ICS 07.080
G 00

中华人民共和国国家标准

GB/T 37874—2019

核酸提取纯化方法评价通则

General rules for evaluation of nucleic acid extraction and purification methods

2019-08-30 发布　　2019-08-30 实施

国家市场监督管理总局
中国国家标准化管理委员会　发布

目　　次

前言 …… Ⅲ
1　范围 …… 1
2　规范性引用文件 …… 1
3　术语和定义、缩略语 …… 1
4　基本要求 …… 2
5　指标参数 …… 2
6　评价方法 …… 3

前　言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由国家标准物质研究中心提出并归口。

本标准起草单位：中国科学院北京基因组研究所、中国计量科学研究院。

本标准主要起草人：孟庆姝、傅博强、胡松年、葛晓萌、谈昕煜、牛春艳、毕小春。

核酸提取纯化方法评价通则

1 范围

本标准规定了核酸提取纯化方法评价的指标参数和评价方法。

本标准适用于分子生物学实验室对于常规样本(新鲜样本)的核酸(基因组 DNA 与总 RNA)提取纯化方法的一般性评价。

本标准不适用于病毒核酸的提取,游离 DNA 的提取,陈旧样本、微量样本与高度降解样本核酸的提取方法的评价,也不适用于在提取过程中通过添加外源 DNA 或 RNA 以提高提取效率的核酸提取方法的评价。

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(包括所有的修订单)适用于本文件。

ISO 8655-2:2002 活塞式容量测量器 第 2 部分:活塞移液器(Piston-operated volumetric apparatus—Part 2:Piston pipettes)

3 术语和定义、缩略语

3.1 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1.1

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。具有非常重要的生物功能,主要是贮存遗传信息和传递遗传信息。包括核糖核酸(RNA)和脱氧核糖核酸(DNA)两类。

[JJF 1265—2010,定义 4.42]

3.1.2

标准物质 reference material

具有足够均匀和稳定的特定特性的物质,其特性被证实适用于测量中或标称特性检查中的预期用途。

[JJF 1001—2011,定义 8.14]

3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

DNA:脱氧核糖核酸(Deoxyribonucleic Acid)

EDTA:乙二胺四乙酸(Ethylenediaminetetraacetic acid)

OD:光密度(Optical Density)

RNA：核糖核酸(Ribonucleic Acid)

TE：三羟甲基氨基甲烷-乙二胺四乙酸(Tricarboxymethyl aminomethane-Ethylenediamine tetraacetic acid)

Tris：三羟甲基氨基甲烷(Tris hydroxymethylaminomethane)

4 基本要求

常规的用于分子生物学提取核酸的样本主要包括新鲜的动植物组织样本、细胞样本、血液样本、唾液样本和粪便样本等。宜选用新鲜样本进行核酸提取；若不能马上提取，应分装成小份，按照样本特性与采集情况妥善保存。

5 指标参数

5.1 核酸完整度

5.1.1 一般说明

核酸完整度表征提取过程中保持核酸一级结构(序列)完整而不发生改变的程度。在核酸提取时应尽量防止物理(剪切力、高温)、化学因素(强酸、强碱)和生物因素(核酸酶)的破坏。根据试验条件和核酸样品，可以选择琼脂糖凝胶电泳方法进行核酸完整度测定，根据条带位置和不同条带的荧光亮度分析综合计算评价核酸的完整性。

5.1.2 DNA 完整度

用琼脂糖凝胶电泳法检测，完整基因组 DNA 电泳结果为一条清晰明亮的条带，条带拖尾或者弥散代表 DNA 有部分降解。

5.1.3 总 RNA 完整度

5.1.3.1 真核生物总 RNA 完整度

用琼脂糖凝胶电泳法检测，真核生物完整的总 RNA 电泳结果为清晰的两条条带-28S 和 18S-核糖体 RNA 条带。28S 和 18S 核糖体 RNA 条带清晰，且两条条带的荧光亮度比值(28S∶18S)＞1，以满足后续试验的要求。

5.1.3.2 原核生物总 RNA 完整度

用琼脂糖凝胶电泳法检测，原核生物完整的总 RNA 电泳结果为清晰的两条条带-23S 和 16S-核糖体 RNA 条带。23S 和 16S 核糖体 RNA 条带清晰，且两条条带的荧光亮度比值(23S∶16S)＞1，该完整度可以满足绝大部分后续试验的要求。

5.1.3.3 总 RNA 降解

用琼脂糖凝胶电泳法检测，如果电泳条带弥散，没有清晰的核糖体 RNA 条带，为部分降解的 RNA 样品；电泳条带呈现极低分子质量处的弥散状，为完全降解的 RNA 样品。

5.2 提取产量

提取产量是指单位样本中提取得到的核酸(DNA 或 RNA)的总质量。该指标用于表征提取得率。

采用微量紫外测定仪和/或微量荧光剂测定提取液中的核酸质量浓度(ng/μL),结合提取液体积计算提取量,计算得率。计算公式与参考得率见6.2.3。

5.3 核酸纯度

5.3.1 一般说明

核酸纯度是指核酸提取物中目标核酸的纯度,该指标用于表征核酸提取物中目标核酸与残留杂质的相对含量,对于后续的分子生物学试验有重要的影响。核酸在特定波长的吸光度值及其在不同波长吸光度值的比率对不同性质的核酸有对应的特征值,用以表征提取液的核酸纯度。用紫外分光光度计测定260 nm、280 nm、230 nm下提取液的吸光度OD_{260}、OD_{280}、OD_{230},计算OD_{260}/OD_{280}和OD_{260}/OD_{230},表征核酸纯度。测量吸光度时,需调整核酸浓度,保证核酸吸光值OD_{260}在0.1～1.5之间。

5.3.2 DNA纯度

纯DNA OD_{260}/OD_{280}为1.8,在DNA提取获得的产物中,OD_{260}/OD_{280}在1.7～1.9表明DNA纯度符合后续一般分子生物学试验需要。$OD_{260}/OD_{280}>1.9$时表明有RNA污染;$OD_{260}/OD_{280}<1.7$时表明有蛋白质、多酚等污染。纯DNA $OD_{260}/OD_{230}>2.0$。$OD_{260}/OD_{230}<2.0$,表明有残存的盐或其他小分子杂质。

5.3.3 RNA纯度

纯RNA的OD_{260}/OD_{280}为2.0,RNA提取溶液的OD_{260}/OD_{280}在1.7～2.0表明RNA纯度基本可以满足后续分子生物学试验处理需要。$OD_{260}/OD_{280}<1.7$时表明有蛋白质或多酚污染;$OD_{260}/OD_{280}>2.0$时表明可能有异硫氰酸残存。纯RNA的$OD_{260}/OD_{230}>2.0$。$OD_{260}/OD_{230}<2.0$,表明有残存的盐或其他小分子杂质。

6 评价方法

6.1 琼脂糖凝胶电泳法评价核酸完整度

6.1.1 仪器和设备

6.1.1.1 水平电泳仪。

6.1.1.2 凝胶成像系统:像素不低于130万。

6.1.1.3 微量移液器:应符合ISO 8655-2:2002的要求。

6.1.2 操作步骤

配制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合;

电泳至合适位置;

用凝胶成像系统观察核酸条带。

6.2 荧光定量法评价核酸提取产量

6.2.1 试剂和溶液

荧光定量试剂盒。

6.2.2 仪器和设备

6.2.2.1 荧光定量仪

灵敏度应达到 10 pg/μL。

6.2.2.2 微量移液器

应符合 ISO 8655-2:2002 的要求。

6.2.3 操作步骤

首先根据样品选择适当的标准物质校准荧光定量仪。标准物质在使用前需要现用现配(稀释),标准物质与荧光染料充分混合后需孵育适当的时间(按仪器使用指南操作)。检测时取待测核酸提取纯化样品与荧光染料混合均匀,室温孵化后检测荧光,回归曲线分析得到检测结果。为保证结果的准确性,每个样品应重复检测三次,从与荧光染料的混合开始。然后根据式(1)计算核酸提取纯化产物产量。

$$Q=\frac{\sum_{i=1}^{n}\rho_i}{n}\times V \qquad \cdots\cdots(1)$$

式中:

Q ——产量,单位为纳克(ng);

ρ_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/μL);

n ——测量重复次数;

V ——核酸溶液的体积,单位为微升(μL)。

6.2.4 经验参考值

对于几种常见的生物样本,合格的核酸提取纯化方法的参考得率(最低标准)为:

起始样品为 100 μL 全血时,提取到的基因组 DNA 产量≥1 μg,总 RNA 产量≥500 ng;

起始样品为 1×10^6 细胞时,提取到的基因组 DNA 产量≥1 μg,总 RNA 产量≥500 ng;

起始样品为 100 mg 新鲜植物叶片时,提取到的基因组 DNA 产量≥1 μg,总 RNA 产量≥500 ng。

6.3 紫外吸光法评价核酸纯度

6.3.1 试剂和溶液

核酸样品溶解液。

6.3.2 仪器和设备

6.3.2.1 紫外分光光度仪:

a) 波长范围:190 nm～1 100 nm;

b) 波长准确度:±0.1 nm;

c) 波长重复性:±0.1 nm。

6.3.2.2　微量移液器：应符合 ISO 8655-2：2002 的要求。

6.3.3　操作步骤

抬起仪器检测臂，加 2 μL 蒸馏水清洁上下基座；吸取 1 μL 核酸样品溶解液作为空白对照，检测空白对照；吸取 1 μL 核酸样品测定样品溶液在 260 nm、280 nm、230 nm 处的吸收值，计算 OD_{260}/OD_{280}、OD_{260}/OD_{230} 的比值。每个样品重复测定 3 次，计算求得平均比值。