



中华人民共和国国家标准

GB/T 40171—2021

磁珠法 DNA 提取纯化试剂盒检测通则

General rules for determination of magnetic bead DNA extraction and
purification kit

2021-05-21 发布

2021-12-01 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。

本文件由全国生化检测标准化技术委员会(SAC/TC 387)提出并归口。

本文件起草单位：中国测试技术研究院生物研究所、苏州白垩纪生物科技有限公司、成都海关技术中心、深圳华大智造科技股份有限公司、深圳市计量质量检测研究院、圣湘生物科技股份有限公司、迈克生物股份有限公司、四川大学、北京市理化分析测试中心、湖南圣维基因科技有限公司、苏州新波生物技术有限公司。

本文件主要起草人：周李华、马丽侠、林华、李怀平、蒋子敬、林霖、王逸丛、叶德萍、邓中平、龙腾镶、姜展樾、谢礼、曲峰、蒋慧、杨国武、龚华斐、安徽、郭刚、张婧、戴立忠、杜美红。

磁珠法 DNA 提取纯化试剂盒检测通则

1 范围

本文件规定了磁珠法 DNA 提取纯化试剂盒检测通则,描述了检测原理、检测前准备,以及对磁珠法 DNA 提取纯化试剂盒磁力学性质、DNA 提取纯化、DNA 浓度和纯度、DNA 得量、DNA 完整性、磁珠吸附率、提取回收率、精密度的检测方法以及检测报告。

本文件适用于植物组织,动物组织,血液、血斑、血凝块、血浆等,唾液、精液、尿液、粪便等分泌物,细菌、病毒、真菌等生物样本中的磁珠法 DNA 提取试剂盒的测定。

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 5009.268 食品安全国家标准 食品中多元素的测定
- GB/T 19077 粒度分析 激光衍射法
- GB/T 21649.1 粒度分析 图像分析法 第 1 部分:静态图像分析法
- GB/T 29022 粒度分析 动态光散射法(DLS)
- GB/T 34794 琼脂糖凝胶回收试剂盒测定通则
- GB/T 34796 水溶液中核酸的浓度和纯度检测 紫外分光光度法
- SN/T 2775 商品化食品检测试剂盒评价方法

3 术语和定义

GB/T 34794 和 GB/T 34796 界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

磁珠 magnetic beads

一种表面经过了功能化修饰,包被有生物活性基团的功能化载体,在磁场中能够迅速聚集,离开磁场后又能快速分散,实现在不同条件下与核酸分子特异性高效结合和解离的具有超顺磁性的一种磁性纳米级或者微米级球状或无定形颗粒物。

注 1: 其表面修饰有丰富的活性基团,可以与核酸分子在一定的缓冲条件下进行可逆地结合。

注 2: 与传统的分离方法相比,磁珠用于生化样品复杂组分的分离,能够实现分离和富集同时进行,有效地提高了分离速度和富集效率,同时也使分析检测的灵敏度大大提升。

注 3: 本文件中磁珠指生物分离磁珠。这类磁珠具有超顺磁性,可分散于基液中形成磁性液体材料,生物活性基团可以与多种生物活性物质发生偶联,兼具有液体的流动性和固体磁性颗粒材料的双重特点,具有确定的粒径范围,有确定的表面特性,包括比表面积、表面修饰等。

3.2

磁珠吸附率 adsorption rate of magnetic beads

一定条件下,磁珠吸附到的核酸占总核酸量的比例。

3.3

磁响应时间 magnetic response time

DNA 提取磁珠放置于磁力架或用磁棒磁吸附后,完全磁分离的时间。

3.4

样本提取回收率 recovery rate for sample extraction

样本提取 DNA 的量与样品中实际 DNA 量的比值。

3.5

得量 yield

从单位质量样本中提取所得的 DNA 的量。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

cfDNA:循环游离 DNA(circulating cell-free DNA)

ctDNA:循环肿瘤 DNA(circulating tumor DNA)

DNA:脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid)

OD:光密度(optical density)

PCR:聚合酶链式反应(polymerase chain reaction)

5 原理

运用纳米技术对超顺磁性纳米颗粒的表面用氧化硅、羧基基团、羟基基团、多聚胸腺嘧啶重复寡核苷酸[Oligo(dT)]等修饰后,制备成为功能性超顺磁性纳米磁珠。利用纳米磁珠的超顺磁性,在离液盐(盐酸胍、异硫氰酸胍等)和外加磁场的的作用下,从生物样本中有效结合 DNA,在低盐或者水溶液状态下与磁珠结合的 DNA 被可逆地洗脱下来,实现核酸的提取纯化的目的。

6 检测前准备

6.1 样品数量

采用至少 3 个不同批次的试剂盒,每一批次的试剂盒分别对 20 份待测样品、20 份加标样品进行提取纯化。加标样品的加标浓度在试剂盒提供的浓度范围。同时采用参考方法进行检测。结果表示按照 SN/T 2775 的规定执行。

6.2 提取样品的选择

用于试剂盒提取回收率检测的生物样品建议选择参考样品。加标测试可选用在售的有证标准物质或参考样品,亦可采用已知提取效率的等效样品。检测时,根据不同试剂盒适用的样本类型采用不同的标准物质或参考样品进行检测。

注:本文件涉及的参考样品指经过严格的研制流程,具有确定的一个或多个足够均匀的特性值的材料,如动物组织冻干粉,植物叶片、种子的冻干粉,参考血样,假病毒等样本。

6.3 试剂盒外观

试剂盒外包装应无破损,标识清晰。试剂盒应附说明书,根据说明书检查,内容物应齐全;磁珠悬浮液为黑色、棕色或者棕黄色悬浊液,其他组分应符合说明书描述。

6.4 试剂盒装量

试剂的装量应不少于试剂盒说明书要求的量。

7 检测方法

7.1 试样预处理

按照试剂盒说明书的要求执行。

7.2 磁力学性质

试剂盒说明书给出了磁珠磁力学性质指标的,按照附录 A 进行测定。

7.3 磁珠法 DNA 提取纯化

根据磁珠法 DNA 提取纯化试剂盒说明书进行。

7.4 DNA 浓度和纯度检测

7.4.1 紫外吸收法(大量 DNA 检测)

针对从动物组织、植物组织、血液、血斑、血凝块、唾液、口腔拭子、尿液、细菌等生物样本中提取的 DNA 的浓度和纯度检测方法,按照 GB/T 34796 的规定执行。

检测时建议调整 OD_{260} 吸收值在对应的仪器要求范围内, OD_{260}/OD_{280} 比值会受 pH 影响较大,建议使用对应的 DNA 洗脱液作为检测溶剂,并设置空白对照。

7.4.2 荧光法(微量 DNA 检测)

见《中华人民共和国药典》(四部,2020 年版)。

7.4.3 琼脂糖电泳测量法

将待测 DNA 与已知浓度的 DNA 同时进行电泳,根据结合的溴化乙锭荧光强度,估计其含量。根据电泳图谱判断 DNA 纯度。

7.4.4 实时荧光 PCR 法

根据待测 DNA 样本选择相应的标准物质和引物探针序列,进行 PCR 扩增,以标准物质起始模板 DNA 浓度的对数为横坐标,Ct 值为纵坐标,制作标准曲线。根据标准曲线,计算待测 DNA 的浓度。

7.4.5 数字 PCR 法

采用数字 PCR 方法对待测 DNA 样本进行定值,设置 2 个~3 个浓度梯度,每个浓度设置至少 3 个重复,根据数字 PCR 结果,计算待测 DNA 浓度。

7.5 DNA 得量检测

7.5.1 基本原则

根据说明书给出的提取样本用量选取至少 3 个样本用量梯度,需涵盖最少用量和最多用量(如人新鲜血液试剂盒推荐用量为 $100\ \mu\text{L}$ ~ $250\ \mu\text{L}$,选取梯度可为 $100\ \mu\text{L}$, $200\ \mu\text{L}$, $250\ \mu\text{L}$ 三个用量梯度),按照试剂盒使用说明书进行 DNA 提取,按照 GB/T 34796 的规定计算得量,得出对应样本用量的得量范

围。常用试剂盒样本提取用量和得量见附录 B 的表 B.1。

7.5.2 基因组 DNA

针对从血液、血斑、血凝块、血浆、唾液、口腔拭子、尿液、动植物组织等生物样本中提取的基因组 DNA,使用微量紫外分光光度计,通过测量 OD 值进行核酸得量检测,具体要求和步骤按照 GB/T 34796 的规定执行。

7.5.3 微量 cfDNA 或 ctDNA

针对从血浆或血清样本中提取的微量 cfDNA 或 ctDNA,建议使用实时荧光计或生物芯片分析系统、微流控毛细管电泳系统,进行核酸得量检测。

7.5.4 微量病毒 DNA

针对从血浆、血清等生物样本中提取的微量病毒 DNA,采用实时荧光 PCR 法,通过检测特定基因的 Ct 进行 DNA 浓度检测,方法按照 7.4.4 进行。或采用数字 PCR 方法检测样本中 DNA 浓度,根据定值结果计算其 DNA 浓度,方法按照 7.4.5。

7.6 DNA 完整性检测

7.6.1 检测方法

DNA 完整性检测一般采用琼脂糖凝胶电泳法、微流控芯片法或毛细管电泳分离法,也可参考其他方法进行 DNA 完整性检测。

病毒 DNA、cfDNA 和 ctDNA 不建议进行 DNA 完整性检测。

7.6.2 凝胶电泳法

取 2 μL ~5 μL 提取后的基因组 DNA 样品溶液与适量 6 \times 上样缓冲液混合,在 1%琼脂糖凝胶中 以 3 V/cm~5 V/cm 恒压条件下电泳 40 min,用凝胶成像系统观察 DNA 条带,要求所得 DNA 条带单一、清晰、片段大小合适、无拖带及明显降解情况。

注:根据具体样本调整电泳条件。

7.6.3 微流控芯片或毛细管的电泳分离法

取 10 ng DNA 样本置于微流控芯片或毛细管的电泳中,根据仪器使用说明书进行基因组 DNA 分析,查看 DNA 样品中 DNA 片段的分布情况,对弥散的 DNA 进行分析。

7.7 磁珠吸附率

按照附录 A 进行测定。

7.8 提取回收率测试

在适用的前提下,根据说明书给出的得量,在相应基质中添加 3 个浓度水平的 DNA 标准物质(所添加的浓度范围应涵盖高、中、低三个水平),按照试剂盒使用说明书进行 DNA 提取,每个添加水平重复提取 7 次,按照 GB/T 34796 的规定计算得量,按式(1)计算提取回收率(P_b)。

从血浆和血清等样本中提取的病毒 DNA、cfDNA 和 ctDNA 等微量 DNA 产物,采用实时荧光 PCR 法检测 Ct 值。

$$P_b = \frac{m_{b2}}{m_{b1}} \times 100\% \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中：

P_b ——回收率；

m_{b1} ——加入标准 DNA 的量，单位为微克(μg)；

m_{b2} ——每个浓度水平提取得到的 DNA 量的平均值，单位为微克(μg)。

7.9 精密度测定

7.9.1 批内精密度

在适用的前提下，根据试剂盒说明书使用同一批次 3 个试剂盒对参考样品重复提取 7 次，根据式(2)计算批内提取 DNA 得量的变异系数。

从血浆和血清等样本中提取的病毒 DNA、cfDNA 和 ctDNA 等微量 DNA 产物，进行批内精密度测定时，采用实时荧光 PCR 法检测 Ct，以 Ct 计算变异系数(CV)。

$$CV = \frac{SD}{X} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (2)$$

式中：

CV ——提取 DNA 得量的变异系数；

SD ——7 次提取 DNA 量的标准偏差；

X ——7 次提取 DNA 量的平均值。

7.9.2 批间精密度

在适用的前提下，根据试剂盒说明书使用 3 个不同批次试剂对参考品分别重复提取 7 次，根据式(2)计算批间提取 DNA 得量的变异系数。

从血浆和血清等样本中提取的病毒 DNA、cfDNA 和 ctDNA 等微量 DNA 产物，进行批间精度测定，采用实时荧光 PCR 法检测 Ct，以 Ct 计算变异系数。

7.10 参考结果

提取纯化的 DNA 得量、纯度、完整性和提取回收率等试剂盒提取产物检测参考结果见附录 B。

一般情况下，磁珠吸附率检测以磁珠吸附率的变异系数表征，在使用有效期内，参考结果见附录 C。

采用添加一定浓度范围的 DNA 标准物质至样品中进行提取回收率测试，样本提取回收率应符合试剂盒生产商的规定，参考结果见附录 C。

8 检测报告

试剂盒出厂或经测定后应附检测报告，或质检报告，或等同的指导性文件，文件格式见附录 D，文件内容在适用的前提下，应至少包括以下部分：

- a) 试剂盒的应用范围：包括适用样本及样本的特殊说明；
- b) 得量；
- c) 纯度；
- d) 完整性；
- e) 提取回收率；
- f) 批内、批间精密度。

附 录 A

(规范性)

试剂盒的磁力学性质指标测试

A.1 粒径大小及分布

A.1.1 显微图像法

按 GB/T 21649.1 的规定执行,得到显微图像,通过统计分析得出磁珠的平均粒径(d_{mean})和标准差(s)。

A.1.2 激光粒度分析法

将磁珠分散在缓冲液中,超声 5 min,振荡混匀,粒径大于 1 μm 的磁珠按 GB/T 19077 的规定执行,粒径小于 1 μm 的磁珠按 GB/T 29022 的规定执行,检测得出磁珠的平均粒径(d_{mean})及分散指数(PI)。

A.2 磁响应时间

将磁珠磁性分离进行计时,记录磁响应时间。

A.3 重分散性

将磁珠分散在缓冲液中,超声(频率 40 kHz,功率 180 W) 5 min,振荡混匀,将此磁珠分散液于离心机上采用 3 000 r/min 速度离心 3 min,加速沉淀,随后涡旋振荡 30 s,在已确定的吸收波长下测试分散液的吸光度值(A_1),重分散率(P_{rd})数值以%表示,按式(A.1)计算:

$$P_{rd} = \frac{A_1}{A_0} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (A.1)$$

式中:

P_{rd} ——重分散率;

A_1 ——离心后磁珠重悬液的吸光度;

A_0 ——磁珠分散液的吸光度。

A.4 磁稳定性

将磁珠分散在缓冲液(不含有铁离子)中,超声(频率 40 kHz,功率 180 W)5 min,并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下以 200 r/min 振荡 5 h,磁分离后取上清分散液,按 GB 5009.268 中第二法规定检测游离铁离子浓度。磁珠不应有铁离子溶出。

A.5 磁珠吸附率

在适用的前提下,使用磁珠对适量 DNA 标准品进行吸附,重复 7 次,计算磁珠吸附 DNA 标准品后的量与吸附前的 DNA 标准品的量的百分比。

附录 B

(资料性)

磁珠法 DNA 提取试剂盒提取性能验证

磁珠法 DNA 提取试剂盒样本的提取量、得量及纯度参考结果见表 B.1。

表 B.1 样本提取量、得量及纯度一览表

样本类型	提取 DNA 类型	样本量	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	OD ₂₆₀ /OD ₂₃₀	DNA 得量 μg
全血	基因组 DNA	200 μL	1.6~2.1	1.5~2.5	2~6
	基因组 DNA	1 mL	1.6~2.1	1.5~2.5	10~20
血斑	基因组 DNA	3 mm×3 mm, 1 片~3 片	1.6~2.1	0.8~2.0	0.5~3
血凝块	基因组 DNA	1 mL	1.6~2.1	1.5~2.5	10~20
唾液	基因组 DNA	200 μL	1.6~2.1	1.0~2.5	1~5
口腔拭子	基因组 DNA	一支	1.6~2.1	1.0~2.5	1~5
尿液	基因组 DNA	10 mL~15 mL 原尿	1.6~2.1	1.0~2.5	0~10
组织(动物/人)	基因组 DNA	30 mg~50 mg	1.6~2.1	1.0~2.5	2~15
新鲜植物叶片	基因组 DNA	50 mg~80 mg	1.7~2.1	1.5~2.5	8~40
血浆/血清	cfDNA、ctDNA	2 mL	N/A	N/A	8~20

附 录 C

(资料性)

磁珠法 DNA 提取试剂盒检测参考结果

磁珠法 DNA 提取试剂盒磁力学性质、提取纯化产物、磁珠吸附率提取回收率以及批内、批间精密度等检测参考结果见表 C.1。

表 C.1 磁珠法 DNA 提取试剂盒检测参考结果一览表

序号	检测项目		参考结果
1	磁力学性质		见试剂盒说明书
2	提取纯化产物		见附录 B
3	磁珠吸附率		变异系数小于或等于 10%
4	样品提取回收率		 符合试剂盒生产商的规定
5	批内、批间 精密度	动植物组织基因组 DNA	变异系数应小于或等于 15%
		人血基因组 DNA(不含血清或血浆游离 DNA)	浓度值,批内的重复性误差应小于或等于 15%
			浓度值,批间的重复性误差应小于或等于 20%
		微量 DNA,包括 cfDNA、ctDNA 等	浓度值,批内的重复性误差应小于或等于 20%
			浓度值,批间的重复性误差应小于或等于 20%
			Ct 值,批内重复性误差应小于或等于 5%
			Ct 值,批间重复性误差应小于或等于 10%
		病毒 DNA	Ct 值,其批内重复性误差应小于或等于 5%
Ct 值 批间重复性误差应小于或等于 10%			
其他 DNA	应符合试剂盒说明书或生产商的规定		

参 考 文 献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 四部. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
-

