



GCMTI RD-4:2020

政府中药检测中心方法



利用特异性聚合酶链式反应区分两种真品鹿茸的物种

利用特异性聚合酶链式反应区分两种真品鹿茸的物种

安全预防措施：本检测方法涉及危险物品，处理有关物品时，检测人员应采取适当的防护措施，戴上护眼及护手用具，并在需要在抽气柜或生物安全柜内进行检测工作。

1. 简介

特异性聚合酶链式反应(“特异性 PCR”)利用特异性引物来识别目标物种，无须像 DNA 测序法般(如 DNA 条形码)进行脱氧核糖核酸(DNA)测序，操作流程较为简单快捷，所以广泛应用在快速筛选病原体、环境中的微生物、食物及草药的物种来源。2015 年版《中国药典》采用特异性 PCR 方法鉴别动物类的中药材(CMM)物种，包括蕲蛇(*Deinagkistrodon acutus*)、乌梢蛇(*Zaocys dhumnades*)和金钱白花蛇(*Bungarus multicinctus*)。

本检测方法阐释一种利用特异性 PCR 作筛选鹿茸饮片正品品种梅花鹿(*Cervus nippon*)和马鹿(*Cervus elaphus*)的方法。这方法适用于单一鹿茸物种的完整或粉状样品。

《补充资料》载列有关标准规程，以供进行检测时参考。

本检测方法的分析过程分为以下步骤：1. DNA 提取；2. 特异性 PCR 扩增目标特征 DNA 区域区分物种；3. 电泳；4. 结果分析。

2. 试剂及材料

所有使用的化学品或试剂须为分子生物或 PCR 等级，并适用于 DNA 分析。所用的水应经过双重蒸馏或为 PCR 等级，并且不含核酸酶及核酸。在可行的情况下，有关化学品、试剂及水在使用前均应先进行高压灭菌。操作人员进行任何程序时均须戴上无粉手套，并建议使用含滤芯的移液管吸嘴，避免交叉污染。

3. 设备

《补充资料》列出本检测方法所使用的实验室设备及仪器，整个分析过程中的主要设备列如下：

3.1 层流柜：在工作区提供经高效能空气微粒子(HEPA)过滤的单向空气，以防样品受污染。

3.2 温控培养箱：为提取核酸提供实验条件。

3.3 分光光度计：用以评估双链 DNA 的纯度及产量。

3.4 PCR 热循环仪：用于 PCR 中扩增 DNA。

3.5 电泳系统：检查扩增的 PCR 产物。

4. 一般程序

为了确保测试结果准确有效，对照应按第 5 段所述与样品同步进行检测，以检查试剂或样品有否受到污染。

《补充资料》所述的规程、试剂、材料和仪器仅供参考；如对规程作出任何修改，包括但不限于使用其他试剂组合或更改程序，检测人员应加以充分验证，并有责任评估有关修改是否适用于测试项目。

4.1 样品制备

负责制备样品(如粒度减少、均质化和取样)的操作人员应具有良好的实验室操作水平，能防止实验室内出现交叉污染，以免检测结果无效。

4.2 DNA 提取

4.2.1 DNA 检测方法的先决条件是取得可扩增的 DNA，提取 DNA 的过程基本上可使用商业 DNA 分离试剂盒进行。试剂盒的质量由制造商控制及保证，DNA 提取过程的质量更为容易控制，亦可节省排解问题的时间。

4.2.2 应根据药材的化学或细胞成分，选择合适的 DNA 提取试剂盒或规程。为取得足够的 DNA 提取物进行后续的 PCR 扩增程序，在情况适用下，应除去药材中下列成分：

4.2.2.1 核糖核酸及 / 或蛋白质，可分别使用核糖核酸酶及蛋白酶进行酶解反应后去除。

4.2.2.2 含丰富角蛋白的组织部位，如鹿角、毛发、鳞片等。这些部位可使用二硫代苏糖醇来增加 DNA 提取效率。

4.2.3 DNA 提取物的质量可通过以下方法评估：

4.2.3.1 分光光度分析；以及

4.2.3.2 扩增动物类群的内源基因。

4.3 特异性 PCR 扩增目标特征的 DNA 区域

4.3.1 本检测方法提供三组引物对：

4.3.1.1 本检测方法使用 CNIP-f/CNIP-r 作为检测梅花鹿的特异性引物对，以扩增梅花鹿线粒体部分 DNA 区域，从而产生一条长度为 223 个碱基对的 DNA 条带；但此引物对对马鹿无效，不会产生一条长度为 223 个碱基对的 DNA 条带。

4.3.1.2 本检测方法使用 CELA-f/CELA-r 作为检测马鹿的特异

性引物对，以扩增马鹿线粒体部分 DNA 区域，从而产生一条长度为 248 个碱基对的 DNA 条带；但此引物对对梅花鹿无效，不会产生一条长度为 248 个碱基对的 DNA 条带。

4.3.1.3 UnivP/UnivQ 为内对照引物对(ICPP)，能与动物线粒体基因组结合。这引物对用以确保样品的 DNA 提取物可被扩增。在进行特异性 PCR 分析前，DNA 提取物应先以此引物对进行测试，而所有样品也应以此引物对进行测试。

4.3.1.4 本检测方法使用的所有引物对数据均载于附录 A。

4.3.2 配制 PCR 预混液，并按照附录 A 进行 PCR。

4.4 电泳

4.4.1 PCR 产物可藉手动琼脂糖凝胶电泳系统或自动电泳系统解析。

4.4.2 摄取 DNA 条带的影像，并参考 DNA 分子量标记来评估 DNA 条带的长度。

4.5 结果分析

4.5.1 根据电泳图中目标 DNA 条带存在与否(第 4.3.1 段)区分梅花鹿和马鹿。

5. 质量控制参数

检测人员应检查每次分析结果是否符合质量控制的接受准则，判断分析结果可否接受，以及是否符合分析方法的目的是。检测人员应按操作人员进行 DNA 分析的合理处理能力，决定每批样品的数量，以符合质量控制计划的要求。

5.1 使用系统对照

本方法的系统对照表列如下，箭号(↓)表示有关分析步骤所应进行的对照。

分析步骤	提取空白对照 ¹	提取阳性对照 ²	样品重复对照 ³	PCR 阴性对照 ⁴
DNA 提取	↓	↓	↓	
利用 PCR 扩增 DNA 目标特征区域	↓	↓	↓	↓
电泳	↓	↓	↓	↓

1. 提取空白对照是 DNA 提取过程的阴性对照，当中不加入样品。此对照的试管应时

刻放在该批次的最后位置，而且须进行平行双样分析。

2. 提取阳性对照是 DNA 提取过程的阳性对照，可检查提取过程所用试剂及其间操作过程的欠妥之处。对照品为已知分类鉴定的参考材料，或是经过公认的博物馆、国家主管部门、大学或研究机构等鉴别或核证其分类地位的生物。这个对照须进行平行双样分析。
3. 在整个分析过程中，样品须进行平行双样分析，以确定检测方法所得结果一致。
4. PCR 阴性对照为 PCR 过程的一种阴性对照，可检查过程所用试剂或其间操作过程的欠妥之处，并证明所用的 PCR 试剂并无受到核酸污染。这个对照须进行平行双样分析。

5.2 所须达到的参数要求

5.2.1 系统对照藉电泳评估，并须符合下列参数要求：

	参数	可接受标准
A	提取空白对照	没有出现目标 DNA 条带
B	提取阳性对照	在内对照引物对中出现目标 DNA 条带 在特异性引物对中出现对应物种的目标 DNA 条带
C	样品重复对照	重复样品的结果一致
D	PCR 阴性对照	没有出现目标 DNA 条带

6. 参考资料

国家药典委员会：《中华人民共和国药典》2015 年版，北京：中国医药科技出版社。

附录 A

(规范标准)

检测方法的引物对及 PCR 条件

寡核苷酸引物资料详见下表。引物可从专门合成寡核苷酸的供应商订购，标准规格的脱盐纯化引物，已可用于特异性 PCR 分析。

A1. 引物资料

引物名称	引物方向	寡核苷酸 DNA 序列(5'-3')	扩增子长度(碱基对)	目标位置
UnivP	正向	GGTTTACGACCTCGATGTTG	~104	动物线粒体 DNA
UnivQ	反向	CGGGTCTGAACTCAGATCAC		
CNIP-f	正向	CTTACACATGCAAGCATCCA	223	位于梅花鹿线粒体基因组(NCBI 登记号 DQ985076.1)第 110 至 332 个碱基对
CNIP-r	反向	TTAATCGTATGACCGCGGC		
CELA-f	正向	GCAAGCATCCGCACYCCG	248	位于马鹿线粒体基因组(NCBI 登记号 KT290948.1)第 119 至 366 个碱基对
CELA-r	反向	AACACACTTTACGCCGTRKGC		

A2. 扩增目标特征 DNA 区域的 PCR 条件

试剂	UnivP/UnivQ	CNIP-f/CNIP-r	CELA-f/CELA-r
模板 DNA	~20 奈克	~ 10 奈克	~10 奈克
10X PCR 缓冲液*	1 X	1 X	1 X
氯化镁	2.0 毫摩尔每升	1.2 毫摩尔每升	1.2 毫摩尔每升
脱氧核糖核苷三磷酸 (dNTP)	0.2 毫摩尔每升 @dNTP	0.2 毫摩尔每升 @dNTP	0.2 毫摩尔每升 @dNTP
正向引物	0.4 微摩尔每升	0.2 微摩尔每升	0.2 微摩尔每升
反向引物	0.4 微摩尔每升	0.2 微摩尔每升	0.2 微摩尔每升
DNA 聚合酶	0.25 微升	0.2 微升	0.2 微升
无核酸酶水	加至最终体积为 25 微升	加至最终体积为 25 微升	加至最终体积为 25 微升

*10X PCR 缓冲液不含镁离子

A3. 用于扩增目标特征 DNA 区域的 PCR 循环条件**A. 动物类质量控制引物对 UnivP/UnivQ**

温度	时间	循环次数
95°C	5 分钟	1
94°C 55°C 72°C	30 秒 30 秒 1 分钟	30
72°C	7 分钟	1
4°C	∞	--

B. 梅花鹿特异性 PCR 引物对 CNIP-f/CNIP-r

温度	时间	循环次数
94°C	2 分钟	1
94°C 63°C 72°C	30 秒 30 秒 30 秒	30
72°C	5 分钟	1
4°C	∞	--

C. 马鹿特异性 PCR 引物对 CELA-f/CELA-r

温度	时间	循环次数
94°C	2 分钟	1
94°C 63°C 72°C	30 秒 30 秒 30 秒	30
72°C	5 分钟	1
4°C	∞	--