

# DB22

## 吉 林 省 地 方 标 准

DB 22/T 2260—2015

---

### 鹿鞭鉴定方法 PCR 法

Identification of Sika Deer and Wapiti Pizzles----Polymerase Chain Reaction Method

地方标准信息服务平台

2015 - 02 - 01 发布

2015 - 03 - 01 实施

---

吉林省质量技术监督局 发布



## 前 言

本标准按照GB/T 1.1-2009和GB/T 20001.4-2001给出的规则起草。

本标准由吉林省畜牧业管理局提出并归口。

本标准起草单位：中国农业科学院特产研究所。

本标准主要起草人：邢秀梅、吴琼、杨福合、苏伟林、邵元臣、查代明、荣敏、刘华淼、徐佳萍、杨颖、涂剑锋、张铁涛。

地方标准信息服务平台



# 鹿鞭鉴定方法 PCR 法

## 1 范围

本标准规定了梅花鹿鞭、马鹿鞭（塔河马鹿除外）的 PCR 鉴定方法。  
本标准适用于梅花鹿鞭、马鹿鞭（塔河马鹿除外）的真伪鉴定。

## 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

WS/T 230-2002 临床诊断中聚合酶链反应（PCR）技术的应用

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**鹿鞭 pizzle**

梅花鹿、马鹿的外生殖器，包括阴茎及睾丸。

## 4 原理

针对梅花鹿、马鹿线粒体DNA(mtDNA)的D-loop区特异性基因序列设计引物，应用聚合酶链反应(PCR)技术扩增特异性DNA片段，根据是否扩增出特异性片段对鹿鞭进行鉴定。

## 5 试剂和材料

除非另有说明，所有的化学试剂均为分析纯。实验用水规格应符合GB/T 6882中二级水的规定。

### 5.1 引物

上游引物：5'-CAAAGCACGTGATATAACCTTATG-3'

下游引物：5'-ATCTAGTGCTCGAATTAATGGTAC-3'

### 5.2 试剂

5.2.1 氯化钠（NaCl），CAS 号 7647-14-5。

5.2.2 氯化镁（MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O），CAS 号 7791-18-6。

5.2.3 氢氧化钠（NaOH），CAS 号 1310-73-2。

- 5.2.4 琼脂糖, CAS 号 9012-36-6。
- 5.2.5 三羟甲基氨基甲烷 (Tris), CAS 号 77-86-1。
- 5.2.6 十二烷基磺酸钠 (SDS), CAS 号 2386-53-0。
- 5.2.7 乙二胺四乙酸二钠盐 ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ), CAS 号 15708-41-5。
- 5.2.8 盐酸 (HCl), CAS 号 7647-01-0。
- 5.2.9 三氯甲烷 (氯仿), CAS 号 67-66-3。
- 5.2.10 冰乙酸, CAS 号 64-19-7。
- 5.2.11 无水乙醇, CAS 号 64-17-5。
- 5.2.12 Tris 饱和酚, CAS 号 108-95-2。
- 5.2.13 Triton X-100, CAS 号 9036-19-5。
- 5.2.14 75%乙醇。
- 5.2.15 酚:氯仿混合液 (体积比 1:1): Tris 饱和酚、氯仿等体积混合, 置于棕色瓶中, 4℃保存。
- 5.2.16 dNTP 溶液 (市售): 含 dATP、dTTP、dCTP、dGTP, 各 2.5 mmol/L。
- 5.2.17 10×PCR Buffer 缓冲液 (不含氯化镁) (市售): 100 mmol/L KCl, 160 mmol/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 20 mmol/L  $\text{MgSO}_4$ , 200 mmol/L Tris-HCl (pH 8.8), 1% TritonX-100, 1 mg/mL BSA。
- 5.2.18 Taq DNA 聚合酶 (5 U/ $\mu\text{L}$ )。
- 5.2.19 溴化乙锭 (10 mg/ml): 称量 100 mg 溴化乙锭溶解于 10 mL 水中, 然后分装成 1 mL/份, 4℃避光保存。
- 5.2.20 10 mM Tris: 称量 24.22 g Tris 溶于 160 ml 蒸馏水中, 加浓 HCl 调 pH 至 8.0, 最后定容至 200 mL, 常温保存。
- 5.2.21 0.5 mol/l EDTA: 称量 186.1 g EDTA 溶于 800 mL 蒸馏水中, 加 NaOH 调 pH 至 8.0, 最后定容至 1000mL, 高压灭菌后, 常温保存。
- 5.2.22 10% SDS: 称量 10.0 g SDS 溶于 100 mL 蒸馏水中, 55℃水浴锅中助溶。
- 5.2.23 20 mg/mL 蛋白酶 K: 称量 100.0 mg 蛋白酶 K 溶于 5 ml 无菌去离子水 (ddH<sub>2</sub>O) 中, 分装成 1 mL/份, -20℃保存。
- 5.2.24 50×TAE: 称量 242.0 g Tris 溶于 700 mL 蒸馏水中, 加入 57.1 mL 冰乙酸, 100 mL 0.5 mol/L EDTA (pH8.0) 后定容至 1000 mL, 使用时 50 倍稀释。
- 5.2.25 细胞裂解液: 0.5% SDS, 0.5% Triton X-100, 10 mM Tris pH 7.6, 10 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , 8 mM  $\text{MgCl}_2$ , 8mM NaCl。
- 5.2.26 DNA 分子量标准: DL 2000。
- 5.2.27 6×loading Buffer (市售): 含 0.25%溴酚蓝, 0.25%二甲苯青 FF, 30%甘油水溶液, 4℃保存。

## 6 仪器

- 6.1 PCR 仪。
- 6.2 紫外分光光度计。
- 6.3 电泳仪。
- 6.4 凝胶成像系统。
- 6.5 离心机: 离心力 $\geq 12000$  g。
- 6.6 微量可调移液器: 0.2  $\mu\text{L}$ ~2  $\mu\text{L}$ , 2  $\mu\text{L}$ ~20  $\mu\text{L}$ , 20  $\mu\text{L}$ ~200  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{L}$ ~1000  $\mu\text{L}$ 。
- 6.7 涡旋振荡器。
- 6.8 电子天平: 感量 0.0001 g

## 6.9 恒温水浴锅。

## 7 试样制备

新鲜、烘干或加工后鹿鞭样品，每个样品采集阴茎前段、中段及睾丸各选取2个点，每个点采集0.5 cm<sup>3</sup>的样品，在液氮下研磨成粉末状，放入冻存管中，-80 ℃保存。

## 8 分析步骤

### 8.1 提取 DNA

8.1.1 取处理后的试样约 50 mg，放入 1.5 mL 离心管中，加入 500 μL 细胞裂解液 (5.2.25) 摇匀，加入 10 μL 蛋白酶 K，充分混匀后放入 55 ℃ 水浴中温和振荡，消化过夜。

8.1.2 加入等体积的 Tris 饱和酚，颠倒混匀离心，上清液转入新的离心管中，重复 2 次。

8.1.3 上清液加入等体积的酚和氯仿的混合液 (1 : 1)，缓慢混匀 10 min，4 ℃ 12000 r/min 离心 5 min，吸取上清。

8.1.4 上清液中加入等体积的氯仿，颠倒混匀，4 ℃ 12000 r/min 离心 5 min，吸取上清。

8.1.5 加入 2 倍体积的冰乙醇，混匀，4 ℃ 12000 r/min 离心 10 min，弃上清液。

8.1.6 加入 75% 乙醇 500 μL，4 ℃ 12000 r/min 离心 10 min，弃上清，沉淀核酸。

8.1.7 在 65 ℃ 烘箱中干燥 5 min；

8.1.8 加入 100 μL 超纯水，溶解，-20 ℃ 保存。

注：也可用 DNA 提取试剂盒提取，按照试剂盒操作说明书指示进行操作。

### 8.2 PCR 检测

#### 8.2.1 PCR 反应体系

PCR 反应体系见表 1，同时设置阴性对照（无菌水）。

表 1 PCR 反应体系

成分	用量/(μL)
10 × Buffer	2.5
dNTP/(2.5 mM)	3.0
上游引物/(10 μM)	0.5
下游引物/(10 μM)	0.5
Taq 酶/(5 U/μL)	0.5
DNA 模板	1.5
ddH <sub>2</sub> O	16.5

注：按照上述试剂顺序逐项加样至 0.2 mL 的 PCR 反应管中，混匀后瞬离。

#### 8.2.2 PCR 反应程序

预变性 95 ℃，10 min；循环扩增 94 ℃，1 min，56 ℃，50 s，72 ℃，1 min，30 个循环；延伸 72 ℃，10 min。4 ℃ 保存。

### 8.2.3 扩增产物电泳

用1×TAE电泳缓冲液配制成1%琼脂糖平板（溴化乙锭终浓度0.5 μg/mL）。将平板放入水平电泳槽中，加入1×TAE电泳缓冲液刚刚高出凝胶表面，将PCR扩增产物6 μL与1 μL上样缓冲液混合，分别加入样品孔中，取5 μL DNA Marker DL 2000加入到标准分子量对照孔内。5 V/cm恒压电泳30 min-45 min。凝胶成像系统下观察并分析。

## 9 结果判定

若待检样品出现306 bp或307 bp特异性片段，即判定为梅花鹿或马鹿鹿鞭。

必要时取PCR扩增产物进行测序，如果结果与附录A参考序列比较，序列相似性在95 %以上，可进一步确认待测样品结果为阳性。

## 10 废弃物处理和防止污染的措施

10.1 检测过程中的废弃物需经 121 °C 高压灭菌处理至少 30 min。

10.2 检测过程中防止交叉污染的措施见 WS/T 230-2002 中第六章规定执行污染的预防和控制规定。

地方标准信息服务平台



附 录 A  
(资料性附录)  
梅花鹿、马鹿的特征性序列

A.1 梅花鹿特异扩增片段序列 (307bp):

ACAAAGCACGTGATATAACCTTATGTGTTTGTAGTACATAAAAATTAATGCATTAAGGCACACATG  
TACAATGGTACATAAAAATCGGTGTATAGGACATATTATGCATAATAGTACATAAATTAATGTATT  
AGGACATACTATGTATAATAGTACATTATATTATATGCCCCATGCTTATAAGCATGTATTTTCTAT  
TATCTACAGTACATAGTACATGATGTTGCTTATCGTACATAGCGCATTGAGTCAAATCAGTCCTC  
GTCAGCATGCGTATCCCGTCCACTAGATCACGAGCTTGATCACCATG

A.2 马鹿特异扩增片段序列 (306bp):

GCAAAACACGTGATATAACCTTATGCGCTTGTAGTACATAAAAATCAATGTACTAGGACATGCATG  
TATAACAGTACATAAGTTAGCGTATAGGACATATTATGTATAATAGTACATAAATTAATGTATCA  
GGACATATTATGTATAATAGTACATTATATTATATGCCCCATGCTTATAAGCATGTACTTTTCTACT  
ATCTAAAGTACATAGTACATAATGTTGTTTCATCGTACATAGTACATTAAGTCAAATCAGTCCTTGT  
CAACATGCGTATCCCGTCCCCTAGATCACGAGCTTAATTACCATG

---

地方标准信息服务平台