



中华人民共和国公共安全行业标准

GA/T 1160—2014

常见毒品原植物的 DNA 提取 二氧化硅法

DNA extraction from drug plants—Silica method

2014-05-09 发布

2014-05-09 实施

中华人民共和国公安部 发布

中华人民共和国公共安全
行 业 标 准
常见毒品原植物的 DNA 提取
二氧化硅法

GA/T 1160—2014

*

中国标准出版社出版发行
北京市朝阳区和平里西街甲 2 号(100029)
北京市西城区三里河北街 16 号(100045)

网址 www.spc.net.cn

总编室:(010)64275323 发行中心:(010)51780235

读者服务部:(010)68523946

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.5 字数 10 千字
2014 年 7 月第一版 2014 年 7 月第一次印刷

*

书号: 155066·2-27209 定价 14.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68510107

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

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这些专利的责任。

本标准由全国刑事技术标准化技术委员会(SAC/TC 179)提出并归口。

本标准起草单位:公安部物证鉴定中心。

本标准主要起草人:裴黎、涂政、彭建雄、季安全、董林芳、徐小玉、张颖、冯涛、郭佳、张贵芹等。

常见毒品原植物的 DNA 提取 二氧化硅法

1 范围

本标准规定了在法庭科学鉴定中采用二氧化硅法从毒品原植物(大麻、罂粟)中提取脱氧核糖核酸(DNA)的方法。

本标准适用于法庭科学鉴定中毒品原植物及其制品的 DNA 提取,也可用于普通植物的 DNA 提取。

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(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 6682—2008 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

二氧化硅法 silica method

一种以二氧化硅为固相吸附剂的基因组 DNA 提取方法。

4 原理

十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)是一种离子型表面活性剂,同时也是蛋白变性剂,能溶解细胞膜和核膜蛋白,使核蛋白解聚。SDS 和蛋白酶 K(PK)共同作用促使蛋白变性、降解,达到裂解植物细胞释放出 DNA 的目的。在 DNA 纯化上,利用在低 pH 值和高浓度离液盐如异硫氰酸胍(GuSCN)存在的条件下,核酸能够与二氧化硅特异性的结合,在较高温度下核酸又能被高 pH 值、低盐浓度溶液从二氧化硅上洗脱下来的特性,获得高质量的植物 DNA。

5 器材

- 5.1 眼科剪。
- 5.2 眼科镊。
- 5.3 旋涡振荡器。
- 5.4 高速离心机(离心力 $\geq 13\,000\,g$)。
- 5.5 离心管。
- 5.6 移液器。
- 5.7 研钵、研杵等组织研磨器具。

5.8 水浴箱、金属加热块等恒温装置。

6 试剂

6.1 裂解液: TNE 缓冲液中加入 SDS 至终浓度 0.5%~2.0% (W/V), pH 值为 8.0。

6.2 二氧化硅悬浮液: 1 mL 水加入 0.06 g 二氧化硅(纯度>99%, 颗粒直径<100 μm)。

6.3 结合液: 将 6.06 g Tris 和 5.84 g EDTA 溶于水中, 使用 1 mol/L HCl 和 1 mol/L NaOH 调节 pH 值为 6.5, 加入 591 g 的 GuSCN 溶于溶液中, 再加入 10 mL Triton-X100, 最终用水定容至 1 000 mL。以上为推荐配制, 其溶液组分的终浓度为 50 mmol/L Tris-HCl, 20 mmol/L EDTA, 5 mol/L GuSCN, 1% (V/V) Triton-X100 溶液, pH 值为 6.5。本方法中 pH 值范围为 4.0<pH<7.0, 使用的 EDTA 若为二钠盐或四钠盐应按分子量再行计算, 除使用异硫氰酸胍(GuSCN)外也可使用盐酸胍、碘化钠和高氯酸钠等其他离液盐, 离液盐的终浓度应在 3 mol/L~8 mol/L 之间。

6.4 洗液 1: 称取 1.46 g NaCl 和 6.06 g Tris 溶于水中, 并用 1 mol/L HCl 和 1 mol/L NaOH 调节 pH 值为 6.4, 再加入 591 g 的 GuSCN 溶于溶液中, 最终用水定容至 1 000 mL。溶液组分的终浓度为 5 mol/L GuSCN, 25 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris-HCl, pH 值为 6.4。

6.5 洗液 2: 称取 7.3 g NaCl 和 1.21 g Tris 溶于水中, 用 1 mol/L HCl 和 1 mol/L NaOH 调节 pH 值为 8.0, 最终用水定容至 1 000 mL。此溶液和无水乙醇按体积比配制为 50%~80% (V/V) 乙醇从而制成洗液 2, 本方法推荐的乙醇浓度为 80%。

6.6 TE 缓冲液: 将 1.21 g Tris 和 0.29 g EDTA 溶于水中, 使用 1 mol/L HCl 和 1 mol/L NaOH 调节 pH 值为 8.0~8.5, 用水定容至 1 000 mL。

6.7 RNase A。

6.8 聚乙烯吡咯烷酮。

6.9 蛋白酶 K。

6.10 二硫苏糖醇(DTT)。

除非另有规定, 本方法使用分析纯及以上级别试剂, 所用水为 GB/T 6682—2008 规定的一级水。

7 操作步骤

7.1 预先在研钵中加入约 20 mg 聚乙烯吡咯烷酮, 取植物样本放入研钵, 研磨成粉末。取 20 mg~100 mg 转移至离心管中。若样本为新鲜叶片或不易研磨的植物组织, 可加入液氮和石英砂进行研磨。对于大麻脂等含脂类高的样本, 应先用无水乙醚进行脱脂 15 min 后再行研磨。

7.2 向离心管中加入 65 °C 预热的裂解液 300 μL, 并加入蛋白酶 K(终浓度>0.2 mg/mL) 和 DTT(终浓度 0.05 mol/L~0.1 mol/L), 振荡混合后置于 65 °C 裂解 0.5 h~2 h, 期间不时振荡。裂解完毕以 12 000g 离心 5 min, 将上清液转移入新的离心管中。

7.3 向装有上清液的离心管中加入 0.1 U/μL RNase A 10 μL, 振荡混合后置于 37 °C 孵育 5 min。

7.4 加入结合液(其量为上述 7.2 中获得上清液体积的 3 倍), 再加入已充分震荡悬浮的二氧化硅悬浮液 20 μL~40 μL, 振荡后放置室温 15 min~30 min, 期间不时振荡。

7.5 将离心管 5 000 g 离心 2 min, 弃上清废液。

7.6 加洗液 1, 并使二氧化硅颗粒充分重悬浮(液体中无明显凝结块), 10 000 g 以上离心 20 s, 弃上清废液。

7.7 加洗液 2, 并使二氧化硅颗粒充分重悬浮(液体中无明显凝结块), 10 000 g 以上离心 20 s, 弃上清废液。重复此步骤再洗涤一次。

7.8 10 000 g 以上离心 20 s, 移去痕量残留液体, 打开离心管盖, 室温下放置 5 min~15 min。

- 7.9 加 30 μL ~100 μL TE 缓冲液,震荡混匀后在 65 $^{\circ}\text{C}$ 温育 5 min~10 min,期间漩涡振荡混匀。
- 7.10 12 000 g 离心 2 min,将上清液转移至新的离心管中。获得的上清液置 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内低温保存备用。

8 注意事项

- 8.1 本标准适用于植株的各个部位,其中以植株的嫩叶和根尖部位最佳。
- 8.2 二氧化硅悬浮液配制时可参照相关文献报道采用静置沉降等方法使二氧化硅颗粒更均匀,具有更好的 DNA 提取效果。
- 8.3 配制好的结合液、洗液 1 及二氧化硅悬浮液应在室温下避光保存。若配制好的结合液、洗液 1 或裂解缓冲液在使用前发现有物质析出,可将其置于 56 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中使析出物溶解后使用。
- 8.4 裂解液的用量可视植物样本的量而定。为提高腐败样品和大麻脂类样品的 DNA 提取量,可适当增加起始样本用量和并延长裂解和吸附步骤的时间。
- 8.5 在操作中弃上清废液时应尽量吸净液体,干燥二氧化硅的时间不应超过 20 min。
- 8.6 不应向含有异硫氰酸胍的溶液中加入酸和漂白剂;在操作含有异硫氰酸胍的溶液时应在通风橱中进行;应把含有异硫氰酸胍的废液弃于 10 mol/L 氢氧化钠中。

参 考 文 献

- [1] Nadin R, Michael H. Ancient DNA extraction from bones and teeth [J]. NATURE PROTOCOLS, 2007, 2(7): 1756-1762.
-



GA/T 1160-2014

版权专有 侵权必究

*

书号: 155066 · 2-27209

定价: 14.00 元