



中华人民共和国国家标准

GB/T 43635—2024

法庭科学 DNA 实验室检验规范

Forensic sciences—Specifications for examination of DNA laboratory

2024-03-15发布

2024-10-01实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 发布

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。

本文件由中华人民共和国公安部提出。

本文件由全国刑事技术标准化技术委员会(SAC/TC179)归口。

本文件起草单位：公安部鉴定中心、国家毒品实验室广东分中心、浙江省公安厅、苏州市公安局、中国政法大学、北京生物医药研究所、最高人民检察院检察技术信息研究中心、中国人民解放军军事科学院军事医学研究院。

本文件主要起草人：叶健、白雪、赵兴春、刘超、吴微微、张广峰、陈静、李民、周如华、陈松、张建、李彩霞、袁丽、戴文申、高冲、王升启。

法庭科学 DNA 实验室检验规范

1 范围

本文件规定了法庭科学领域 DNA实验室检验的基本要求。
本文件适用于法庭科学领域从事法医物证检验的实验室。

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
- GB/T 43633 法庭科学 DNA实验室建设规范
- GA/T 765 人血红蛋白检测 金标试剂条法
- GA/T 766 人精液 PSA检测 金标试剂条法
- GA/T 1163 人类 DNA荧光标记 STR分型结果的分析及应用
- GA/T 1704 法庭科学 DNA实验室质量控制规范
- GA/T 1972 法医物证检验术语

3 术语和定义、缩略语

3.1 术语和定义

GA/T 1972界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1.1

预试验 preliminarytest
筛选可疑体液(斑)的试验。

3.1.2

确证试验 confirmatorytest
检验体液(斑)中特有成分的试验。

3.1.3

聚合酶链式反应 polymerasechain reaction;PCR
一个酶促的特定 DNA 片段体外扩增过程。

3.1.4

线粒体 DNA mitochondrialDNA;mtDNA
存在于人类细胞的线粒体中的闭环双链 DNA。

注:人类线粒体 DNA 约 16.5 Kb;不遵循孟德尔遗传定律,表现为母系遗传,通过卵细胞将其中的遗传信息传递给后代;无有丝分裂和减数分裂的周期变化;遗传物质位于细胞器内,不受核移植的影响;单个细胞中 mtDNA拷

页数多 ;存在异质性现象。

3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

- CTAB: 十六烷基三甲基溴化胺 (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)
- SDS: 十二烷基磺酸钠 (Sodium DodecylSulfate)
- STR: 短串联重复序列 (ShortTandem Repeats)
- TRIS- HCl: 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐 (TRIS Hydrochloride)
- RNA: 核糖核酸 (Ribonucleic Acid)

4 总体要求

- 4.1 实验室人员、环境、方法、设备和试剂均应符合 GB/T 43633(法庭科学 DNA 实验室建设规范) 的要求。
- 4.2 法医生物检材、样本的受理、流转、保管、处置均应符合 GB/T 43633(法庭科学 DNA 实验室建设规范)的要求。
- 4.3 实验室应进行内部和外部质量控制以确保结果的有效性 ,质量控制应符合 GA/T 1704 中相关的结构要求、资源要求、过程要求和管理要求。
- 4.4 检验过程中应有效防止 DNA污染 ,包括 :防止 DNA提取和 PCR反应时发生的检材/样本间的交叉污染 ;防止外界环境和人员的污染。过程中涉及的 DNA 检验用产品具体要求可参照 GB/T 41844 执行。
- 4.5 检验过程中应采取安全有效的防护措施保护检验人员 ,并应做好危害性废弃物的管理。
- 4.6 检验过程中所使用的水均应为符合 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。

5 检验流程

- 5.1 检验流程一般包括预试验、确证试验、DNA 提取与纯化、DNA 定量、人类 DNA 性别及 STR 多态性分析等 ,应根据不同的检材/样本类型和委托目的选择所需的检验流程。
- 5.2 DNA提取可采用全自动提取工作站 ,具体步骤应参照工作站的操作说明书进行。PCR 扩增采用商品化试剂盒的 ,应按相应的试剂盒操作 ,使用前应验收。

6 预试验

6.1 血痕预试验

6.1.1 四甲基联苯胺试验

6.1.1.1 试剂

试剂配方见附录 A 的 A.1。

6.1.1.2 方法

取滤纸轻轻擦拭斑迹,按顺序滴加冰醋酸、四甲基联苯胺无水乙醇饱和液、3%过氧化氢溶液,立即出现翠蓝色为阳性反应。

6.1.2 鲁米诺试验

6.1.2.1 试剂

主要试剂包括:

- a) 鲁米诺粉末;
- b) 过氧化钠粉末。

6.1.2.2 方法

将鲁米诺粉末 0.1 g溶于 100 mL纯水,然后加入过氧化钠粉末 0.5 g混匀,喷洒斑迹,立即出现蓝色荧光为阳性反应。

6.2 其他预试验

参照试剂盒说明书操作。

7 确证试验

7.1 人血液(斑)确证试验

按照 GA/T 765进行试验。

7.2 人精液(斑)确证试验

7.2.1 精子检出法

7.2.1.1 酸性品红美蓝染色法(Baecchi染色法)

7.2.1.1.1 试剂

主要试剂包括:

- a) 1%酸性品红溶液(用 1%盐酸配制);
- b) 1%亚甲蓝溶液;
- c) 1%盐酸;
- d) 二甲苯。

7.2.1.1.2 方法

取少量可疑斑迹用适量生理盐水浸泡后,离心取沉渣涂于载玻片上,干燥后分别用 1%酸性品红溶液染色 2 min~ 3 min后去除染液,滴加 1%亚甲蓝溶液染色 2 min~ 3 min后去除染液,1%盐酸漂洗,干燥后二甲苯透明,镜检。精子头部被染成红色、尾部被染成蓝色。

7.2.1.2 苏木素伊红染色法(H.E 染色法)

7.2.1.2.1 试剂

主要试剂如下。

- a) 苏木素溶液:苏木素 0.9 g溶于 10 mL无水乙醇;明矾(硫酸铝钾)或硫酸铝铵 20 g,加蒸馏水 200 mL加热溶解。上述 2种溶液混合加热煮沸后,徐徐加入氯化汞 0.5 g,再加热煮沸后快速冷却。使用时每 100 mL加入冰醋酸 4 mL。
- b) 伊红溶液:伊红 0.5 g溶于 80%乙醇 100 mL 中。
- c) 分化液:在 80%乙醇中加入盐酸,配制成 0.5%~1%的盐酸酒精溶液。
- d) 二甲苯。

7.2.1.2.2 方法

取少量可疑斑迹用适量生理盐水浸泡后,离心取沉渣涂于载玻片上,干燥后用苏木素溶液浸染 5 min~10 min,清水漂洗;滴加分化液分化 5 s~10 s;水洗后再用伊红溶液浸染 2 min~3 min,清水漂洗,干燥后二甲苯透明,镜检。精子头部被染成红色、尾部被染成蓝色。

7.2.2 人精液 PSA检测金标试剂条法

按照 GA/T 766进行试验。

7.3 其他确证试验

参照试剂说明书操作。

8 DNA提取与纯化

8.1 DNA提取与纯化可使用包括但不限于下列方法(具体操作方法见附录 B):

- a) 有机溶剂法:通过酚-氯仿混合液去除蛋白质类有机物质,保留 DNA 于水相溶液中;
- b) Chelex(聚苯乙烯二乙烯基苯树脂)法:通过 Chelex螯合镁、钙离子等,使降解 DNA 的核酸酶失去活性;
- c) 硅珠法:在高浓度的硫氰酸胍存在的条件下,通过二氧化硅微粒特异捕获 DNA;
- d) 磁珠法:在胍盐存在条件下,利用可吸附 DNA 的硅材料包被磁性颗粒,特异性吸附 DNA;
- e) CTAB法:通过非离子型去污剂 CTAB破坏细胞壁和细胞膜及硬组织,并与 DNA 形成复合物,分离 DNA与蛋白质及多糖类物质;
- f) 硅胶膜吸附法:通过硅胶膜吸附细胞裂解液裂解后释放出 DNA,并经蛋白酶消化、漂洗液清洗除去蛋白质、脂质以及多糖等杂质。

8.2 当使用其他商品化产品的核酸提取和纯化方法,以及自行开发的核酸提取和纯化方法时,应按照 GB/T 27025要求进行方法确认。

8.3 8.1 和 8.2 的 DNA提取与纯化方法适用于人源性和非人源性生物检材和样本,RNA 的提取和纯化可参照执行。

9 DNA定量

9.1 实时荧光定量 PCR方法

- 9.1.1 利用一系列已知浓度的 DNA样品制备标准曲线。
- 9.1.2 配制待测样品反应体系。
- 9.1.3 在实时荧光定量 PCR仪中进行检测试验。
- 9.1.4 分析试验结果,通过样品的阈值循环数(Ct值)和标准曲线计算得出待测样品的浓度。

9.2 其他定量方法

参照仪器说明书操作。

10 人类 DNA性别及 STR 多态性分析

10.1 器材和试剂

主要器材和试剂包括：

- a) 毛细管电泳遗传分析仪及配套试剂；
- b) 扩增仪；
- c) 移液器；
- d) 人类 DNA性别及 STR复合扩增试剂盒。

10.2 方法

10.2.1 样品准备

设置阳性对照和阴性对照。

10.2.2 PCR扩增

10.2.2.1 DNA 扩增

以提取 DNA为模板的扩增反应体系及循环参数,参照试剂盒说明书操作,如有变更应进行方法确认。

10.2.2.2 直接扩增

需要直接扩增的检材或样本,参照试剂盒说明书操作。

10.2.3 PCR反应产物的荧光检测

使用毛细管电泳遗传分析仪进行检测,PCR产物的电泳分离与荧光检测参照试剂盒说明书操作。

10.2.4 结果分析

按照 GA/T 1163进行结果分析。

11 人类线粒体 DNA测序

11.1 器材及试剂

主要器材和试剂包括：

- a) 毛细管电泳遗传分析仪及配套试剂；
- b) 扩增仪；
- c) 移液器；
- d) PCR试剂：引物(D-Loop高变区 I 或高变区 II) L1、H1、L2、H2(L2、H2 的碱基序列范围比 L1、H1小,并包含在 L1、H1的范围内)、dNTP、Taq酶、PCR缓冲液；
- e) PCR产物纯化试剂盒；
- f) 测序试剂盒。

11.2 方法

11.2.1 样本 DNA 的扩增

11.2.1.1 第一步扩增时,采用 25μL体系,取适量模板 DNA,加入 dNTP、引物 L1和 H1、PCR缓冲液、Taq酶(DNA聚合酶),离心后进行 PCR反应(反应参数根据具体引物的长度设定)。

11.2.1.2 第二步扩增时,采用 50 μL体系,取少量第一步扩增产物,加入 dNTP、引物 L2和 H2、PCR缓冲液、Taq酶,离心后进行 PCR反应(反应参数根据具体引物的长度设定)。

11.2.1.3 骨骼、毛干的测序从第一步开始,血液等富含 DNA检材的测序从第二步开始。

11.2.2 扩增产物的纯化

参照试剂盒说明书操作。

11.2.3 测序反应

以引物 L2和 H2作为测序引物,参照试剂盒说明书操作。

11.2.4 荧光测序

使用毛细管电泳遗传分析仪进行测序,参照仪器说明书操作。

11.3 结果分析

11.3.1 电泳结果分析

运用分析软件进行自动分析,以修订的 Anderson线粒体 DNA 序列为标准序列,测得样本的碱基序列与其比对,得到该样本线粒体 DNA高变区段碱基序列的特征,结合电泳图谱复核结果。

11.3.2 遗传学分析

线粒体 DNA 的非编码区 D环(D-loop) 碱基序列为单倍型,进行遗传学数量分析时应依照单倍型基因频率统计,按照公式(1)和公式(2)进行计算。人类线粒体 DNA 的 D-loop含有变异率较高的高变区(High Variable Regions, HVR),本文件针对该区域进行测序。其他的 DNA测序可参照执行。

$$P = \sum X^2 \dots\dots\dots (1)$$

式中：

P —群体中任意两个体线粒体 DNA多态区序列相同的可能性；

X —线粒体 DNA单倍型在群体中的频率。

$$h = (1 - \sum X^2)n / (n - 1) \dots\dots\dots (2)$$

式中：

h —单倍型多样性；

X —线粒体 DNA单倍型在群体中的频率；

n —检测的样品数量。

12 使用其他商品化检测试剂盒的检验

参照试剂盒说明书操作。

13 全自动 DNA检测方法

DNA提取与纯化、定量、扩增和检测等全流程自动化操作参照设备和试剂说明书。
按照 GB/T 27025要求进行方法确认。

14 检验记录与结果报告

实验室应准确、清晰、完整地记录试验流程和结果,并依据检验结果出具鉴定文书。

附 录 A
(资料性)
常用试剂推荐配方

A.1 四甲基联苯胺试剂

四甲基联苯胺试剂主要包括：

- a) 四甲基联苯胺无水乙醇饱和液(50mL)加冰醋酸 5滴 ~ 6滴；
- b) 3%过氧化氢(30%过氧化氢 1 mL加纯水 9 mL)。

A.2 EDTA 提取液(pH 8.0)

EDTA提取液主要包括：

- a) 75 mmol/L NaCl；
 - b) 24 mmol/L EDTA。
- 用 NaOH 颗粒调整 pH 8.0。

A.3 TNE缓冲液

TNE缓冲液主要包括：

- a) 10 mmol/L TRIS-HCl(pH 8.0)；
- b) 1 mmol/L EDTA提取液(pH 8.0)；
- c) 100 mmol/L NaCl。

A.4 TE 缓冲液

TE缓冲液主要包括：

- a) 10 mmol/L TRIS-HCl(pH 8.0)；
- b) 1 mmol/L EDTA提取液(pH 8.0)。

A.5 5×精子提取液

5×精子提取液主要包括：

- a) 50 mmol/L TRIS-HCl；
- b) 50 mmol/L EDTA提取液(pH 8.0)；
- c) 500 mmol/L NaCl；
- d) 10% SDS溶液；
- e) 0.5 mol/L DTT。

A.6 硅珠法吸附液

硅珠法吸附液主要包括：

- a) 12g 硫氰酸胍 10 mL 0.1 mol/L；
- b) TRIS-HCl(pH 6.4)；
- c) 0.8 mL 0.5 mol/L EDTA提取液(pH 8.0)；
- d) 0.5 mL Triton X-100(聚乙二醇辛基苯基醚)。

A.7 硅珠法漂洗液

硅珠法漂洗液主要包括：

- a) 12 g 硫氰酸胍 10 mL 0.1 mol/L;
- b) TRIS-HCl(pH 6.4)。

A.8 硅珠悬液

硅珠悬液主要包括：

- a) 0.06g 二氧化硅；
- b) 1 mL 纯水。

A.9 CTAB提取缓冲液

CTAB提取缓冲液主要包括：

- a) 20 g CTAB 1 mol/L TRIS-HCl(pH 8.0) 100 mL;
- b) 0.5 mol/L EDTA 提取液(pH 8.0) 40 mL;
- c) NaCl 81.82 g。

定容至 1 L, 使用前加入 4 mL 2-巯基乙醇。

附 录 B
(资料性)
DNA 的提取和纯化方法

B.1 有机溶剂法

B.1.1 器材和试剂

主要器材和试剂包括：

- a) 高速离心机；
- b) 恒温仪；
- c) 移液器；
- d) EDTA提取液(pH 8.0)；
- e) TNE缓冲液；
- f) TE缓冲液；
- g) 5×精子提取液；
- h) SDS；
- i) DDT；
- j) 重蒸饱和酚,酚-氯仿混合液(酚、氯仿和异丙醇的体积比为 25:24:1)；
- k) 无水乙醇和 70%乙醇；
- l) NaCl或 NaAc；
- m) 蛋白酶 K；
- n) 纯化试剂盒；
- o) 纯水。

B.1.2 方法

B.1.2.1 血液

B.1.2.1.1 取适量血液加入等体积 EDTA提取液(pH 8.0),混匀至透明。

B.1.2.1.2 离心后去上清液,沉淀中加入 EDTA提取液(pH 8.0)匀浆。

B.1.2.1.3 加入 SDS和蛋白酶 K,37℃消化 4 h 以上。

B.1.2.1.4 加入等体积的重蒸饱和酚,酚-氯仿混合液各提取一次后,加 1/10体积的 NaCl或 NaAc溶液和 2.5倍体积的冷无水乙醇混匀,得到团状的 DNA沉淀。

B.1.2.1.5 离心去上清液,沉淀中加入冷 70%乙醇混匀。

B.1.2.1.6 离心去上清液,晾干后加入 TE缓冲液或纯水备用。

B.1.2.2 混合斑

B.1.2.2.1 剪碎带有精子的检材,加入适量 TNE缓冲液,37℃保温 0.5 h~1 h,加入 SDS和蛋白酶 K,37℃保温 2 h消化女性上皮细胞。

B.1.2.2.2 底部带孔离心管离心分离去除载体,并去除上清液,沉淀物用 TNE缓冲液洗涤离心数次。

B.1.2.2.3 沉淀物内加入 5×精子提取液、蛋白酶 K,置 37℃消化 3 h~4 h。

B.1.2.2.4 后续操作同 B.1.2.1.4~B.1.2.1.6。

B.1.2.3 组织

B.1.2.3.1 取少量组织(脑、肌肉等)加入适量 EDTA提取液(pH 8.0)进行匀浆。

B.1.2.3.2 加入 SDS和蛋白酶 K,37 °C消化 4 h~6 h。

B.1.2.3.3 后续操作同 B.1.2.1.4~B.1.2.1.6。

B.1.2.4 毛干

B.1.2.4.1 将毛干剪成 3 mm~5 mm 长,无水乙醇、纯水、无水乙醇各冲洗一次,晾干后加入 DTT、SDS、蛋白酶 K、EDTA提取液(pH 8.0),37 °C消化至完全溶解。

B.1.2.4.2 加入等体积的重蒸饱和酚,酚-氯仿混合液各抽提一次,加入 1/10体积的 NaCl或 NaAc溶液和 2.5倍无水乙醇,混合后 -20 °C冷冻 1 h 以上。

B.1.2.4.3 离心去上清液,沉淀中加入冷 70%乙醇混匀。

B.1.2.4.4 离心去上清液,晾干后加入 TE缓冲液或纯水备用。

B.1.2.5 骨和牙齿

B.1.2.5.1 以手术刀刮净骨骼和牙齿表面垢物,用温热纯水冲洗两次,紫外光照射 1 h。再用锤子将牙齿砸成粉末和用电钻取骨密质和骨松质,并将其用研磨器进一步磨碎。

B.1.2.5.2 取适量骨或牙齿粉末,加入 EDTA提取液(pH 8.0)、蛋白酶 K,于 37 °C消化过夜。

B.1.2.5.3 加入等体积的重蒸饱和酚,酚-氯仿混合液各抽提一次,提取液使用纯化试剂盒纯化浓缩后,加 1/10体积的 NaCl和 2.5倍体积无水乙醇,混合后 -20 °C冰箱过夜。

B.1.2.5.4 离心去上清液,晾干加入 TE缓冲液或纯水溶解,必要时用纯化试剂盒纯化后备用,参照试剂盒说明书操作。

B.2 Chelex法

B.2.1 器材和试剂

主要器材和试剂包括:

- a) 高速离心机;
- b) 恒温仪;
- c) 移液器;
- d) Chelex-100;
- e) TNE 缓冲液;
- f) 蛋白酶 K;
- g) SDS;
- h) DTT;
- i) 纯水。

B.2.2 方法

B.2.2.1 血液和血痕

B.2.2.1.1 取少量血液或血痕加入适量纯水,室温 30 min以上,必要时置 37 °C浸泡。

B.2.2.1.2 离心后去上清液,沉淀中加入 Chelex-100,酌情可加入适量蛋白酶 K,56 °C消化 30 min~

4 h。

B.2.2.1.3 95 °C保温 8 min以上,离心后置 4 °C冰箱内低温保存备用。

B.2.2.2 混合斑

B.2.2.2.1 剪碎带有精子的检材,加入适量 TNE缓冲液,37 °C保温 0.5 h~1 h,加入 SDS和蛋白酶 K,37 °C保温 2 h左右消化女性上皮细胞。

B.2.2.2.2 底部带孔离心管离心分离去除载体,并去除上清液,沉淀物用 TNE离心洗涤数次。

B.2.2.2.3 沉淀物内加入 Chelex-100溶液、蛋白酶 K 和 DTT溶液,置 56 °C消化 2 h左右。

B.2.2.2.4 95 °C保温 8 min以上,离心后置 4 °C冰箱内低温保存备用。

B.2.2.3 组织和脱落细胞

B.2.2.3.1 取少量组织(脑、肌肉等)加入适量纯水清洗后去上清进行匀浆。

B.2.2.3.2 匀浆后的组织或脱落细胞载体加入 Chelex-100、蛋白酶 K,56 °C消化 2 h~3 h。

B.2.2.3.3 95 °C保温 8 min以上,离心后置 4 °C冰箱内低温保存备用。

B.2.2.4 唾液斑

B.2.2.4.1 将附着唾液斑的载体转移到离心管中,然后加入 Chelex-100、蛋白酶 K,56 °C消化 1.5 h 以上。

B.2.2.4.2 95 °C保温 8 min以上,离心后置 4 °C冰箱内低温保存备用。

B.2.2.5 毛发

B.2.2.5.1 剪取带毛根的毛发 5 mm~10 mm,或剪取 3 mm~5 mm 的毛干,无水乙醇、水、无水乙醇各冲洗一次,晾干后加入 Chelex-100、蛋白酶 K、DTT,56 °C消化至完全溶解。

B.2.2.5.2 95 °C保温 8 min以上,离心后置 4 °C冰箱内低温保存备用。

B.2.2.6 骨和牙齿

B.2.2.6.1 取研碎的牙髓或骨髓,加入 Chelex-100、蛋白酶 K溶液,56 °C消化过夜。

B.2.2.6.2 95 °C保温 8 min以上,离心后置 4 °C冰箱内低温保存备用。

B.3 硅珠法

B.3.1 器材和试剂

主要器材和试剂包括:

- a) 高速离心机;
- b) 恒温仪;
- c) 移液器;
- d) 吸附液;
- e) 漂洗液;
- f) 硅珠悬液;
- g) TNE缓冲液;
- h) SDS;
- i) DTT;

- j) 蛋白酶 K;
- k) 无水乙醇和 70%乙醇;
- l) TE缓冲液;
- m) 纯水。

B.3.2 方法

- B.3.2.1 取适量检材,加入 TNE缓冲液、SDS、蛋白酶 K 和 DTT,56℃消化 2 h 以上。
- B.3.2.2 必要时去除载体,加入 3倍体积的吸附液、硅珠悬液,混合后室温 15 min左右。
- B.3.2.3 离心去上清液,加入漂洗液,混合。
- B.3.2.4 离心去上清液,加入冷 70%乙醇,混合。
- B.3.2.5 离心去上清液,置 56℃晾干,加入 TE缓冲液或纯水,56℃保温 15 min左右。
- B.3.2.6 离心后置 4℃冰箱内保存备用。
- B.3.2.7 各类检材可根据检材性质选用 B.3.2.1~B.3.2.6硅珠法的提取、纯化步骤。

B.4 磁珠法

B.4.1 器材和试剂

主要器材和试剂包括:

- a) 磁力架;
- b) 旋涡振荡器;
- c) 恒温仪;
- d) 移液器;
- e) 磁珠试剂盒;
- f) 纯水。

B.4.2 方法

- B.4.2.1 取适量检材,加入适量裂解液 95℃~100℃、30 min以上。
- B.4.2.2 必要时去除载体,加入磁珠液,混合,室温 5 min左右。
- B.4.2.3 旋涡振荡后置磁力架上,去液体。
- B.4.2.4 加入已含 DTT 的裂解液洗涤后置磁力架上,去液体,重复 3次左右。
- B.4.2.5 室温下空气干燥 5 min~10 min,加入适量洗脱液,65℃保温 5 min左右。
- B.4.2.6 混合后置磁力架,将 DNA溶液吸出置于 4℃冰箱内保存备用。
- B.4.2.7 各类检材可根据检材性质选用 B.4.2.1~B.4.2.6磁珠法的提取、纯化步骤。

B.5 CTAB法

B.5.1 器材和试剂

主要器材和试剂包括:

- a) 高速离心机;
- b) 恒温仪;
- c) 移液器;
- d) CTAB提取缓冲液;
- e) EDTA提取液(pH 8.0);

- f) 重蒸饱和酚,酚-氯仿混合液(酚、氯仿和异丙醇的体积比为 25 : 24 : 1) ;
- g) 纯化试剂盒 ;
- h) 纯水。

B.5.2 方法

B.5.2.1 取适量骨或牙齿粉末(见有机溶剂提取法),加入 EDTA提取液(pH 8.0)溶液,室温过夜后去除 EDTA提取液(pH 8.0)溶液。

B.5.2.2 加入 CTAB提取缓冲液,蛋白酶 K,56 °C保温过夜,离心后保留上清液,加入等体积的重蒸饱和酚,酚-氯仿混合液各抽提一次,离心后保留上清液。

B.5.2.3 上清液使用纯化试剂盒进行纯化浓缩。

B.5.2.4 必要时浓缩液再进行纯化,参照试剂盒说明书操作。

B.6 硅胶膜吸附法

B.6.1 器材和试剂

主要器材和试剂包括:

- a) 高速离心机;
- b) 恒温仪;
- c) 移液器;
- d) 硅胶膜试剂盒;
- e) 无水乙醇;
- f) 纯水。

B.6.2 方法

B.6.2.1 取适量检材,加入适量裂解液 85 °C、10 min以上。

B.6.2.2 加蛋白酶 K,混合,56 °C保温 1 h 以上。

B.6.2.3 过硅胶膜柱纯化。

B.6.2.4 加纯水洗脱,洗脱液备用。

参 考 文 献

- [1] GB/T 41844 DNA检验用产品源性污染防控规范
-