附件1

黄连上清丸（水丸）、龙胆泻肝丸（水丸）、

防风通圣丸（水丸）和风寒咳嗽丸（水丸）

中水稻源性成分检查项补充检验方法

（BJY 202107）

**【检查】水稻源性成分**

**样品制备** 供试样品制备 取供试品适量，粉碎，称取10 g，加入65℃预热的TE缓冲溶液（pH 8.0）（10mmol/L Tris-HCl，1mmol/L EDTA）50ml，65℃水浴振摇至完全分散，立即吸取0.5ml混悬液至2ml离心管中，即得。

**标准物质样品制备** 取水稻源性DNA检测标准物质1支，加无菌超纯水100μl溶解，即得。

**空白对照样品制备** 取0.5ml的无菌TE缓冲溶液至2 ml离心管中，即得。

**模板DNA提取** 取上述样品，分别选用植物基因组DNA提取试剂盒（离心柱型）提取，得模板DNA溶液，储存于-20℃备用。

**PCR反应** 鉴别引物：5' TTAGCCTCCCGCTGCAGA3'和5' AGAGTCCACAAGTGCTCCCG3'。PCR反应体系：在200μl离心管中进行，反应总体积为25μl，反应体系包含2×PCR预混液（包含DNA聚合酶、dNTPs、MgCl2、反应缓冲液等）12.5μl，鉴别引物（50μmol/L）各0.2μl，模板DNA（或水稻源性DNA检测标准物质）溶液2μl，无菌超纯水10.1μl。每个样品设置2个平行。PCR反应参数：95℃预变性3分钟，循环反应40次（95℃30秒，62℃30秒，72℃30秒），72℃延伸10分钟，4℃保存反应产物。

**电泳检测** 照琼脂糖凝胶电泳法（《中国药典》2020年版通则0541），胶浓度为2.0%，胶中加入核酸凝胶染色剂GelRed；供试品、水稻源性DNA检测标准物质和空白对照溶液的上样量分别为10-20μl，DNA分子量标记物（建议使用DL500）上样量为5μl。电泳结束后，取凝胶片在凝胶成像仪上检视。

**系统适用性** （1）空白对照在凝胶电泳图谱中应无条带检出；（2）水稻源性DNA检测标准物质在凝胶电泳图谱50~100bp中应有条带检出。应同时满足以上2个条件，否则实验无效。

**克隆测序** 使用商业化PCR产物克隆试剂盒，将PCR特征条带克隆到T载体上，用Sanger法进行序列测定，与水稻参考序列进行比对分析。

**结果判定** 凝胶电泳图谱中，供试品在50~100bp间不得出现与水稻源性DNA检测标准物质大小一致的条带。若出现相应的条带，其克隆测序结果与给定水稻参考序列应不一致。若出现个别碱基差异，将克隆测序结果与NCBI数据库中其他水稻序列进行比对，不应100%匹配。

**水稻参考序列** AGAGTCCACAAGTGCTCCCGCGCGTCC GAAGAAACCAACCACACTGCCGCTCTGCAGCGGGAGGCTAA。

**备注** 本方法所用容器应为一次性耗材或经过彻底清洗和高压消毒并消除核酸污染的耗材，否则不可重复使用。试剂均为分析纯或生化试剂，实验用水应符合GB/T6682的要求。所有试剂均用无DNA酶污染的容器盛装。

**起草单位：**中国食品药品检定研究院

**复核单位：**四川省食品药品检验研究院