

团 体 标 准

T/SZTCM XXX—XXXX

梅花鹿源性成分检测 LAMP 法

LAMP method for detecting *Cervus nippon* Temminck derived components

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 1

5 试剂和溶液配制 1

6 仪器和设备 2

7 检测步骤 3

8 结果判定 3

9 质量控制 3

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：

梅花鹿源性成分检测 LAMP 法

1 范围

本文件规定了梅花鹿源性成分的 LAMP 检测方法。
本文件适用于梅花鹿鹿茸、鹿血等源性成分的检测。

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

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

环介导等温扩增 (LAMP) loop-mediated isothermal amplification

一种恒温核酸扩增技术，通过链置换型DNA聚合酶在恒温环境（60–65℃）下快速扩增靶基因序列。

3.2

Bst DNA 聚合酶 bacillus stearothermophilus DNA polymerase

一种具有强链置换能力，催化底物脱氧核糖核苷三磷酸（dNTP）分子聚合形成子代DNA的酶，可用于恒温扩增。

3.2

气溶胶 aerosols

悬浮于气体介质中的粒径一般为0.001μm~100μm的固态或液态微小粒子形成的相对稳定的分散体系。

4 原理

根据梅花鹿线粒体基因序列设计特异性内引物、外引物和环引物各一对，特异性识别靶序列上的6个区域，在链置换型Bst DNA聚合酶的作用下，基因模板、引物、链置换型DNA合成酶等在60℃~65℃进行恒温扩增，30min~90min左右即可实现 10^9 倍~ 10^{10} 倍的核酸扩增。在DNA合成时，从dNTP中析出的焦磷酸离子与反应溶液中的镁离子反应，产生大量焦磷酸镁沉淀，加入显色液，即可通过颜色变化观察判定结果。

显色液显色原理：特异性核酸扩增指示剂VDR是高灵敏的核酸扩增指示染料，在不发生扩增反应时，VDR在扩增体系中呈绿色，随着扩增的进行，温度升高至58℃~70℃，VDR降解为A基团和B基团，使扩增体系呈无色；当扩增体系中存在dsDNA时，A基团与dsDNA结合，呈蓝绿色。

5 试剂和溶液制备

实验用水应符合GB/T 6682无菌超纯水的要求。

5.1 DNA提取试剂

本方法所用 DNA 提取试剂为商品化的血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒。

5.2 LAMP扩增试剂

本方法所用 LAMP 扩增试剂为商品化的 LAMP 扩增试剂盒，包括 2×反应液、Bst 2.0 DNA 聚合酶、阳性对照、阴性对照。

5.3 梅花鹿源性成分LAMP检测用引物

梅花鹿源性成分 LAMP 引物包括外引物 F3/B3c，内引物 FIP/BIP，环引物 LF/LB。

外引物 F3: 5' -TCTATGTCCTACTAATTACAC-3' 。

外引物 B3c: 5' -GACTGATTGACTTAATGCAC-3' 。

内引物 FIP: 5' -TGTCTATACACCGATTATGTGCTGCAAAACACGTGATATAACCT-3' 。

内引物 BIP: 5' -TGCCCCATGCTTATAAGCATGTGTACGATGAACAACATCATG-3' 。

环引物 LF: 5' -ACACGTGTGTCTTAATGTAC-3' 。

环引物 LB: 5' -TCCTATCATTATAGTACATAGT-3' 。

按照引物说明书，用无菌超纯水将上述引物溶解至 $100\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ，置 4℃ 保存。

5.4 显色剂

本方法所用显色剂为商品化的特异性核酸扩增指示剂 VDR。

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 0.1μL~2.5μL、0.5μL~10.0μL、10μL~100μL、100μL~1000μL 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。

7 检测步骤

LAMP检测过程应符合GB 19489生物安全基本要求，避免气溶胶污染。

7.1 DNA提取

DNA 提取应在样本制备区内进行，称取 20~30mg 固体供试品或吸取 200 μ L 液体供试品至 1.5mL 离心管中，根据商品化血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取样品核酸，并于-20℃以下冷冻保存备用。每个供试品应设置两份平行样。

7.2 LAMP扩增

7.2.1 LAMP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2 $\times$ 反应液12.5 μ L，Bst DNA聚合酶（8U $\cdot\mu$ L⁻¹）1 μ L，内引物FIP、BIP（100 μ mol $\cdot$ L⁻¹）各0.4 μ L，外引物F3、B3c（100 μ mol $\cdot$ L⁻¹）各0.1 μ L，环引物LF、LB（100 μ mol $\cdot$ L⁻¹）各0.2 μ L，DNA模板2 μ L，显色剂1 μ L，用无菌超纯水补足。将反应液充分混匀，瞬时离心，并设置阳性对照、阴性对照和空白对照。

7.2.2 LAMP反应参数

LAMP反应参数为：61℃恒温扩增65min，80℃灭活5min。

7.3 可视化染料检测

反应结束后，上下颠倒轻轻混匀体系，在白色背景下立即进行颜色观察和记录。

8 结果判定

对照品在自然光下 LAMP 检测结果应符合以下情况，否则应重新检测：

阳性对照：反应管中液体显蓝绿色；

阴性对照：反应管中液体显无色；

空白对照：反应管中液体显无色。

在阳性对照、阴性对照和空白对照结果符合规定的情况下，供试品在自然光下，显蓝绿色，判定结果为阳性；显无色，判为阴性。

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 $10\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。也可采用其他常规的动物基因组 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。