

公示稿

海 马

Haima

HIPPOCAMPUS

【鉴别】聚合酶链式反应法。

模板 DNA 提取 取本品 0.5g，加液氮适量，充分研磨使成粉末。取 30mg 置 2ml 离心管中，用柱式动物基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA[加入 ACL 缓冲液 250 μ l，蛋白酶 K（20mg/ml）20 μ l，在 55℃ 水浴保温 1 小时，离心（转速为每分钟 5000 转）1 分钟，取上清液 200 μ l 转移至另一 2ml 离心管；加入 CL 缓冲液 200 μ l，无水乙醇 200 μ l；混匀后加到 DNA 纯化柱中，离心（转速为每分钟 10000 转）1 分钟；弃去过滤液，加入 CW1 溶液 500 μ l，离心（转速为每分钟 10000 转）1 分钟；弃去过滤液，加入 CW2 溶液 500 μ l，离心（转速为每分钟 12000 转）1 分钟；弃去过滤液，再离心 2 分钟，将 DNA 纯化柱转移入另一离心管中，加入 CE 缓冲液（10mmol/L，pH 9.0）100 μ l，室温放置 3 分钟后，离心（转速为每分钟 12000 转）1 分钟]，取洗脱液，作为供试品溶液，置零下 20℃ 保存备用。另取线纹海马、刺海马、大海马、三斑海马或小海马对照药材粉末 30mg，同法制成对照药材模板 DNA 溶液。

PCR 反应 线纹海马鉴别引物：5'-TCAGGAGTAGAAGCTGGGTCG-3' 和 5'-TGTGAGAAGTATGGTAATCCCG-3'；刺海马鉴别引物：5'-CTTTGATAATTGGAGCACCTTAC-3' 和 5'-GGTCAAAAAATGTTGTGTTTAAGTTA-3'；大海马鉴别引物：5'-CTAATGCCTGAATTACAGGAGAG-3' 和 5'-TCCTGTGGTGAGGTCAAGC-3'；三斑海马鉴别引物：5'-AATGATGCCCTTGTAGACCTC-3' 和 5'-CCCCCTCAAACCTCACTGAATA-3'；小海马鉴别引物：5'-CCTCATTCCTTCTTCTCCGC-3' 和 5'-TGTTTGGTATTGCGTGATTGAC-3'。

PCR 反应体系：在 200 μ l 离心管中进行，总反应体积为 25 μ l，反应体系包括 10 $\times$ PCR 缓冲液 2.5 μ l，dNTP（10mmol/L）1.5 μ l，鉴别引物（10 μ mol/L）各 0.25 μ l，无 3'-5' 外切酶活性的 TaqDNA 聚合酶（5U/ μ l）0.2 μ l 和供试品溶液（DNA 模板）1 μ l，

无菌双蒸水 19.3 μ l。将离心管置 PCR 仪，PCR 反应参数:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 分钟，循环反应 35 次（94 $^{\circ}$ C 30 秒，60 $^{\circ}$ C 30 秒，72 $^{\circ}$ C 30 秒），延伸（72 $^{\circ}$ C）5 分钟。另取无菌超纯水，同法上述 PCR 反应操作，作为空白对照。

电泳检测 照琼脂糖凝胶电泳法（通则 0541），胶浓度为 1.5%，每 100ml 胶中加入 10000 $\times$ 核酸凝胶染色剂 GelRed 5 μ l；供试品与对照药材 PCR 反应溶液的上样量分别为 5 μ l，DL2000 DNA 分子量标记上样量为 5 μ l。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。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，线纹海马、刺海马和三斑海马在 250~500bp 之间应有单一 DNA 条带；大海马和小海马在 100~250bp 之间应有单一 DNA 条带。空白对照无条带。

起草单位：中国中医科学院中药资源中心
复核单位：大连市药品检验所