

ICS ****.*
C**



团体标准

T/CACM ****—20**

法半夏配方颗粒 PCR 鉴别

PCR identification of Fabanxia Peifangkeli
(文件类型：公示稿)

(完成时间：2020 年 11 月)

20**-**-**发布

20**-**-**实施

中华中医药学会发布

目 次

前 言.....	错误!未定义书签。
目 录.....	错误!未定义书签。
1. 范围.....	1
2. 规范性引用文件.....	1
3. 术语和定义.....	1
4. 仪器设备.....	1
5. 试剂.....	1
6. 鉴别引物序列.....	1
7. 检验程序.....	2
8. 结果判定.....	4
9. 结果报告.....	4
10. 质量保证.....	4
11. 废弃物处理.....	4
附录 A.....	5
附录 B.....	6
参考文献.....	9

前 言

本标准按照GB/T1.1—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。

本标准由中国中医科学院中药资源中心提出。

本标准由中华中医药学会归口。

本标准起草单位：中国中医科学院中药资源中心、华润三九医药股份有限公司、安徽省食品药品检验研究院、浙江省中医院、成都中医药大学附属医院、安徽华润金蟾药业股份有限公司、华润三九（雅安）药业有限公司

本标准主要起草人：袁媛、张辉、蒋超、张亚中、蒲婧哲、胡冲、郑敏霞、郑琰、高波、吴建国

法半夏配方颗粒PCR鉴别

1. 范围

本标准规定了使用PCR鉴别法半夏配方颗粒的通用方法和要求。

本标准适用于法半夏配方颗粒的鉴别。

2. 规范性引用文件

下列文件对本标准的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅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）适用本标准。

《中华人民共和国药典》

GB/T 6682 《分析实验室用水规格和试验方法》

GB/T 27403 《实验室质量控制规范食品分子生物学检测》

T/CACM 010-2016 《中药分子鉴定通则》

3. 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

法半夏配方颗粒 *fabanxia peifangkeli*

为天南星科植物半夏 *Pinellia ternate* (Thunb) Breit. 的干燥块茎经炮制并按标准汤剂的主要质量指标加工制成的配方颗粒。

4. 仪器设备

应符合规范性附录 A 的要求。

5. 试剂

应符合规范性附录 A 的要求。

6. 鉴别引物序列

BX-123aF: 5'- CGGCGGAGGCACGCAAT -3'

BX-123R: 5'-AATTCACACCACGTATCGCATTT-3'。

7. 试剂

为防止交叉污染，收样、取样、粉碎、DNA提取、核酸扩增与产物检测应在不同操作间或同一操作间不同隔离区域进行，进入各区域应严格按照单一方向进行，即样品制备区→核酸制备区→扩增区→检测区。

7.1 取样

送检样品总量应不低于10 g，每批分为3等份，1/3供实验室分析用，另1/3供复核用，其余1/3留样保存。收样时应检查包装的完整性，并在样品袋上贴上标签，填写采集数据表。对商品包装和送样说明进行拍照记录，照片随样品一起备档。送检样品抽样方法参照《中华人民共和国药典》四部通则0211进行取样。

7.2 DNA 提取

送检样品 DNA 提取步骤如下：

- a) 取样品 1 g，粉碎成粉末。
- b) 取上述粉末 0.02 g，置 2mL 离心管中，加入细胞核裂解液 300 μ L、乙二胺四乙酸二钠溶液 50 μ L、蛋白酶 K 溶液 20 μ L、RNA 酶 A 5 μ L，充分涡旋震荡混匀 3 min，56℃下水浴 60 min。
- c) 离心（12000 $\times$ g）5 min 后，吸取上清液 250 μ L 至一新的 2 mL 离心管中，加入裂解缓冲液 250 μ L，混匀，转移至纯化柱，离心（12000 $\times$ g）5 min；弃去滤过液。
- d) 往纯化柱中加入洗脱液 700 μ L，离心（12000 $\times$ g）1 min。
- e) 重复步骤 d）2 次。
- f) 弃去滤过液，再离心（12000 $\times$ g）2 min，取出纯化柱，室温放置 2 min，晾干吸附材料中的剩余洗脱液。
- g) 将纯化柱换入一个新的 2 mL 离心管，向吸附膜的中央悬空滴加无菌双蒸水 100 μ L，静置 3 min，离心（12000 $\times$ g）2 min，取滤过液的上清液，作为供试品溶液，可置-20℃下保存备用。

除上述方法外，也可用等效的 DNA 提取方法提取试样 DNA。

7.3 PCR 扩增

首次使用本方法时，应校对 PCR 仪温控准确性，并使用阳性对照和阴性对照以核对使用的 Taq DNA 聚合酶或 PCR 预混液的适用性。

7.3.1 对照试验

送检样品应平行检测 2 次，并设置阳性对照（使用半夏对照药材，按 7.2 提取所得 DNA 作为 PCR 扩增的阳性对照）、阴性对照（可选择使用天南星对照药材，按 7.2 提取 DNA，所获的液体作为 PCR 扩增的阴性对照）和空白对照。

7.3.2 PCR 反应体系

在 200 μL 离心管中依次加入 $2\times$ M5 SuperFast Taq PCR Master Mix PCR 预混液 12.5 μL 、引物溶液（含正向和反向引物）各 0.4 μL 、模板 DNA（10 ng ~ 50 ng）3 μL ，用无菌双蒸水补足反应体积至 25 μL 。将反应液振荡混匀，瞬时离心。

7.3.3 PCR 反应参数

将离心管置于 PCR 仪中，PCR 反应参数为：95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min，循环反应 40 次（95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 62 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s），72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。PCR 反应结束后，取出 PCR 管，对反应产物进行检测或置 4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存。

7.4 扩增产物检测

配制 2% 琼脂糖凝胶，胶中加入适量核酸染料 GelRed。取送检样品、阳性对照、阴性对照及空白对照的 PCR 反应产物各 1 μL ，分别加入 $6\times$ 上样缓冲液各 5 μL ，混匀，分别上样于同一琼脂糖凝胶上，DL 1000 DNA 分子量标准溶液上样量为 2 μL （0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ）。按《中华人民共和国药典》四部通则 1001“琼脂糖凝胶电泳法（核酸检测用）”试验。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. 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，供试品凝胶电泳图谱中，在与对照药材凝胶电泳图谱相应的位置上，在100~200 bp有单一DNA条带者为阳性结果，反之为阴性结果。

9. 结果报告

9.1 一般要求

检测结果应表示为阳性或阴性，阳性和阴性分别用“+”和“-”符号表示。

9.2 检测报告

样品经检测后，实验室应根据实验的具体操作程序和结果做好详细的实验记录，出具检测报告。检测报告包含的基本内容应参照T/CACM 010-2016《中药分子鉴定通则》的要求。

10. 质量保证

两份平行样检测结果应一致。当一份送检样品的结果为阳性，另一份为阴性时，要重新测试。可以适当增加核酸扩增反应体系中DNA模板量，使两份试样得到同样的结果。平行样本检测结果不一致时应检测模板DNA的质量，确保提取的DNA片段大于扩增片段。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，可在测试报告中表述该实验室样品的测试结果为阴性，并注明定量检测和定性检测方法的检测低限。进行PCR反应前，应确认所使用的聚合酶符合本标准的要求。

11. 废弃物处理

检测过程中的废弃物处理应符合GB/T 27403《实验室质量控制规范食品分子生物学检测》的要求。

附录 A (规范性)

为执行本包括本标准，以下仪器、试剂必不可少：

A.1 仪器设备

离心机(离心机最高重力离心力应 $\geq 12000 \times g$)、金属浴(应可放置 2 mL 离心管，也可使用水浴锅替代)、制冰机、涡旋振荡器、高压灭菌锅、PCR 仪(使用前应进行温度校准、电泳仪及其附件(应包括水平电泳槽、制胶器、鲨鱼齿梳等)、凝胶成像仪(或紫外透射仪等凝胶观察设备)、核酸蛋白仪、电子天平(感量 0.01 g)、连续可调微量移液枪(至少应该包括 2.5 μ L、10 μ L、200 μ L、1000 μ L 等 4 种不同规格，并包括配套一次性吸头)、低温冰箱(温度可维持在 4 $^{\circ}$ C 及 -20 $^{\circ}$ C)

A.2 试剂与试药

除另有规定外，实验试剂为不含 DNA 和 DNase 的分析纯或生化试剂；实验用水符合 GB/T 6682 的要求；所配制的试剂均应灭菌后保存，并在容器上注明试剂名称、浓度、配制时间、保存条件、失效日期和配制者姓名；PCR 试剂应小量分装保存以减少污染；材料及试剂的保存都应有防污染措施。

主要试剂与试药包括：2 $\times$ M5 SuperFast Taq PCR Master Mix PCR 预混液、DNA 提取试剂盒(可采用商品化 DNA 提取试剂盒，包括细胞核裂解液、乙二胺四乙酸二钠溶液、裂解缓冲液、洗脱液、DNA 纯化柱等)、DNA 提取试剂盒(应在 -20 $^{\circ}$ C 下保存，使用时置冰上操作)、引物溶液(用无菌双蒸水将上述引物溶解至 10 μ mol/L)、DL 1000 DNA 分子量标准溶液(DL 1000 DNA 分子量标准溶液经凝胶电泳后应出现 100 bp、200 bp、300 bp、400 bp、500 bp 和 1000 bp 大小的指示条带)、50 $\times$ TAE 电泳缓冲液、6 $\times$ 上样缓冲液、半夏对照药材粉末、20 mg/mL 蛋白酶 K 溶液、10 mg/mL 核糖核酸酶 A(RNA 酶 A)溶液、核酸凝胶染色剂 GelRed (10 mg/mL 或 10000 $\times$)、2% 琼脂糖凝胶

50 $\times$ TAE 电泳缓冲液配制方法：在 800 mL 去离子水中溶解 242 g Tris，37.2 g 乙二胺四乙酸二钠($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)，加入 57.1 mL 的醋酸，充分混匀，加去离子水定容至 1L，室温保存，使用时用去离子水 50 倍稀释。或使用同等规格商业产品。

6 $\times$ 上样缓冲液配制方法：在 80 mL 去离子水中溶解溴酚蓝 0.25 g，二甲苯氰 FF 0.25 g，蔗糖 40 g，加水定容至 100 mL，分装。或使用同等规格商业产品。

2% 琼脂糖凝胶配制方法：参照《中华人民共和国药典》四部 1001 进行配制。取琼脂糖 2.0 g 适量，加入电泳缓冲液 100 mL，加热使溶胀完全，加入适量核酸染色剂，混匀，倒入插有鲨鱼齿梳的模具中，待凝胶结成无气泡的均匀薄层，即得。

A.3 适用范围

本标准仅用于法半夏配方颗粒与其常见混伪品的真伪鉴定。本标准不适用于正伪混合样品的鉴定。

附录 B (资料性)

法半夏配方颗粒 PCR 反应体系的建立

A.1 特异性引物设计

通过测序及从 GenBank 数据库查找正品半夏物种及半夏常见混伪品（半夏属 *Pinellia* Tenore、天南星属 *Arisaema* Mart.、犁头尖属 *Typhonium* Schott）ITS 序列。用 BioEdit 软件进行序列比较，找到半夏特异性 SNP 位点，设计鉴别引物 BX-123aF：5'-CGGCGGAGGCACGCAAT-3'和 BX-123R：5'-AATTCACACCACGTATCGCATTT-3'。引物设计如图 1 所示。

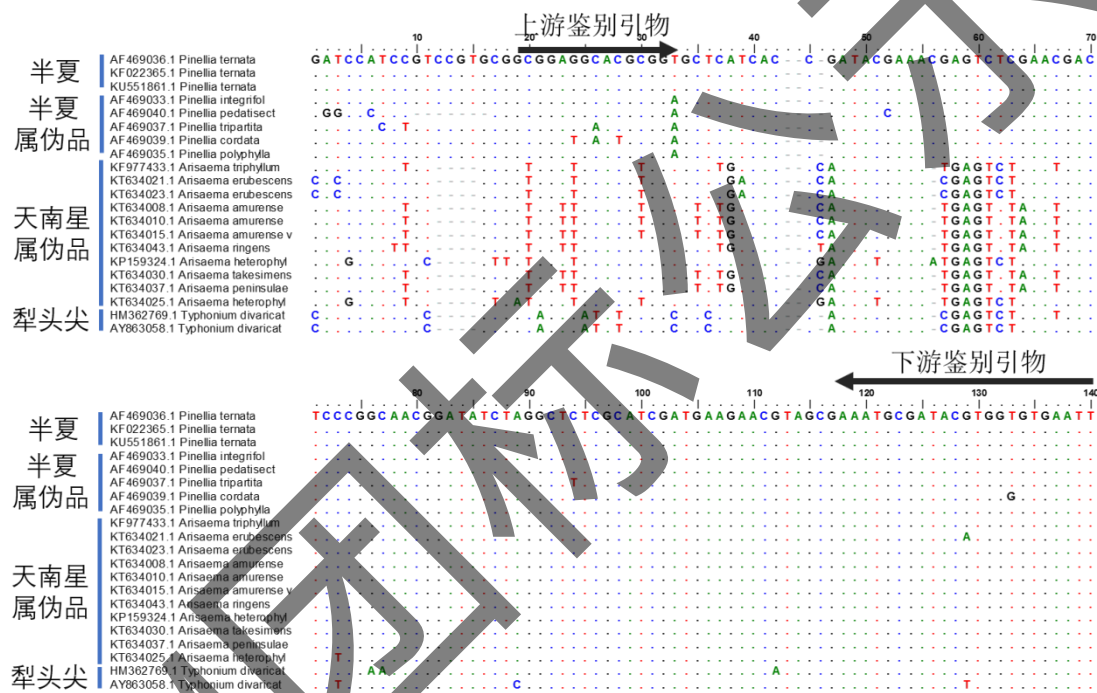


图 1 半夏特异性 PCR 鉴定的引物设计

A.2 聚合酶对 PCR 鉴别结果的影响

不同 Taq DNA 聚合酶对半夏配方颗粒 PCR 鉴别的适用性不同，使用 2× T5 Super PCR Mix（北京擎科新业生物技术有限公司）、2× M5 SuperFast Taq PCR Master Mix（聚合美生物技术有限公司）、MightyAmp DNA Polymerase Ver.2（Takara 生物技术有限公司）、2×TransStart® FastPfu Fly PCR Super Mix（全式金生物技术有限公司）进行测试，结果仅 2× M5 SuperFast Taq PCR Master Mix 在半夏药材、半夏配方颗粒浸膏、半夏配方颗粒中均能扩增出 123 bp 的单一鉴别条带（图 2）。

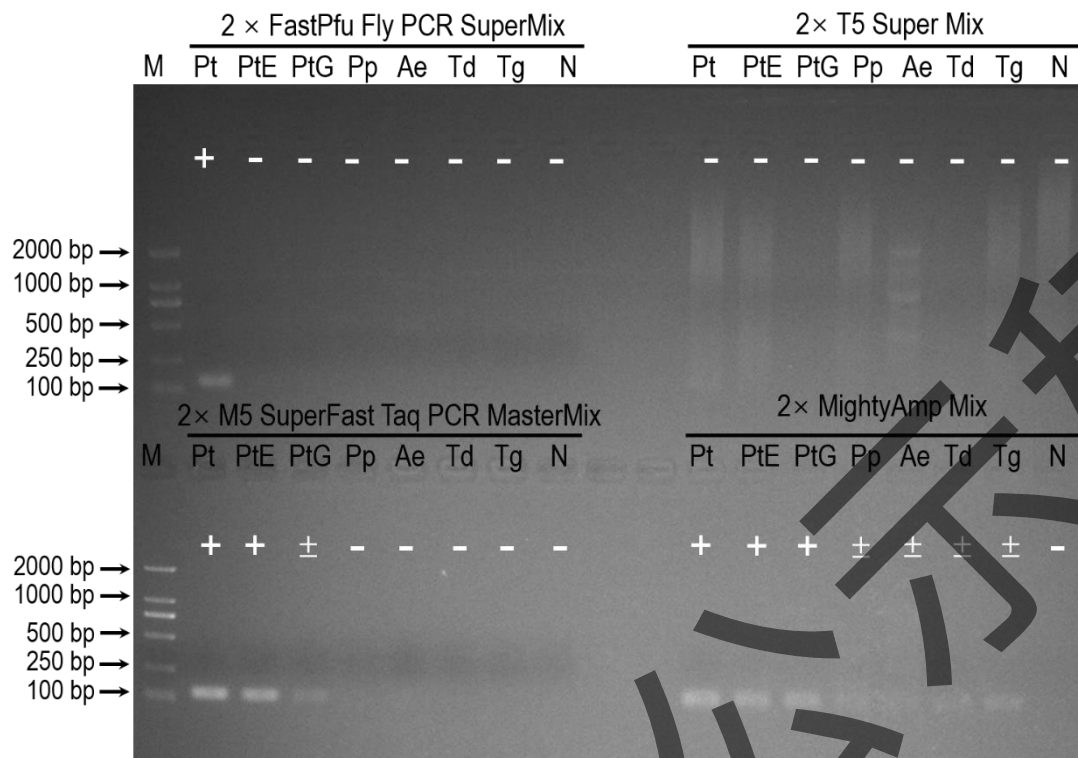


图2 不同聚合酶种类对半夏特异性 PCR 鉴别结果的影响

M: Trans 2K DNA Marker; Pt: 半夏; PtE (河北安国): 法半夏配方颗粒浸膏; PtG: 法半夏配方颗粒; Pp: 虎掌南星 (河北霸州); Ae: 天南星 (湖南慈利); Td: 水半夏 (广西玉林); Tg: 白附子 (辽宁); N: 空白对照。

A.3 方法的适用性考察

采用标准所述体系对不同来源的半夏配方颗粒进行鉴定,所有半夏配方颗粒均可扩增获得 123 bp 特异性鉴别条带,混伪品配方颗粒在相应位置上均无扩增条带(图 3)。

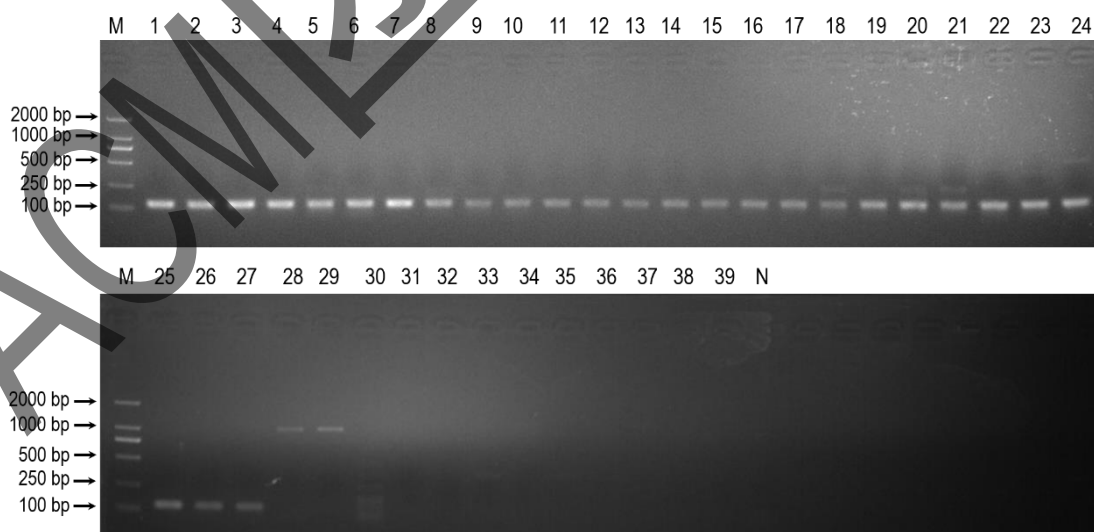


图3 不同企业、批次半夏及其混伪品配方颗粒鉴定结果

M. Trans 2K DNA Marker; 1-3: 法半夏配方颗粒浸膏; 4-23: 法半夏配方颗粒; 24-27: 清半夏配方颗粒; 28-34: 制天南星配方颗粒; 35-37: 制白附子配方颗粒; 38-39: 附片配方颗粒

粒；N：空白对照

CACM国家标准公示稿

参 考 文 献

[1] 聚合酶链式反应法通则起草组.《中国药典》聚合酶链式反应法的建立[J].中国中药杂志,2020,45(19):4537-4544.
