|  |  |
| --- | --- |
| ICS | 65.020.20 |
| CCS | B 62 |

|  |
| --- |
| 3211 |

镇江市地方标准

DB3211/T  —2025

 DNA带硅珠直扩自动化提取技术规范

 Technical specifications of DNA extraction on automatic equipment for amplification with silica bead

2025-  -  发布

2025-  -  实施

镇江市市场监督管理局  发布

1. 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这些专利的责任。

本文件由镇江市公安局归口。

本文件由镇江市公安局刑事科学技术研究所提出。

本文件由镇江市公安局刑事科学技术研究所起草。

本文件主要起草人：郦旭东、王禹、王卫东、毛坤云、纪天元、仲博、郝兴龙、陈嘉佳。

 DNA带硅珠直扩自动化提取技术规范

* 1. 范围

本文件规定了采用带硅珠扩增法的DNA自动化提取技术规范。

本文件适用于法庭科学DNA检验鉴定领域。

* 1. 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/T43633 法庭科学DNA实验室建设规范

GB/T43635 法庭科学DNA实验室检验规范

GB/T27025 检测和校准实验室能力的通用要求

* 1. 术语和定义

硅珠：二氧化硅微粒，在高浓度的硫氰酸胍存在时，能特异性的吸附DNA。

带硅珠直扩：在进行聚合酶链式反应（PCR扩增）时，将扩增预混液与已提纯干燥的带模板硅珠混合，模板直接释放到扩增预混液中反应。

* 1. 自动化设备的功能和参数
1. 高精度机械臂，三轴移动精度应达到1mm；
2. 高精度移液器，移液精度达到0.2μL；
3. 平板离心机；
4. 24孔板金属浴和震荡混匀装置，温度范围30℃~100℃；
5. 96孔板金属浴和震荡混匀装置，温度范围30℃~100℃；
6. 空气循环装置，设备内部空间保持负压和空气单向循环；
7. 紫外线消毒灯，照射设备内部空间全部表面，灭活DNA；
8. 录音录像设备，全程记录实验过程。
	1. 环境控制

5.1 实验室内温度、湿度和洁净度要满足设备正常运行的需要，配备必要的温度、湿度控制设备以及安全设施。

5.2 实验室的光线、电源、水源、消防、防污、防尘、防震、电磁屏蔽、接地电阻、生物安全、装饰装修等应符合仪器设备和检验的要求。

5.3 为防止气溶胶的污染，实验室应定期通风和消毒。对于设置有通排风系统的实验室，各区域应独立送、排风，以避免交叉污染。

5.4 实验室应有明确的区域标记，避免不同工作区域内的设备、物品混用。检验鉴定流程应单项流动，必要时实现人员的单向流动。

5.5 实验室应设有限制进入的标识和相应措施，防止未授权者访问。

5.6实验室应制定废弃样品和有害废弃物处置的程序。

* 1. 实验器材和方法
		1. 主要器材和试剂
1. 自动化提取设备；
2. 吸附液；
3. 漂洗液；
4. 硅珠悬液；
5. TNE缓冲液
6. SDS；
7. DTT；
8. 蛋白酶K；
9. 无水乙醇和70%乙醇；
10. TE缓冲液；
11. 纯水。
	* 1. 方法

6.2.1 将物证上的DNA通过擦取、粘取、吸取、剪切、刮取等方法分离出来，取适量，加入自动化设备的提取装置中；

6.2.2 加入TNE缓冲液、SDS、蛋白酶K和DTT，56℃消化2h以上；

6.2.3 离心，去除载体，在上清中加入3倍体积的吸附液、硅珠悬液，混合后置室温15min；

6.2.4 离心去上清，加入漂洗液，混合；

6.2.5 离心去上清，加入冷70%乙醇，混合；

6.2.6 离心去上清，置56℃晾干，后置4℃冰箱内保存备用；

6.2.7 将配置好的扩增预混液与干燥硅珠混匀后进行扩增；

6.2.8 提取流程应至少包含阴性对照和阳性对照各1个；

6.2.9 若采用商品化成品试剂，应参照设备和试剂使用说明书，并按照GB/T 27025的要求进行方法确认。

* 1. 质量控制
		1. 防污染原则

为确保检验结果的正确性，需要避免DNA污染的发生。

7.1.1 应在每次实验后，使用DNA去除剂清洁设备内部台面，并打开紫外灯照射15min以上；

7.1.2 定期对自动化设备内部表面进行DNA抽样扩增，特别是移液器运动区域下方和震荡混匀装置附近，一旦发现污染，应停止实验，反查原因；

7.1.3 检查每次实验室的阴阳性对照，一旦发现污染，应停止实验，反查原因；

7.1.4 定期更换空气过滤装置，防止气溶胶污染；

7.1.5 定期观察移液器移液过程，特别是转移吸附液和漂洗时枪头有无气泡产生，如有气泡应及时调整移液体积；

* + 1. 回收率监控

 为确保达到足够的检出率，需要建立可靠的提取回收率监控机制，一般回收率需达到80%以上。

7.2.1 每次实验时加入已知量的DNA模板作为阳性对照，经过全部提取流程后再对硅珠中的DNA进行定量，可直接测得回收率；

7.2.2 对于没有定量设备的实验室，可将7.2.1中获的阳性对照的扩增电泳图谱，与初始量相同且未经提取直接扩增的阳性对照的电泳图谱相比较，前者相对荧光强度应达到后者的50%以上；

7.2.3 对于100pgDNA模板，经过自动化设备提取全部流程以及后续扩增电泳，应检出90%上的等位基因；

7.2.4 当发现回收率不足时，应暂时停用并检修调试自动化设备。

附录 A

（资料性）

常见试剂推荐配方

A.1 EDTA提取液（pH 8.0）

 EDTA提取液主要包括：

1. 75 mmol/L NaCl；
2. 24 mmol/L EDTA。

用NaOH颗粒调整pH 8.0

A.2 TNE缓冲液

 TNE缓冲液主要包括：

1. 10 mmol/L TRIS-HCl(pH 8.0)；
2. 1 mmol/L EDTA提取液(pH 8.0)；
3. 100 mmol/L NaCl。

A.3 TE缓冲液

 TE缓冲液主要包括：

1. 10 mmol/L TRIS-HCl(pH 8.0)；
2. 1 mmol/L EDTA提取液(pH 8.0)。

A.4 硅珠吸附液

 硅珠吸附液主要包括：

1. 12硫氰酸胍 10mL 0.1 mol/L；
2. TRIS-HCl(pH 6.4)；
3. 0.8 mL 0.5 mol/L EDTA提取液(pH 8.0)；
4. 0.5 mL Triton X-100(聚乙二醇辛基苯基醚)。

A.5 硅珠法漂洗液

 硅珠法漂洗液主要包括：

1. 12硫氰酸胍 10mL 0.1 mol/L；
2. TRIS-HCl(pH 6.4)。

A.6 硅珠悬液

 硅珠悬液主要包括：

1. 0.06g 二氧化硅
2. 1mL 纯水。