

SF

中华人民共和国司法行政行业标准

SF/T 0134—2023

法医学生物检材核酸提取技术规范

Technical specification for nucleic acid extraction of forensic biological sample

2023 - 10 - 07 发布

2023 - 12 - 01 实施

中华人民共和国司法部 发布



# 目 次

前言 .....	II
1 范围 .....	1
2 规范性引用文件 .....	1
3 术语和定义 .....	1
4 缩略语 .....	1
5 总体要求 .....	2
6 常用仪器和设备 .....	2
7 常用试剂推荐配方 .....	2
8 DNA 提取与纯化 .....	2
9 RNA 提取与纯化 .....	8
10 核酸质量评估 .....	12
11 样品保存与记录 .....	13
附录 A（资料性） 常用试剂推荐配方 .....	14
附录 B（规范性） RNA 提取注意事项 .....	15
参考文献 .....	16

## 前 言

本文件按照GB/T 1.1—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。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由司法鉴定科学研究院提出。

本文件由司法部信息中心归口。

本文件起草单位：司法鉴定科学研究院、复旦大学。

本文件主要起草人：李成涛、张素华、陶瑞旸、陈安琪、林源。

# 法医学生物检材核酸提取技术规范

## 1 范围

本文件规定了法医学常见生物检材的核酸提取方法和质量评估方法。  
本文件适用于实验室对生物检材进行核酸的提取、纯化以及质量评估。

## 2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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  
GB/T 27025 检测和校准实验室能力的通用要求  
JJG 646 移液器检定规程

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

#### 核酸 nucleic acid

由核苷酸或脱氧核苷酸通过 3', 5'-磷酸二酯键连接而成的一类生物大分子。

注：包括脱氧核糖核酸（DNA）和核糖核酸（RNA）两类，是储存遗传信息和传递遗传信息的主要物质。

### 3.2

#### 核酸完整度 integrity of nucleic acid

核酸（3.1）提取过程中一级结构（序列）保持完整而不发生改变的程度。

### 3.3

#### 核酸纯度 purity of nucleic acid

核酸（3.1）提取物中目标核酸与残留杂质的相对含量。

注：残留杂质包括来自于检材的蛋白质、多酚、多糖等，来自于提取溶剂的有机物、异硫氰酸盐等，以及DNA提取时残留的RNA、RNA提取时残留的DNA。

### 3.4

#### 提取产量 extraction yield

单位样品中提取到的核酸的总质量。

注：用于评估提取效率。

## 4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

CTAB: 十六烷基三甲基溴化铵 (Cetyltrimethylammonium Bromide)

DNA: 脱氧核糖核酸 (Deoxyribonucleic Acid)

DTT: 二硫苏糖醇 (Dithiothreitol)

EDTA: 乙二胺四乙酸 (Ethylenediaminetetraacetic Acid)

OD: 光密度 (Optical Density)

PBS: 磷酸缓冲盐溶液 (Phosphate Buffered Saline)

PCR: 聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction)

PVP: 聚乙烯吡咯烷酮 (Polyvinylpyrrolidone)

PVPP: 交联聚乙烯基吡咯烷酮 (Polyvinylpolypyrrolidone cross-linked)

RIN: RNA 完整值 (RNA Integrity Number)

RNA: 核糖核酸 (Ribonucleic Acid)

RNase: 核糖核酸酶 (Ribonuclease)

SDS: 十二烷基磺酸钠 (Sodium Dodecyl Sulfonate)

TE: 含乙二胺四乙酸的三羟甲基氨基甲烷缓冲液 (Tris-EDTA Buffer Solution)

Tris: 三(羟甲基)氨基甲烷 (Tris Hydroxymethylaminomethane)

## 5 总体要求

- 5.1 本文件中法医学生物检材包括人源性生物检材及非人源性生物检材, 有条件的情况下, 宜选择新鲜的检材。
- 5.2 本文件中核酸提取包括 DNA 提取和 RNA 提取。
- 5.3 核酸提取过程中宜避免物理因素 (如剪切力、高温等)、化学因素 (如强酸、强碱等) 和生物因素 (如核酸酶等) 的破坏, 保证一级结构的完整性。提取过程中宜避免外界环境 (如灰尘、气溶胶等) 对核酸提取的污染; 排除其他分子 (如蛋白质、多糖、脂类和有机溶剂等) 的污染; 以及防止试验过程中废弃物和废弃液等对环境的污染。在整个试验过程中应采取安全有效的防护措施。
- 5.4 核酸提取宜使用商品化试剂, 具体操作流程宜参照商品化试剂的使用说明书。无商品化试剂或相应的使用说明书时, 应按照第 8 章和第 9 章的规定执行。具体操作应根据样本量、样本状态等调整实验试剂的用量、离心参数等, 并制定相应方法的作业指导书。
- 5.5 核酸提取可采用全自动核酸提取工作站, 具体步骤参照工作站的操作说明书进行。
- 5.6 核酸提取过程中所使用的水均为符合 GB/T 6682 规定的一级水。除非另有规定, 所采用试剂均为分析纯级别, 所有试剂溶液宜大体积配制、小体积分装后使用, 酶溶液应避免反复冻融。
- 5.7 实验室的环境和设施应符合 GB/T 27025 的规定。为了有效防止核酸污染, 实验室宜根据预处理步骤设置不同的工作区域, 所有实验操作宜在规定的区域进行。

## 6 常用仪器和设备

常用仪器和设备宜包括:

- a) 冷冻研磨机;
- b) 冷冻离心机;
- c) 涡旋振荡仪;
- d) 平板电泳仪;
- e) 磁力架;
- f) 水浴锅或干式恒温金属浴;
- g) 凝胶成像系统 (像素不小于 130 万);
- h) 可调移液器 (符合 JJG 646 的规定);
- i) 紫外分光光度仪 (波长范围: 190 nm~1100 nm; 波长准确度与重复性:  $\pm 0.1$  nm);
- j) 精密天平 (精度为 0.1 mg);
- k) 荧光定量仪 (灵敏度应达到 10 pg/ $\mu$ L);
- l) 荧光定量 PCR 仪。

## 7 常用试剂推荐配方

核酸提取中常用试剂推荐配方见附录 A。

## 8 DNA 提取与纯化

### 8.1 聚苯乙烯二乙烯基苯树脂法 (Chelex 提取法)

#### 8.1.1 原理

Chelex-100 是一种由苯乙烯、二乙烯基苯共聚体组成的化学螯合树脂，含有成对的亚氨基二乙酸离子，可螯合多价金属离子。在低离子强度、碱性和煮沸条件下，Chelex-100 通过螯合金属离子去除非核酸杂质并抑制 DNA 降解，经离心后上清液中的 DNA 可用于后续检测。

提取过程在单管内进行，不涉及转移，可有效减少污染和损失，但提取的 DNA 纯度不高，适用于普通 PCR 反应模板制备，不适用于高通量测序的模板制备。

## 8.1.2 试剂

试验过程中主要采用的试剂如下：

- a) Chelex-100 溶液；
- b) 蛋白酶 K；
- c) DTT；
- d) SDS。

## 8.1.3 方法

### 8.1.3.1 血液（斑）

采用 Chelex 提取法对血液（斑）进行 DNA 提取的主要步骤如下：

- a) 取适量血液（斑）检材至 1.5 mL 离心管中并加入适量纯水，振荡充分混匀，室温放置 30 min 以上；
- b) 高速离心后去上清液，沉淀中加入 5% Chelex-100 溶液，振荡后 56 °C 孵育 30 min 以上；
- c) 高速振荡；煮沸或干浴 100 °C，保温 8 min，振荡，高速离心；吸取上清液 DNA，冷藏或冷冻保存。

### 8.1.3.2 唾液（斑）

采用 Chelex 提取法对唾液（斑）进行 DNA 提取的主要步骤如下：

- a) 取适量唾液（斑）检材至 1.5 mL 离心管中并加入适量纯水，振荡充分混匀，室温放置 30 min 以上；
- b) 高速离心后去上清液，沉淀中加入 5% Chelex-100 溶液，振荡后 56 °C 孵育 1 h 以上；
- c) 高速振荡；煮沸或干浴 100 °C，保温 8 min，振荡，高速离心；吸取上清液 DNA，冷藏或冷冻保存。

### 8.1.3.3 精液（斑）

采用 Chelex 提取法对精液（斑）进行 DNA 提取的主要步骤如下：

- a) 取适量精液斑检材至 1.5 mL 离心管中并加入适量纯水，振荡充分混匀，室温放置 0.5 h~1 h；
- b) 高速振荡 1 min，如有载体，可选择套管离心去除；
- c) 高速离心 2 min，保留少许上清，吹打沉淀。宜取适量悬浮液经染色后进行镜检，如未检出上皮细胞，从步骤 d) 开始；如检出上皮细胞，应按照差异提取法根据精子和上皮细胞的大致比例对消化的时间、温度和试剂浓度进行调整。差异提取法中第 1 步消化后的上清液中含有上皮细胞 DNA，对于高速离心得到的沉淀，宜用纯水离心漂洗 3 次及以上；第 2 步消化液中含有精子细胞 DNA；
- d) 加入适量 Chelex-100 溶液、蛋白酶 K 和 DTT，充分振荡，56 °C 孵育 1 h 以上；

注：精液提取直接从 d) 步骤开始。

- e) 高速振荡；煮沸或干浴 100 °C，保温 8 min，振荡，高速离心；吸取上清液 DNA，冷藏或冷冻保存。

### 8.1.3.4 毛发

采用 Chelex 提取法对毛发进行 DNA 提取的主要步骤如下。

- a) 按照不同检材部位采取不同的处理方法。
  - 1) 毛根：剪取 1 cm 左右含毛囊的毛发，剪碎后放入 1.5 mL 离心管中，加入 Chelex-100 溶液和蛋白酶 K，56 °C 孵育 5 h~6 h 或者过夜；

- 2) 毛干：剪取适量毛干，使用无水乙醇、纯水和无水乙醇依次冲洗，晾干后剪碎，放入 1.5 mL 离心管中，加入 Chelex-100 溶液、蛋白酶 K 和 DTT，56 °C 孵育至完全溶解。
- b) 高速振荡；煮沸或干浴 100 °C，保温 8 min，振荡，高速离心；吸取上清液 DNA，冷藏或冷冻保存。

### 8.1.3.5 软组织

采用 Chelex 提取法对软组织进行 DNA 提取的主要步骤如下：

- a) 取少量软组织用纯水冲洗，剪碎后放入 1.5 mL 离心管中；
- b) 加入 Chelex-100 溶液和蛋白酶 K，56 °C 孵育至完全消化；
- c) 高速振荡；煮沸或干浴 100 °C，保温 8 min，振荡，高速离心；吸取上清液 DNA，冷藏或冷冻保存。

## 8.2 有机溶剂提取法（苯酚-氯仿提取法）

### 8.2.1 原理

在碱性环境和螯合剂 EDTA 作用下溶解细胞膜和核膜，利用阴离子去污剂 SDS 和蛋白酶 K 消化核蛋白，利用苯酚和氯仿有机溶剂萃取 DNA，除去蛋白酶、去污剂和残留蛋白，最后利用无水乙醇沉淀 DNA，去除残留的氯仿，得到纯净的 DNA。这一方法能从检材中提取到分子量相对较大的 DNA，且 DNA 纯度较高。

### 8.2.2 试剂

试验过程中主要采用的试剂如下：

- a) 细胞裂解缓冲液（含有螯合剂 EDTA）；
- b) 蛋白酶 K；
- c) DTT；
- d) TNE 缓冲液；
- e) TES 裂解液；
- f) 0.5 mol/L EDTA (pH10.0)；
- g) 无水乙醇（-20 °C 预冷）；
- h) 75%乙醇（-20 °C 预冷）；
- i) 次氯酸钠；
- j) 苯酚；
- k) 氯仿；
- l) 异戊醇；
- m) TE 缓冲液；
- n) 3 mol/L NaCl。

### 8.2.3 方法

#### 8.2.3.1 DNA 提取前处理方法

检材进行 DNA 提取前处理方法如下。

- a) 血液：取适量血液加入等体积细胞裂解缓冲液，充分混匀至透明。离心后去上清液，沉淀中加入 TES 裂解液和蛋白酶 K，充分混匀后 56 °C 孵育 4 h 以上。
- b) 毛发：按照不同部位采取不同的处理方法：
  - 1) 毛根：剪取 1 cm 左右含毛囊的毛发，剪碎后放入 1.5 mL 离心管中，加入适量纯水并剧烈振荡，随后加入 TES 裂解液和蛋白酶 K，56 °C 孵育至完全溶解；
  - 2) 毛干：剪取适量毛干，剪碎后放入 1.5 mL 离心管中，使用无水乙醇、纯水、无水乙醇依次冲洗检材，晾干后加入 TES 裂解液、蛋白酶 K 和 DTT，56 °C 孵育至完全溶解。
- c) 精斑：剪碎适量检材，加入 TNE 缓冲液，37 °C 孵育 0.5 h~1 h。加入 TES 裂解液和蛋白酶 K，37 °C 孵育 2 h。离心后去上清液，沉淀中加入适量 TNE 缓冲液，洗涤离心数次。沉淀中加入蛋白酶 K 和 DTT，56 °C 孵育 3 h~4 h。



- d) 软组织：取少量软组织剪碎放入 1.5 mL 离心管中，加入适量 TES 裂解液和蛋白酶 K，56 °C 孵育 2 h 以上，期间每隔 0.5 h 颠倒混匀，直至透明。
- e) 骨骼、牙齿：清理骨骼和牙齿表面污垢，以 5% 次氯酸钠溶液浸泡 15 min，蒸馏水清洗 3 次~4 次，无水乙醇浸泡 1 次，除去残余水分，紫外照射 1 h。取适量骨骼和牙齿检材，研磨成粉末后加入 1.5 mL 离心管中，加入 0.5 mol/L EDTA (pH10.0)，56 °C 脱钙至骨质松软 (36 h~48 h)，加入 TES 裂解液和蛋白酶 K，56 °C 孵育过夜。离心，将上清液转移到新的 1.5 mL 离心管中。

### 8.2.3.2 主要提取步骤

主要提取步骤如下：

- a) 加入等体积的苯酚，上下颠倒混匀；
- b) 离心，吸取上层液体到新的 1.5 mL 离心管中，加入苯酚/氯仿/异戊醇混合液 (25:24:1)，上下颠倒混匀；
- c) 离心，吸取上清液到新的 1.5 mL 离心管中，加入等体积的氯仿和异戊醇混合液 (24:1)，上下颠倒混匀；
- d) 离心，吸取上清液到新的 1.5 mL 离心管中，加入 2.5 倍体积预冷的无水乙醇和 1/10 体积的 3 mol/L NaCl，混匀，-20 °C 沉淀。软组织、骨骼及牙齿类检材宜 -20 °C 过夜；
- e) 离心，去上清液，白色沉淀中加入预冷的 75% 乙醇进行洗涤，离心；
- f) 重复 e) 步骤 2 次。如果 e) 步骤中沉淀已完全溶解，直接进行 g) 步骤；
- g) 去上清液，晾干后加入 TE 缓冲液或纯水溶解 DNA，冷藏或冷冻保存。

## 8.3 硅珠法

### 8.3.1 原理

使用二氧化硅微粒在高浓度的离液盐（盐酸胍和硫氰酸胍等）作用下特异性捕获有机质溶液中的 DNA 分子。

### 8.3.2 试剂

试验过程中主要采用的试剂如下：

- a) TES 裂解液；
- b) 蛋白酶 K；
- c) 无水乙醇；
- d) DTT；
- e) 次氯酸钠；
- f) 0.5 mol/L EDTA (pH10.0)；
- g) SDS；
- h) 吸附液；
- i) 硅珠悬液（富含二氧化硅微粒）；
- j) 75% 乙醇（-20 °C 预冷）；
- k) 漂洗液；
- l) TE 缓冲液。

### 8.3.3 方法

#### 8.3.3.1 DNA 提取前处理方法

检材进行 DNA 提取前处理方法如下。

- a) 血液（斑）：取少量血液（斑）至 1.5 mL 离心管中，加入 TES 裂解液，煮沸 5 min 后涡旋混匀。血液涡旋液直接进行后续提取。血斑涡旋液去除载体后离心，上清液转移到新的 1.5 mL 离心管中。

- b) 精斑：剪碎适量检材，加入 TES 裂解液和蛋白酶 K，56 °C 孵育 1 h 左右。去除载体后离心，去上清液，用 TES 裂解液洗涤沉淀物数次。加入 TES 裂解液和 DTT，56 °C 孵育 2 h 左右，煮沸 5 min 以上。离心，将上清液转移到新的 1.5 mL 离心管中。
- c) 毛发、指甲：分别使用纯水和无水乙醇洗涤，剪碎后加入 TES 裂解液、SDS 和 DTT，56 °C 孵育至完全溶解。离心，将上清液转移到新的 1.5 mL 离心管中。
- d) 骨骼、牙齿：同 8.2.3.1 中的 e) 步骤。

### 8.3.3.2 主要提取步骤

主要提取步骤如下：

- a) 加入吸附液，上下颠倒混匀，加入硅珠悬液，上下颠倒混匀，室温静置 15 min 左右；
- b) 离心，去上清液，加入漂洗液，上下颠倒混匀；
- c) 离心，去上清液，加入预冷的 75%乙醇，上下颠倒混匀；
- d) 离心，去上清液，加入 TE 缓冲液或纯水，56 °C 孵育 10 min 以上；
- e) 离心，DNA 溶液冷藏或冷冻保存。

## 8.4 磁珠法

### 8.4.1 原理

在离液盐（盐酸胍、硫氰酸胍等）和外加磁场作用下，采用超顺磁性氧化硅纳米磁珠特异性吸附经细胞裂解液裂解后释放出的 DNA。

### 8.4.2 试剂

宜采用商业化磁珠试剂盒。

### 8.4.3 方法

磁珠法适用于血液（斑）、唾液（斑）、精液（斑）、毛发和软组织等检材的 DNA 提取。具体步骤应按照试剂盒说明书操作。

## 8.5 十六烷基三甲基溴化铵法（CTAB 法）

### 8.5.1 原理

使用阳离子去污剂 CTAB 溶解细胞壁和细胞膜，与 DNA 形成复合物，通过离心将 CTAB-DNA 复合物与蛋白、多糖类物质分开，再通过有机溶剂分离、去除杂质，利用乙醇沉淀获得纯化 DNA。

### 8.5.2 试剂

试验过程中主要采用的试剂如下：

- a) CTAB 提取缓冲液；
- b) 苯酚；
- c) 氯仿；
- d) 异戊醇；
- e) 异丙醇；
- f) 75%乙醇（-20 °C 预冷）；
- g) TE 缓冲液。

### 8.5.3 方法

十六烷基三甲基溴化铵法适用于植物 DNA、骨骼和牙齿等疑难生物检材的 DNA 提取。

主要提取步骤如下：

- a) 取适量检材，清洗干燥后研磨成粉末，加入 2 mL 离心管中；
- b) 加入 CTAB 提取缓冲液（宜为 800  $\mu$ L），65 °C 孵育 1 h 以上，每隔 15 min 上下颠倒混匀 1 次；
- c) 加入等体积的苯酚/氯仿/异戊醇（25:24:1），上下颠倒混匀；

- d) 离心（宜为 12,000 rpm, 10 min），将上层水相转移到新的 2 mL 离心管中，加入等体积氯仿/异丙醇（24:1），上下颠倒混匀；
- e) 离心（宜为 12,000 rpm, 10 min），将上清转移到新的 1.5 mL 离心管中；
- f) 加入 0.6 倍体积的异丙醇，-20 °C 沉淀 30 min 以上；
- g) 离心（宜为 12,000 rpm, 10 min），弃上清，向沉淀中加入预冷的 75%乙醇，洗涤 2 遍；
- h) 离心后去上清液，保持开盖状态，待沉淀于室温下干燥（不可太干），或选择真空干燥仪干燥 40 min 左右，加入 TE 缓冲液或纯水溶解，DNA 溶液冷藏或冷冻保存。

## 8.6 硅胶膜吸附法

### 8.6.1 原理

使用硅胶膜吸附经细胞裂解液裂解后释放出的 DNA，然后经蛋白酶消化，漂洗液清洗去除蛋白质、脂质以及多糖等杂质，从而获得纯化 DNA。

### 8.6.2 试剂

宜采用商业化硅胶膜离心柱试剂盒。

### 8.6.3 方法

硅胶膜吸附法适用于血液（斑）、唾液（斑）、精液（斑）、毛发和软组织等检材的 DNA 提取。具体步骤应按照试剂盒说明书操作。

## 8.7 高盐沉淀法

### 8.7.1 原理

基于 DNA 和蛋白质等其他成分在不同浓度的 NaCl 溶液中溶解度不同的特点，选择适当的盐浓度可以使 DNA 充分溶解而使其他成分沉淀，或者相反，获得纯净的 DNA。

### 8.7.2 试剂

试验过程中主要采用的试剂如下：

- a) 细胞裂解缓冲液；
- b) TES 裂解液；
- c) 蛋白酶 K；
- d) SE 缓冲液；
- e) 5 mol/L NaCl 溶液；
- f) 无水乙醇（-20 °C 预冷）；
- g) 异丙醇（-20 °C 预冷）；
- h) 75%乙醇（-20 °C 预冷）；
- i) TE 缓冲液。

### 8.7.3 方法

高盐沉淀法适用于血液（斑）、唾液（斑）、精液（斑）、毛发和软组织等检材的 DNA 提取。主要提取步骤如下：

- a) 取适量检材于 1.5 mL 离心管中，加入适量细胞裂解缓冲液并充分混匀；
- b) 加入 TES 裂解液和蛋白酶 K，充分混匀后 56 °C 孵育 4 h 以上；
- c) 加入 SE 缓冲液并充分混匀，56 °C 孵育 10 min；
- d) 加入 5 mol/L NaCl 溶液并充分混匀；
- e) 离心后上清加入 2 倍体积预冷的无水乙醇或异丙醇，-20 °C 放置 30 min，摇床上颠倒混匀（约 5 min）至絮状物析出；
- f) 离心后去上清液，沉淀中加入预冷的 75%乙醇进行洗涤；
- g) 重复 f) 步骤 2 次；
- h) 离心后去上清液，室温或者 37 °C 恒温箱中晾干，以去除残余乙醇；

- i) 加入 TE 缓冲液或纯水溶解，产物即为纯化 DNA，冷藏或冷冻保存。

## 9 RNA 提取与纯化

### 9.1 检材预处理方式

RNA 提取与纯化方法主要针对人体体液（血液、唾液、精液等）及体液斑、人体及动/植物组织和细胞等生物检材。

检材的预处理方式如下。

- a) 人体体液（血液、唾液、精液等）检材：吸取适量检材置于离心管内。
- b) 人体体液斑：剪取适量检材，置于离心管内剪碎。
- c) 人体及动物、植物组织：切取适量组织置于研钵（经高温高压消毒）内，倒入液氮研碎，置于离心管内。
- d) 人体及动物、植物细胞：选取适量细胞检材，弃培养基，用 PBS 溶液清洗两次，置于离心管内。

试验过程中宜选择新鲜的检材进行 RNA 提取。若暂时不进行提取，应将检材  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冷冻或者置于液氮中冻存。RNA 提取试验的注意事项按照附录 B 要求。

### 9.2 异硫氰酸胍-酚-氯仿法（Trizol 提取法）

#### 9.2.1 原理

通过 Trizol 试剂，以异硫氰酸胍在低 pH 的苯酚单相溶液中裂解细胞为基础，将 RNA 释放出来。混合液中加入氯仿后加速有机相和水相的分层，其中 RNA 位于水相；之后加入异丙醇从水相中沉淀出 RNA。

#### 9.2.2 试剂

试验过程中主要采用的试剂如下：

- a) Trizol；
- b) 氯仿；
- c) 异丙醇；
- d) 75%乙醇。

#### 9.2.3 方法

Trizol 提取法适用于人体体液（血液、唾液、精液等）及体液斑、人体及动/植物组织和细胞等生物检材的 RNA 提取。

主要提取步骤如下。

- a) 细胞裂解：在预处理检材中加入适量 Trizol（检材量不宜超过 Trizol 体积的 10%，否则易出现 DNA 污染）；室温静置 5 min，以彻底分离核蛋白复合体。
- b) 相分离：加入氯仿（Trizol 体积的 20%），盖好管盖后用手剧烈摇晃 15 s；室温静置 2 min~3 min；离心 15 min（ $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ），离心后分为 3 层：下层为酚-氯仿相，包含蛋白质；中间层包含 DNA；上层为 RNA；将上层水相转移至另一干净的 1.5 mL 离心管中。
- c) RNA 沉淀：加入异丙醇；室温静置 10 min；离心后可在管侧壁或底部看到絮状胶样 RNA 沉淀；弃上清。
- d) RNA 洗涤：加入 75%乙醇洗涤 RNA 沉淀，振荡混匀；离心，弃上清。
- e) RNA 再溶解：置真空或空气中 5 min~10 min，干燥 RNA 沉淀（注意不能将 RNA 沉淀完全干燥）；加入适量 RNase-free 水重悬 RNA 沉淀，用枪头反复吹打几次；静置 10 min（ $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ ~ $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ）； $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存。

### 9.3 阴离子去污剂法

#### 9.3.1 原理

通过阴离子去污剂 SDS（或 Sarkosyl）分离核蛋白与核酸，并与巯基乙醇、苯酚和氯仿等共同抑制 RNA 酶的活性，使蛋白变性，在偏碱性条件下提出总核酸，然后选择性地去除 DNA，获得 RNA；或在酸性条件下直接用酸酚变性去除 DNA，获得 RNA。

### 9.3.2 试剂

试验过程中主要采用的试剂如下：

- a) 提取缓冲液（65 °C 预热）；
- b) 苯酚（pH5.6）；
- c) 氯仿；
- d) 3 mol/L 醋酸钾（KAc, pH5.0）；
- e) 异丙醇（-20 °C 预冷）；
- f) 75%乙醇（-20 °C 预冷）。

### 9.3.3 方法

阴离子去污剂法适用于人体及动/植物组织和细胞等生物检材的 RNA 提取。

主要提取步骤如下。

- a) 细胞裂解：在预处理检材中加入适量预热的提取缓冲液；充分振荡混匀，65 °C 孵育 15 min~20 min 后，平衡至室温。
- b) 相分离：加入等体积的苯酚/氯仿（1:1），振荡 2 min；室温静置 5 min；离心 10 min（4 °C）；将上清液转移至另一干净的 2 mL 离心管中；加入 0.3 倍体积的 5 mol/L KAc 和 0.7 倍体积的苯酚/氯仿（1:1），充分振荡；-20 °C 静置 10 min；离心 10 min（4 °C）；将上清液转移至另一干净的 2 mL 离心管中。
- c) RNA 沉淀：分别加入 0.1 倍体积的 3 mol/L KAc 和预冷的异丙醇，轻轻翻转离心管进行混匀；-20 °C 静置 30 min；离心 15 min（4 °C）；弃上清，RNA 沉淀滞留于管底。
- d) RNA 洗涤：加入预冷的 75%乙醇洗涤 RNA 沉淀；离心 15 min（4 °C）；弃上清。
- e) RNA 再溶解：置超净工作台风干沉淀 5 min~10 min，干燥 RNA 沉淀（注意不能将 RNA 沉淀完全干燥）；加入适量 RNase-free 水溶解 RNA 沉淀，用枪头反复吹打几次；-80 °C 保存。

## 9.4 CTAB 法

### 9.4.1 原理

通过阳离子去污剂 CTAB 溶解细胞壁和细胞膜，分离核蛋白与核酸，并与巯基乙醇共同抑制 RNA 酶的活性，使蛋白变性，使用异丙醇沉淀总核酸，然后再选择性地分离出 RNA。

### 9.4.2 试剂

试验过程中主要采用的试剂如下：

- a) 提取缓冲液（65 °C 预热）；
- b) 氯仿；
- c) 异戊醇；
- d) 75%乙醇（-20 °C 预冷）；
- e) 无水乙醇（-20 °C 预冷）；
- f) 10 mol/L LiCl。

### 9.4.3 方法

CTAB 法主要用于植物组织的 RNA 提取。

主要提取步骤如下。

- a) 细胞裂解：在预处理检材中加入适量预热的提取缓冲液；振荡混匀，65 °C 水浴 30 min（为使细胞充分裂解，每 5 min 短暂振荡混匀 1 次），平衡至室温。
- b) 相分离：加入等体积的氯仿/异戊醇（24:1），振荡混匀；离心 10 min（4 °C）；将上清液转移至另一干净的 2 mL 离心管中；重复操作 1 次。
- c) RNA 沉淀：加入 1/3 体积的 10 mol/L LiCl，4 °C 静置过夜（不超过 16 h）；离心 10 min（4 °C）；弃上清，RNA 沉淀滞留于管底。

- d) RNA 洗涤: 加入预冷的 75%乙醇洗涤 RNA 沉淀; 离心 10 min (4 °C); 弃上清; 加入预冷无水乙醇洗涤 RNA 沉淀; 离心 10 min (4 °C); 弃上清。
- e) RNA 再溶解: 置超净工作台风干沉淀 5 min~10 min, 干燥 RNA 沉淀 (注意不能将 RNA 沉淀完全干燥); 加入适量 RNase-free 水溶解 RNA 沉淀, 用枪头反复吹打几次; -80 °C 保存。

## 9.5 热硼酸法

### 9.5.1 原理

将硼酸缓冲体系、蛋白酶 K 消化蛋白和 LiCl 选择性沉淀 RNA 等步骤偶联在一起进行 RNA 提取和纯化。其中, 硼酸、PVPP 可与酚类化合物形成复合物, 抑制酚类物质与 RNA 的结合; 通过 LiCl 沉淀剩余的酚质物质, 从而分离 RNA。

### 9.5.2 试剂

试验过程中主要采用的试剂如下:

- a) PVPP;
- b) 提取缓冲液 (60 °C 预热);
- c)  $\beta$ -巯基乙醇;
- d) 醋酸钾 (KAc);
- e) 氯仿;
- f) 异戊醇;
- g) 9 mol/L LiCl;
- h) 3 mol/L LiCl;
- i) 75%乙醇;
- j) 无水乙醇。

### 9.5.3 方法

热硼酸法主要用于植物组织的 RNA 提取。

主要提取步骤如下。

- a) 细胞裂解: 在预处理检材中加入 10% PVPP, 于液氮中研磨成细粉, 转移至 1.5 mL 离心管中; 加入 1 mL 预热的提取缓冲液; 振荡混匀后, 加入  $\beta$ -巯基乙醇、无水乙醇和 KAc, 充分振荡; 离心 20 min (4 °C); 将上清液转移至另一干净的 1.5 mL 离心管中。
- b) 相分离: 加入等体积的氯仿/异戊醇 (24:1); 离心 15 min (4 °C); 将上清液转移至另一干净 1.5 mL 离心管中。
- c) RNA 沉淀: 加入 9 mol/L LiCl; -20 °C 静置过夜; 离心 20 min (4 °C); 弃上清, RNA 沉淀滞留于管底。
- d) RNA 洗涤: 加入 3 mol/L LiCl 洗涤 RNA 沉淀; 离心 15 min (4 °C); 弃上清; 沉淀干燥后加入 RNase-free 水、无水乙醇和 KAc; -20 °C 静置 1h; 离心 20 min (4 °C); 弃上清, 加入 75%乙醇洗涤沉淀; 离心 15 min (4 °C); 弃上清。
- e) RNA 再溶解: 置超净工作台风干沉淀 5 min~10 min, 干燥 RNA 沉淀 (注意不能将 RNA 沉淀完全干燥); 加入适量 RNase-free 水溶解 RNA 沉淀, 用枪头反复吹打几次; -80 °C 保存。

## 9.6 LiCl-尿素法

### 9.6.1 原理

通过高浓度尿素抑制 RNA 酶并分离核蛋白与核酸, 用 LiCl 选择性沉淀 RNA。

### 9.6.2 试剂

试验过程中主要采用的试剂如下:

- a) 提取缓冲液;
- b) 3 mol/L 醋酸钠 (NaAc, pH5.3);
- c) 氯仿;

- d) 异戊醇;
- e) 异丙醇 (−20 °C 预冷);
- f) SDS;
- g) 8 mol/L LiCl;
- h) 75%乙醇。

### 9.6.3 方法

LiCl—尿素法多用于植物组织等生物检材的 RNA 提取。

主要提取步骤如下。

- a) 细胞裂解: 将预处理检材迅速转移至预冷的 1.5 mL 离心管 (−20 °C 预冷) 中; 加入适量提取缓冲液; 检材振荡混匀, 冰浴 20 min; 离心 15 min (4 °C); 将上清液转移至另一干净的 1.5 mL 离心管中。
- b) 相分离: 加入 1/3 体积的 3 mol/L NaAc 和 1/5 体积的氯仿/异戊醇 (24:1), 振荡混匀; 冰浴 20 min; 离心 15 min (4 °C); 将上清液转移至另一干净的 1.5 mL 离心管中。
- c) RNA 沉淀: 加入等体积预冷的异丙醇, 振荡混匀; 冰浴 10 min; 4 °C 离心 10 min; 弃上清。
- d) RNA 洗涤: 加入 0.1% SDS 溶液; 离心 10 min (4 °C); 将上清液转移至另一干净的 1.5 mL 离心管中; 加入 8 mol/L LiCl, 冰浴 3 h; 离心 10 min (4 °C); 弃上清; 加入 75%乙醇洗涤沉淀; 离心 10 min (4 °C); 弃上清。
- e) RNA 再溶解: 置超净工作台风干沉淀 5 min~10 min, 干燥 RNA 沉淀 (注意不能将 RNA 沉淀完全干燥); 加入适量 RNase-free 水溶解 RNA 沉淀, 用枪头反复吹打几次; −80 °C 保存。

## 9.7 硅胶膜吸附法

### 9.7.1 原理

通过硅胶膜吸附经细胞裂解液裂解后释放出的 RNA, 并经 DNA 酶消化、漂洗液清洗除去基因组 DNA、蛋白质、脂质及多糖等杂质, 得到纯化的 RNA。

### 9.7.2 试剂

宜采用商业化硅胶膜离心柱试剂盒。

### 9.7.3 方法

硅胶膜吸附法适用于人体体液 (血液、唾液、精液等) 及体液斑、人体及动/植物组织和细胞等生物检材的 RNA 提取。

主要提取步骤包括细胞裂解、RNA 粗提取、RNA 纯化和 RNA 洗脱, 具体步骤应按照试剂盒说明书操作。

## 9.8 磁珠法

### 9.8.1 原理

在胍盐和外加磁场的作用下, 利用氧化硅纳米微球的超顺磁性, 特异性地吸附经细胞裂解液裂解后释放出的 RNA。

### 9.8.2 试剂

宜采用商业化磁珠试剂盒。

### 9.8.3 方法

磁珠法适用于人体体液 (血液、唾液、精液等) 及体液斑、人体及动/植物组织和细胞等生物检材的 RNA 提取。

主要提取步骤包括细胞裂解、RNA 与磁珠结合、RNA 纯化和 RNA 洗脱, 具体步骤应按照试剂盒说明书操作。

## 10 核酸质量评估

### 10.1 核酸完整度

#### 10.1.1 方法

宜采用琼脂糖凝胶电泳评价核酸完整度。

主要操作步骤如下：

- 配置与核酸类型及电泳仪规格相匹配的琼脂糖凝胶；
- 取合适浓度的核酸样品溶液与核酸上样缓冲液混匀；
- 电泳至合适位置；
- 采用凝胶成像系统观察核酸条带。

#### 10.1.2 DNA 完整度

完整的基因组 DNA 电泳结果为一条清晰明亮的条带。DNA 发生降解表现为条带拖尾或者弥散。

#### 10.1.3 RNA 完整度

总 RNA 是从基因组转录出来的所有转录产物，包含信使 RNA、核糖体 RNA 及一些与转录调控、转录后加工及转录后翻译有关的非编码 RNA，因而可通过总 RNA 的检测确定 RNA 的完整性。

宜采用微流控技术或凝胶电泳分析总 RNA 的 RIN 值以及 rRNA 的 28S:18S 比值进行判断。人、动物（不含昆虫）总 RNA 的 RIN 应不小于 7，28S:18S 比值不小于 0.8；植物、真菌总 RNA 的 RIN 应不小于 5，28S:18S 比值不小于 0.8。

电泳条带弥散，没有清晰的核糖体 RNA 条带，表明 RNA 部分降解；电泳条带表现为较低分子量处的弥散状，表明 RNA 完全降解。

## 10.2 核酸纯度

#### 10.2.1 方法

宜采用紫外分光光度法评估核酸纯度。理论上核酸在 260 nm 处达到最大的吸收峰，蛋白质在 280 nm 处达到最大的吸收峰，多糖和有机溶剂在 230 nm 处达到最大的吸收峰。

主要操作步骤如下：

- 宜采用 10 mmol/L Tris-HCl (pH7.5) 对待测核酸溶液进行稀释，保证核酸吸光值 OD<sub>260</sub> 在 0.1~1.5 之间；
- 以 TE 缓冲液做参比，测定样品溶液在 260 nm、280 nm 和 230 nm 处的吸收值，计算 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>、OD<sub>260</sub>/OD<sub>230</sub> 的比值。为保证结果的准确性，每个样品宜重复 3 次，计算求得平均比值。

#### 10.2.2 DNA 纯度

待测 DNA 溶液的 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 为 1.6~2.0，OD<sub>260</sub>/OD<sub>230</sub>≈1.8 可视为较纯 DNA，表示 DNA 纯度符合后续一般分子生物学试验需求。OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub><1.6 时表明有蛋白质、多酚等污染，OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>>2.0 时表明有 RNA 污染，OD<sub>260</sub>/OD<sub>230</sub><2.0 时表明有酚盐、硫氰酸盐或其他有机化合物污染。

#### 10.2.3 RNA 纯度

待测 RNA 溶液的 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 为 1.7~2.0，OD<sub>260</sub>/OD<sub>230</sub>≈2.0 可视为较纯 RNA，表示 RNA 纯度符合后续一般分子生物学试验需求。OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub><1.7 时表明有蛋白质、多酚等污染，OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>>2.0 时表明可能有异硫氰酸残存，OD<sub>260</sub>/OD<sub>230</sub><2.0 时表明有酚盐、硫氰酸盐或其他有机化合物污染。

## 10.3 核酸提取产量

#### 10.3.1 荧光定量法

荧光定量法主要基于荧光染料标记核酸的荧光强度与核酸含量成正比，可排除核糖核酸、脱氧核糖核酸以及蛋白质三者之间的互相干扰。

具体操作步骤应按照相应的试剂盒说明书及仪器使用指南执行。主要操作步骤如下：



- a) 根据待测样品选择合适的标准物质校准荧光定量仪。标准物质在使用前应现用现配，标准物质与荧光染料充分混匀后应室温孵育适当的时间。为保证结果的准确性，标准曲线上的每个浓度应重复 2 次；
- b) 待测核酸样品与荧光染料充分混匀，在室温下孵育适当的时间。为保证结果的准确性，每个样品宜重复 3 次；
- c) 在荧光定量仪上进行荧光检测；
- d) 使用标准物质绘制标准曲线，通过标准曲线线性回归计算核酸提取原溶液中的核酸浓度；
- e) 根据式 (1) 计算核酸提取产量。

$$Q = \frac{\sum_{i=1}^N p^i}{N} \times V \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中：

Q ——产量，单位为纳克 (ng)；

$p^i$  ——第  $i$  次荧光定量仪测得的核酸质量浓度，单位为纳克每微升 (ng/ $\mu$ L)；

N ——重复检测次数；

V ——核酸溶液的体积，单位为微升 ( $\mu$ L)。

### 10.3.2 紫外-可见分光光度法

溶液中的核酸可吸收 210 nm~500 nm 的紫外线 (UV)，并且在 260 nm 达到吸收高峰。

主要操作步骤如下：

- a) 用去离子水将检测池清洗 3 次，用无尘纸擦拭干净。加入 2  $\mu$ L 核酸样本溶解液作为空白对照，在 260 nm 波长下校零。取核酸提取溶液 2  $\mu$ L，在 260 nm 波长下测定，每测 1 次，用去离子水清洗检测池 3 次；

注：利用紫外分光光度计测定核酸提取溶液的 OD<sub>260</sub>，OD<sub>260</sub>测定值的范围在 0.05~1.0 之间才能保证测量值的有效性。如果不在此范围，考虑进行适当的稀释或者浓缩。

- b) 根据式 (2) 计算核酸提取溶液的核酸质量浓度，根据式 (3) 计算核酸提取产量。

$$\rho = OD_{260} \times N \times \varepsilon / b \quad \dots\dots\dots (2)$$

式中：

$\rho$  ——核酸提取溶液的核酸质量浓度，单位为纳克每微升 (ng/ $\mu$ L)；

OD<sub>260</sub> ——核酸在 260 nm 下的光密度；

N ——样品稀释倍数；

$\varepsilon$  ——消光系数，依赖于波长 (双链 DNA 为 50 ng·cm/ $\mu$ L，单链 DNA 为 33 ng·cm/ $\mu$ L，RNA 为 40 ng·cm/ $\mu$ L)；

$b$  ——光程，单位为厘米 (cm)。

$$Q = \rho \times V \quad \dots\dots\dots (3)$$

式中：

Q ——产量，单位为纳克 (ng)；

$\rho$  ——核酸提取溶液的核酸质量浓度，单位为纳克每微升 (ng/ $\mu$ L)；

V ——核酸溶液的体积，单位为微升 ( $\mu$ L)。

## 11 样品保存与记录

### 11.1 样品保存

因核酸不宜反复冻融，宜将提取出的核酸进行多管分装。长期保存应放置于-80℃超低温冰箱中。使用过程中应避免反复冻融，以保证其在后续试验中的稳定性。

### 11.2 样品记录

应对检材来源、取样人员、提取人员、提取方法、核酸完整度、核酸纯度和核酸提取产量等进行登记与归档，便于复核与溯源。

附录 A  
(资料性)  
常用试剂推荐配方

A.1 细胞裂解缓冲液

0.64 mol/L 蔗糖, 0.01 mol/L  $MgCl_2$ , 0.02 mol/L Tris-HCl (pH7.6), 2% TritonX-100。

A.2 TE 缓冲液

10 mmol/L Tris-HCl (pH7.5), 1 mmol/L EDTA (pH8.0)。

A.3 TNE 缓冲液

10 mmol/L Tris-HCl (pH7.5), 5 mmol/L EDTA (pH8.0), 100 mol/L NaCl。

A.4 TES 裂解液

1 mol/L Tris-HCl (pH8.0), 2 mL 5 mol/L NaCl, 0.5 mmol/L EDTA (pH8.0), 0.1%SDS (pH7.5), 95 mL 纯水。

A.5 PBS 缓冲液

8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g  $Na_2HPO_4$ , 0.24 g  $KH_2PO_4$ 溶于 800 mL 蒸馏水中, 1 mol/L Tris-HCl (pH7.4), 最后定容至 1 L。

A.6 硅珠法吸附液

12 g GuSCN, 10 ml 0.1 mol/L Tris-HCl (pH6.4), 0.8 ml 0.5 mol/L EDTA, 0.5 ml Triton X-100。

A.7 硅珠法漂洗液

12 g GuSCN, 10 ml 0.1 mol/L Tris-HCl (pH6.4)。

A.8 蛋白溶解缓冲液

75 mmol/L NaCl, 24 mmol/L EDTA-2Na (pH8.0)。

A.9 CTAB 提取缓冲液

20 g CTAB, 100 ml 1 mol/L Tris-HCl (pH8.0), 40 ml 0.5 mol/L EDTA (pH8.0), 81.82 g NaCl, 定容至 1 L, 使用前加入 4 ml  $\beta$ -巯基乙醇。

A.10 SE 缓冲液

25 mmol/L EDTA, 75 mmol/L NaCl。

A.11 阴离子去污剂法提取缓冲液

100 mmol/L Tris-HCl, 25 mmol/L EDTA, 2%SDS, 1% $\beta$ -巯基乙醇 (pH8.0)。

A.12 热硼酸法提取缓冲液

150 mmol/L Tris-base, 575 mmol/L  $H_3BO_3$ , 50 mmol/L EDTA (pH8.0), 0.5 mol/L NaCl, 4% SDS。

A.13 LiCl-尿素法提取缓冲液

7 mol/L 尿素, 50 mmol/L Tris-HCl (pH8.0), 10 mmol/L EDTA-2Na (pH8.0), 3.5 mol/L NaCl, 0.1%SDS。

注: A.1~A.13中的有机物处理在通风橱中进行。

**附 录 B**  
**(规范性)**  
**RNA 提取注意事项**

RNA 提取过程中要求如下：

- a) 实验人员应穿着防护服，佩戴手套、口罩和帽子，并及时进行更换；
- b) 提取试验应在 RNA 提取实验室 (RNase-free 状态) 进行，工作台应使用 75%乙醇及 RNase 抑制剂彻底清洁。有条件的情况下，宜在超净工作台完成提取工作；
- c) 试验耗材 (如枪头、试管、离心管等) 应为 RNase-free 状态；
- d) 溶剂 (如 Trizol、异丙醇、乙醇等) 宜使用未开封的 (或开封之后直接分装至小容量容器)，以避免多次使用可能造成的交叉污染。

### 参 考 文 献

- [1] 侯一平. 法医物证学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2016
- [2] Huded AKC, Jingade P, Mishra MK. A rapid and efficient SDS-based RNA isolation protocol from different tissues of coffee. 3 Biotech. 2018, 8(3):183
- [3] Badai SS, Rasid OA, Parveez GKA, Masani MYA. A rapid RNA extraction method from oil palm tissues suitable for reverse transcription quantitative real-time PCR (RT-qPCR). 3 Biotech. 2020, 10(12):530
- [4] Yang F, Wang G, Xu W, Hong N. A rapid silica spin column-based method of RNA extraction from fruit trees for RT-PCR detection of viruses. J Virol Methods. 2017, 247:61-67
-