可维持在4℃及-20℃。

7 检验步骤

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 200μL，振荡至彻底混匀；加入Proteinase K溶液20μL，混匀，在56℃放置2小时，每小时颠倒混合样品数次；加入缓冲液GB 200μL，充分混匀，70℃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200μL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 500μL，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 600μL，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 600μL，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 μL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℃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 PCR 扩增

7.3.1 模板 DNA 质控 PCR 反应

在200μL离心管中进行，反应总体积为25μL，反应体系包括2×PCR预混液（包含DNA聚合酶或DNA高保真酶、dNTPs、MgCl₂、反应缓冲液等）12.5μL，质控引物（10μmol/L）各0.25μL，模板2.0μL，无菌超纯水10μL。将离心管置于PCR仪，PCR反应参数为：94℃预变性5分钟，循环反应30次（94℃，30秒，58℃，30秒，72℃，45秒），72℃延伸5分钟。另取无菌超纯水，同法上述模板DNA质控PCR反应操作，作为空白对照。

7.3.2 模板 DNA 检查 PCR 反应

在200μL离心管中进行，反应总体积为25μL，反应体系包括2×PCR预混液（包含DNA聚合酶或DNA高保真酶、dNTPs、MgCl₂、反应缓冲液等）12.5μL，检查引物（10μmol/L）各0.25μL，模板2.0μL，无菌超纯水10μL。将离心管置于PCR仪，PCR反应参数为：94℃预变性5分钟，循环反应30次（94℃，30秒，63℃，45秒），72℃延伸5分钟。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 电泳检测

照琼脂糖凝胶电泳法（中国药典2025年版通则0541），胶浓度为2%，胶中加入核酸凝胶染色剂；供试品、对照药材、空白对照PCR反应溶液及DNA分子量标记物（0.5μg/μL）的上样量为5μL。电泳结束后，取凝胶片在凝胶成像仪上或紫外透射仪上检视。

8 系统适用性

供试品、鹿茸对照药材、驯鹿茸对照药材质控PCR产物在500~700bp间应有单一DNA条带；驯鹿茸对照药材检查PCR产物在200~300bp间应有单一DNA条带，鹿茸对照药材检查PCR产物无条带；空白对照无扩增条带。应同时满足以上三个条件，否则实验无效。

9 结果判定

供试品检查PCR产物凝胶电泳图谱中，在200~300bp间若出现与驯鹿茸对照药材相同的单一DNA条带，视为检出驯鹿源性成分；在200~300bp间若未出现与驯鹿茸对照药材相同的单一DNA条带，视为未检出驯鹿源性成分。