

ICS

点击此处添加中国标准文献分类号

中华人民共和国

行业标准

XX/T XXXXX—XXXX

检疫性有害生物凭证标本核酸制备、保存与 管理规范

Preparation, preservation and management specification for nucleic acid of
quarantine pest voucher specimens

(报批稿)

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

发布

前 言

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准负责起草单位：中国检验检疫科学研究院

本标准主要起草人：宋云、陈岩、吕继洲、赵文军、吴绍强、朱水芳

检疫性有害生物凭证标本核酸制备、保存与管理规范

1 范围

本标准规定了检疫性有害生物凭证标本核酸保存与管理的要求。

本标准适用于检疫性有害生物凭证标本核酸保存与管理。

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，仅所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 18088 出入境动物检疫采样

GB/T 27402 实验室质量控制规范 植物检疫

SN/T 1193 基因检验实验室技术要求

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1 凭证标本 voucher specimens

具完备的采集、鉴定信息（采集人、日期、地点、生境、鉴定人、种名等），用于物种复核、引证、溯源并永久保存的标本。

3.2 核酸 nucleic acid

核酸分子分为两类：脱氧核糖核酸（DNA）和核糖核酸（RNA），是细胞内携带遗传信息的物质。

4 核酸的处理

4.1 针对不同来源的材料和样品采用不同的处理方法，常用设备参见附录 A。

4.2 核酸来源

对于昆虫、真菌、线虫、细菌、病毒、杂草，核酸来自于有害生物个体或纯培养，病毒及植原体及难养细菌来自于染病植物材料。

4.3 核酸提取

4.3.1 核酸的释放

4.3.1.1 机械法

包括低渗裂解、超声裂解、微波裂解、冻融裂解、液氮研磨和颗粒破碎等物理裂解方法。这些方法用机械力使细胞破碎。

4.3.1.2 化学法

在一定的pH 环境下，加入表面活性剂或强离子剂（CTAB、SDS等）使细胞裂解，蛋白质和多糖沉淀，核酸从细胞内释放出来。向缓冲液中加入一些金属离子螯合剂抑制核酸酶的活性，保护核酸不降解。

4.3.1.3 酶法

通过加入溶菌酶或蛋白酶（如蛋白酶K）使细胞破裂，核酸释放。蛋白酶还能降解与核酸结合的蛋白质，促进核酸的分离。

4.3.2 核酸的分离纯化

4.3.2.1 酚/氯仿抽提法

细胞裂解后离心分离含核酸的水相，加入等体积的酚：氯仿：异戊醇（25:24:1）混合液，混匀后离心分离。疏水性的蛋白质被分配至有机相，核酸则被留于上层水相。在含核酸的水相中加入醋酸钾或醋酸钠，形成核酸盐，核酸盐可被一些有机溶剂沉淀，离心得到的核酸可以用70%乙醇洗涤以除去多余的盐分，即可获得一定纯度的核酸。

4.3.2.2 固相抽提法

因分离和纯化同步进行，并且有商品试剂盒供应而被广泛应用于核酸的纯化。固相抽提方法的固相支持物有硅胶、玻璃颗粒、硅藻土、磁性颗粒、阴离子交换载体等，在一定的离子环境下，核酸可被选择性地吸附到固相支持物而与其他生物分子分离。

4.4 核酸的质量检测

完整性检测：通过凝胶电泳检测DNA为明亮单一的条带；RNA为28s(23s)、18s(16s)、5.8s(5s)三条清晰的rRNA条带，且28s与18s条带亮度比值约2:1。

纯度检测：DNA：OD260/ OD280在1.7-1.9之间；RNA：OD260/ OD230在1.9-2.1之间。

浓度检测：核酸浓度不少于100ng/u1，体积不少于100u1。

符合上述要求的核酸可用于进一步保存，否则需重新提取。

核酸提取过程中采取防止交叉污染措施。

4.5 保存

4.5.1 保存管

使用在-80°C条件下专用的冻存管保存。RNA要求离心管DEPC处理过。

4.5.2 标签

利用透明的可在-80度不脱落的标签，标签内容：样品编号（Sample ID），采集编号（Collection Number），科中文名（Chinese Name of family），科拉丁名（Latin Name of Family），属中文名（Chinese Name of Genus），种中文名（Chinese Name of Species），保存时间，含量，鉴定人，单位，联系方式。

4.5.3 保存盒

统一使用100管/盒的纸盒保存，保存盒分为昆虫、真菌、细菌、病毒、线虫及杂草几类，在盒子侧面贴标签，标签包含种类名称。

4.5.4 保存条件

每个样品4种保存方式：-20°C保存；-80°C保存；液氮保存；冻干粉状态保存；每种保存方式的样品不少于10管。冰箱带锁并具有断电或温度异常报警功能。

5 核酸的管理

5.1 冰箱必须有专人管理，建立使用台账，使用记录。

用于保存核酸样品的冰箱等设备需要定期进行计量校验；每天检查冰箱温度并做登记记录。

5.2 核酸质量核查

标本核酸需要定期检测与更新，每隔一年一次，随机抽取检测保存的各类有害生物的核酸样品，按1%比例抽取，按照不同类型有害生物的标准化流程监控，电泳检测，检测结果符合上述保存要求，放回原处，并记录；检测结果不符合要求的，按以上的规范，重新提取、测定与保存样品。

5.3 结果记录与资料保存

完整的实验记录包括：样品的名称与编号、来源、种类、时间，实验的时间、地点、方法和结果等，并要有经手人和实验人员的签字。检测需有最终的实验数据、电泳结果照片等。原始数据应归档，妥善保管，以备复验、谈判和仲裁。

6 复核

由国家质量监督检验检疫总局指定的单位或人员负责。主要检查实验记录、照片等资料的完整性和真实性，必要时进行复核实验。

附 录 A
(资料性附录)
核酸保存常用仪器设备

研钵、超声破碎仪、匀浆机、离心管、指型管、水浴锅、可调移液器、可调移液器头、涡旋振荡器、超净工作台、电子天平、分光光度计、P C R 仪、电泳仪、电泳槽、紫外透射仪、凝胶成像系统、灭菌锅、核酸蛋白分析仪、高速冷冻离心机、台式小型离心机、低温冰箱、纯水机等

参 考 文 献

KIEFER E, HELLER W, ERNST D. A simple and efficient protocol for isolation of functional RNA from plant tissues rich in secondary metabolites [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2000, 18: 33–39.

SALZMAN R A, FUJITA T, ZHU—SALZMAN K. An improved RNA isolation method for plant tissues containing high levels of phenolic compounds or carbohydrates [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1999, 17: 11–17.
