

DNA IQ™系统—— 小样品案例操作手册



原英文技术手册号码: TB296

本说明书用于产品**DC6700** 和 **DC6701**

所有的技术文献均可从公司网站www.promega.com得到
请访问公司网站以证实您所使用的技术手册为最新版本

I. 介绍.....	1
II. 产品组分	2
III. DNA IQ™ 系统操作步骤	2
A. 制备洗液和裂解缓冲液	2
B. 固体材料上斑迹中 DNA 的提取	5
C. 液体样品中 DNA 的提取	6
IV. 疑难解答	7
V. 缓冲液和溶液的组成	7
VI. 相关产品	8

I. 介绍

DNA 分析在人和动物的遗传鉴定中正扮演着越来越重要的角色 随着象 PowerPlex®16 多复合位点分析系统的发展,扩增和分析步骤的效率得到了极大提 高然而 从各种检材中纯化DNA仍然是获得基因型过程的一个限速步骤

目前,有几种方法用于纯化吸附在固体表面样品中的 DNA 首先要从这些固 体表面获取生物材料 一般是将材料浸泡 这会导致小量样品的无法有效回收 随 后 DNA 一定要纯化 去掉PCR 扩增反应的抑制剂或其它干扰准确定量的组分

常用的纯化方法,比如苯酚/氯仿抽提法 使用有毒的有机化学物质并在提取 过程中需要多步离心 这会使 DNA 样品大量丢失 并容易在纯化的 DNA 样品中 污染抑制 PCR 扩增的抑制剂 Chelex®抽提方法快速 但常会留下扩增抑制剂 硅化 基质纯化方法利用DNA对硅的亲合力 不需要有机溶剂组分 当使用过滤系 统时 硅化滤膜很方便 但一般得率较低 而且需要长时间的洗涤来除去含胍的裂 解溶液 现在已使用的硅磁化颗粒 得率较高 但也需要长时间洗涤

Promega 的 DNA IQ™系统 适用于少量案例样品中 DNA 的分离纯化 全部 DNA 分离纯化过程包括两个步骤 对于附着在固体上的生物材料 第一步是几乎 适用于所有斑迹的简单 快速 有效的DNA抽提方法 如是液体样品 则这一步 可省 去 第二步使用特定的磁化树脂来纯化 DNA 无需长时间洗涤步骤来除去裂 解试剂 另外 这些颗粒捕获DNA后不会结团 这是其它硅化颗粒经常遇见的问 题 这一系 统设计用于大约 100ng 或更少量DNA 的快速纯化 当样品中DNA 含 量少于 50ng 时 则本系统具有更高的 DNA 分离纯化效率

II. 产品组分

产品	包装	目录号
DNA IQ™系统	400 个反应	DC6700

本系统不得用于医学诊断,系统包括:

- ⑥ 3ml Resin(树脂)
- ⑥ 150ml Lysis Buffer(裂解液)
- ⑥ 70ml 2 × Wash Buffer (2 × 洗涤缓冲液)
- ⑥ 50ml Elution Buffer 洗脱缓冲液
- ⑥ 2 份 技术手册 分别用于小样品案例操作和数据库样品操作

保存条件: 所有DNA IQ™试剂保存在室温。

III. DNA IQ™ 系统操作程序

需用户准备的材料

- ⑥ 95-100%乙醇
- ⑥ 异丙醇
- ⑥ 1M DTT
- ⑥ 65℃加热块,水浴箱或热循环仪
- ⑥ 95℃加热块,水浴箱或热循环仪 用于斑迹或药棉签的抽提程序
- ⑥ 涡旋混合器
- ⑥ 1.5ml 小离心管
- ⑥ 离心套管 (DNA IQ™ Spin Baskets, Promega Cat.# V1221)
- ⑥ 带隔膜的防污染加样头
- ⑥ MagneSphere® 磁分离架 (十二孔) Promega Cat.# Z5342

A. 制备洗涤液和裂解缓冲液

制备洗涤液

- 加 35ml 95-100%乙醇和 35ml 异丙醇到 2 倍洗涤缓冲液中。
- 盖好瓶盖并颠倒几次混匀。
- 做好标记表明已加入乙醇,该溶液可保存在室温 确保瓶子盖严以防止挥发。

制备裂解缓冲液

- 确定所用的裂解液的量 见表 1), 每 100 μl 裂解液中加入 1 μl DTT。

表 1. 每一个提取反应所需的裂解液

材料	裂解液 ¹	裂解液 ²	总溶液
血液	100μl	100μl	200μl
棉签	250μl	100μl	350μl
1/4 th CEP 擦	250μl	100μl	350μl
15-50mm ² S&S 903 纸	150μl	100μl	250μl
3-30 mm ² FTA® 纸	150μl	100μl	250μl
布面积超过 25 mm ²	150μl	100μl	250μl

¹用于章节III.B,步骤 2, 或章节III.C,步骤 2

²用于章节III.B,步骤 9, 或章节III.C,步骤 6

为避免交叉污染,强烈建议使用手套并使用防污染的加样头。

2. 颠倒几次混匀。
3. 做好标记以表明加入了DTT,并记录上日期。该溶液可在室温密封保存达 1 个月。

注意: 如果裂解缓冲液中有沉淀形成, 将该裂解缓冲液于 37-60°C 温浴后使用。



图 1. 利用 DNA IQ™ 系统从固体材料上的斑迹中分离 DNA



短暂涡旋振荡液体样品/裂解液/树脂 在室温保温 5 分钟

短暂涡旋振荡离心管使树脂悬浮 将离心管放在磁架上,小心去除溶液 注意不要触碰树脂

加入制备的裂解液短暂涡旋振荡洗涤一次

用洗涤液洗涤 3 次 每次短暂涡旋振荡离心管使树脂悬浮。打开离心管盖子 在室温下空气干燥 5 分钟

加入洗脱液 盖好盖子,65 加热 5 分钟。

从加热器上取下离心管 立即涡旋振荡离心管使树脂悬浮后将离心管放回磁架上

小心将DNA 溶液吸出放在所选的容器内

图 2. 利用 DNA IQ™系统从液体样品中纯化 DNA

B. 提取固体材料上的斑迹中DNA 图 1)

1. 将样品放在 1.5ml 离心管内, 推荐用量的树脂能捕获的最大 DNA 量约为 100ng。
2. 加入适量制备的裂解液(表 1), 盖上盖子, 将离心管放在热块中 95℃加热 30 分钟。

例外:

- a. 热敏纤维: 尝试不加热抽提。
- b. 皮革: 无论采用加热或不加热的裂解方法, 本裂解液可能不适用于某些皮革, 尝试在小体积的水溶液中 (100-200μl) 抽提 除去基质后加入 2 倍体积裂解液。

注意: 对于小的斑迹 另外一种方法是将斑迹的材料置于DNA IQ™离心套管内 Cat.#V1221), 再将离心套管放入 1.5ml 离心管中, 在套管内加入 100-150μl 制备的裂解液, 小心盖上盖子, 在 95℃加热 30 分钟, 大多数溶液会保留在套管内, 接着进行步骤 4。

3. 从加热器上取下管子, 将裂解液和样品转移到离心套管中。
4. 在最大离心速度, 室温离心 2 分钟, 取下离心套管。
5. 涡旋振荡树脂贮存瓶, 使树脂悬浮 向 DNA 溶液中加入 7μl 树脂, 加样时要保持树脂完全悬浮, 以使实验结果一致。
6. 短暂振荡样品/裂解液/树脂混合物, 在室温保温 5 分钟。
7. 将管子放在磁架上, 分离会立即开始。
8. 仔细除去溶液, 不要触碰管壁一侧的树脂。
9. 加入 100μl 制备的裂解液 从磁架上取下管子, 短暂涡旋振荡使树脂悬浮。
10. 将管子放回到磁架上, 并去除所有的裂解液。
11. 加入 100μl 制备的洗涤液 从磁架上拿下管子, 短暂涡旋振荡使树脂悬浮。
12. 将管子放回到磁架上, 并去掉所有洗涤液。
13. 重复步骤 11 和 12 两次 共 3 次洗涤 并确保在最后一次洗涤后, 除去所有的溶液。
14. 打开盖子, 将管子放在磁架上, 空气中干燥 5 分钟。
15. 依据所用的生物材料, 加入 25-100μl 洗脱液。少量的洗脱液确保最后的 DNA 具有较高的终浓度。
16. 盖上管盖, 涡旋振荡使树脂悬浮, 在 65℃加热 5 分钟。
17. 从加热块上拿下管子, 短暂涡旋振荡后 立即放在磁架上。
18. 小心将溶液转移到所选的管子内。

注意: DNA 溶液可以在 4℃短期保存, 在-20 或-70℃长期保存。

注意: 为了完全浸泡样品, 可能需要加入比推荐量更多的裂解缓冲液。

注意: 为了得到最大的提取效率, 将裂解缓冲液与沾有斑迹的基质一起离心是重要的。

注意: 如果吸取了树脂, 轻轻将树脂吹回管中并重新分离。

注意: 干燥时间不要超过 20 分钟以免 DNA 难于洗脱。

注意: 在将管子放回磁架前必须保持管子为热的状态 否则将影响DNA 产率。

C. 从液体样品中分离DNA(图 2)

制备树脂溶液和裂解液的混合贮液,比例按每个样品 7 μ l 树脂和 93 μ l 制备的裂解液。多准备一些贮存液以防备加样中的损失。下面的公式可以帮助确定要准备的贮存液体积。涡旋振荡树脂贮存瓶以悬浮树脂。

$$(\text{样品数目}+1) \times 7 \mu\text{l} = \mu\text{l 树脂}$$

$$(\text{样品数目}+1) \times 93 \mu\text{l} = \mu\text{l 制备的裂解液}$$

1. 轻轻混匀液体样品并取适量加入到 1.5ml 离心管中。推荐用量的树脂可以最多捕获约 100ng DNA。
2. 涡旋振荡树脂/裂解液混合液,确保完全悬浮树脂。加 100 μ l 悬液到有液体样品的管子中。加样过程中,如贮存液中树脂开始沉降,则还需要重新涡旋振荡悬浮树脂/裂解液混合液。轻轻涡旋振荡样品/树脂/裂解液混合液,或吹吸几次混匀。
3. 在室温保温 5 分钟。
4. 将管子放在磁架上,分离会立即开始。
5. 仔细除去所有溶液,不要触碰管壁一侧的树脂。
6. 加入 100 μ l 制备的裂解液,从磁架上拿下管子,短暂涡旋振荡使树脂悬浮。
7. 将管子放回磁架,去除所有裂解液。
8. 加入 100 μ l 制备的洗涤液,从磁架上拿下管子,短暂涡旋振荡使树脂悬浮。
9. 将管子放回磁架,去除所有洗涤液。
10. 重复步骤 8 和 9 两次,共 3 次洗涤,确保最后一次洗涤后,去除所有溶液。
11. 打开盖子,将管子放在磁架上,空气中干燥 5 分钟。
12. 依据所用的生物材料,加入 25-100 μ l 洗脱液。少量的洗脱液确保最后的 DNA 具有较高的终浓度。
13. 盖上管盖,涡旋振荡使树脂悬浮。在 65 $^{\circ}\text{C}$ 加热 5 分钟。
14. 从加热块上拿下管子,短暂涡旋振荡后,立即放在磁架上。
15. 小心将溶液转移到所选的管子中。

注意:DNA 溶液可在 4 $^{\circ}\text{C}$ 作短期保存,在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 或 -70 $^{\circ}\text{C}$ 作长期保存。

注意:如果不能在管壁形成明显的树脂沉淀,重新涡旋离心管并快速放回到磁架上。

注意:干燥时间不要超过 20 分钟,以免 DNA 难于洗脱。

III . 疑难解答



现象	可能原因	评论
得率低	样品太多	树脂的容量大约为 100ng。并且当样品中 DNA 含量大于 50ng 时 (约 1-2 l 全血中的 DNA 含量) 树脂的捕获效率将下降 用更少的样品或更多的树脂。
	抽提差	加热含有样品斑迹的裂解液后,离心基质和溶液,尽可能多地洗脱出DNA。
树脂“沉淀”形成差	在管子放在磁架前树脂沉降	应在涡旋振荡混合后,将样品立即放在磁架上,重新振荡/混合样品,并放回到磁架上。
	加入的材料量相对于所推荐试剂的体积过量	使用更少量的起始样品,参照操作手册中推荐的起始样品量。
		有比例地增加树脂的量,可以从更多的起始材料中捕获DNA 注意,DNA 得率的增加大致和树脂的增加成正比。
终洗涤液或洗脱液有颜色 (可能会影响后续的实验)	洗涤不充分	确保在所有洗涤中均形成明显的树脂块 每次洗涤后去除全部液体。
		用更少的起始样品,并增加洗涤次数 涡旋
在洗脱的DNA 液中混有树脂 (可能会影响后续的实验)	快速吸取洗脱液的过程中可能转移了一些树脂,或在洗脱液的半月面上存留有一些树脂	振荡混合洗脱液后将管子放在磁架上 将洗脱液转移到一个新的管子中
得率不稳定 (可能会影响后续的实验)	树脂的量不稳定	配制树脂贮液 (III.C 树脂/裂解液) 前涡旋振荡混匀树脂 并在分装树脂贮液中重复涡旋振荡混匀树脂/裂解液
	在初始样品中存在非人的基因组DNA 污染会降低随后的人特异 DNA 测试的产率	DNA IQ™ 系统捕获“总 DNA” 包括双链和单链DNA

V. 缓冲液和溶液的组成

洗脱液

10mM Tris (pH8.0)
0.1mM EDTA

VI. 相关产品

产品	包装	目录号
MagneSphere® Technology Magnetic Separation Stand (two-position)	1.5ml	Z5332
MagneSphere® Technology Magnetic Separation Stand (twelve-position)	1.5ml	Z5342
PolyATtract® System 1000 Magnetic Separation Stand	1 个	Z5410
DNA IQ™ Spin Baskets	1,000 个	V1221
ART® 20P, Pipet Tip 20 µl	960 个	DY1071
ART® 20P, Pipet Tip 200 µl	960 个	DY1121
ART® 20P, Pipet Tip 1,000 µl	768 个	DY1131
AluQuant™ Human DNA Quantitation System	400 反应	DC1011
PowerPlex® 16 System	400 反应	DC6530
	100 反应	DC6531
PowerPlex® 1.1 和 1.2 System	400 反应	DC6500
	100 反应	DC6501
PowerPlex® 1.2 System	400 反应	DC6100
	100 反应	DC6101