

组织和毛发提取试剂盒（与DNA IQ™系统结合使用）操作手册



原英文技术手册号码: TB307

本说明书用于产品**DC6740**

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
III. 产品组分	2
III. 组织和毛发提取试剂盒与 DNA IQ™系统结合使用的操作步骤.....	2
A. 试剂的准备.....	2
B. 从发囊及发根中纯化DNA	5
C. 从新鲜组织、冰冻组织、甲醛固定组织及石蜡包埋组织中纯化DNA.....	6
IV. 疑难解答	7
V. 参考文献	7
VI. 相关产品.....	8

I. 介绍

Promega 的 DNA IQ™系统使用一种新的顺磁性树脂来纯化DNA, 该试剂盒中包含有DNA 纯化所需的可用于多种形式样品的高效裂解液。然而, DNA IQ™系统中的裂解液对一些如组织和毛发的样品不能有效地裂解, 这些样品需要蛋白酶K的预处理以协助样品的裂解。组织和毛发提取试剂盒（与DNA IQ™系统结合使用）中提供的试剂和操作手册可用于大部分组织和毛发的有效裂解, 除去样品中的蛋白和其它成分, 随后用DNA IQ™系统对样品中的DNA 进行纯化。

基因组和线粒体DNA

结合使用组织和毛发提取试剂盒（与DNA IQ™系统结合使用）及DNA IQ™系统, 可高效地从样品中提取纯化双链或单链基因组DNA及线粒体DNA。如果待提取的样品被微生物污染, 则微生物DNA被一起分离。可抑制PCR扩增的小于 80bp 的 DNA 可被选择性地去除, 从而使纯化的 DNA 更有效地用于 PCR 扩增。

组织和毛发提取试剂盒（与DNA IQ™系统结合使用）可提高 DNA 纯化的产量

当用DNA IQ™系统—数据库操作手册（TB297）中涉及的样品进行 DNA 纯化时, DNA IQ™系统所提取的 DNA 的量是固定的, 约 100ng。对于不同检材中 DNA 的定量提取依赖于样品中超量的DNA 饱和DNA IQ™树脂。在结合使用组织和毛发提取试剂盒（与DNA IQ™系统结合使用）及 DNA IQ™系统时, 若用蛋白酶K消化去除竞争结合DNA IQ™树脂的物质, 则树脂从蛋白酶K 处理过的

样品中特异地结合的 DNA 量超过未经蛋白酶 K 处理的样品的 3 倍。不同的组织用 蛋白酶 K 消化后的效果不同, 因此, 为了得到 DNA IQ™系统最佳的提取效果, 对 每种形式的样品需要进行最优化。

毛发

毛发是经常能从犯罪现场发现的检材, 然而, 从毛发中提取核 DNA 的过程常 失败。这主要是由于毛发的生命周期。当毛发生长至脱落时, 则核及其中包含的 DNA 降解 (1)。许多脱落的毛发中仅含少量可用的核酸 DNA, 使用 DNA IQ™系 统亦不可能逆转这一事实。DNA IQ™系统能够除去抑制 PCR 反应的非常小的片段 DNA 从而使有 限量的 DNA 片段扩增得以改善。在DNA 产量很低或DNA 降解的情 况下, PCR 的结 果亦可能通过较小DNA 模板的扩增得以改善。

由于脱落的毛发周围通常附着有细胞, 因此, 从未经洗涤的毛发样品中纯化 DNA 有助于提高 DNA 的产量, 但污染可能被观察到。不经过蛋白酶K消化, 单用 DNA IQ™系统中裂解缓冲液即可从许多拔出的单根毛发中提取用于STR 扩增的足 够量的DNA, 然而, 增加蛋白酶K消化这一步骤会显著提高DNA的产量。少部分 个体的毛发具有抵御蛋白酶K消化的能力但在高浓度的DTT存在下可有效地裂解。 组织和毛发提取试剂盒 (与DNA IQ™系统结合使用) 中的温育缓冲液/蛋白酶K 溶 液中含有终浓度为 100mM DTT 以帮助裂解那些具有抵御蛋白酶 K 消化能力的毛 发。

线粒体DNA

即使发根没有足够量的核 DNA, 它们也是线粒体 DNA 的丰富来源。在高浓度 的 DTT 存在下, 蛋白酶K 可有效地裂解发根, 从而可用DNA IQ™系统提取大部分 的线 粒体DNA。DNA IQ™树脂可非常有效地去除毛发中抑制 PCR 扩增的色素。

组织

结合DNA IQ™系统, 组织和毛发提取试剂盒 (与 DNA IQ™系统结合使用) 中 提供的试剂和步骤可从大量不同的组织中纯化DNA。首先要注意的是, 蛋白酶K的 消化将影响 DNA IQ™ 系统的定量特征, 如果需要, 产量可以校准。从样品中获得 DNA 的能力依赖于起始组织的质量。长期暴露在高温下的组织可能会产生不能很好 扩增的严重损伤的 DNA。若组织仔细切碎后进行蛋白酶 K 消化, DNA 的提取效率 将会提高。

福尔马林固定的组织

福尔马林交联DNA和蛋白, 因而获得用于扩增目的的DNA中存在特定的问题。 组织和毛发提取试剂盒 (与DNA IQ™系统结合使用) 与DNA IQ™系统结合使用可 非常有效地从福尔马林固定的大块组织或薄切片及石蜡包埋的组织中获得DNA。然 而, 在福尔 马林中长期保存的组织会产生过度交联, 从这些样品中纯化的DNA可能 难于有效扩增, 尤其是大片段的扩增。在扩增中延长延伸时间可能有助于小片段和 大片段扩增产物的平 衡。

骨骼

用于DNA 纯化的骨需要除去石灰质并需要用大体积的蛋白酶K消化。从骨样品中纯化DNA, 需要骨温育缓冲液, 蛋白酶K, 温育缓冲液, DTT, 及DNA IQ™系统。依据样品质量和样品数, 可能需要其它的裂解缓冲液。若需要用 DNA IQ™系统纯化骨中 DNA 的操作步骤, 请与Promega 技术服务联系 (techserv@promega.com)。

II、产品组分

产品	大小	目录号
Tissue and Hair Extraction Kit (for use with DNA IQ™)	100 个反应	DC6740

此系统供实验室使用, 系统包括:

- ⑥ 50ml Incubation Buffer (温育缓冲液)
- ⑥ 100mg Proteinase K
- ⑥ 5g DTT
- ⑥ 1 份 技术手册

保存条件: Proteinase K 和 DTT 保存在 -20℃, 温育缓冲液保存在-20℃到 25℃。

III. 结合 DNA IQ™系统, 组织和毛发提取试剂盒 (与 DNA IQ™系统结合使用) 的操作步骤

需用户准备的材料

- ⑥ DNA IQ™系统 (Cat.# DC6700 及 DC6701)
- ⑥ 56℃加热块, 水浴箱或热循环仪
- ⑥ 防污染加样头
- ⑥ 无核酸酶的水
- ⑥ MagneSphere® 磁分离架 (十二孔) (Cat.# Z5342)
- ⑥ 或 MagneSphere® 磁分离架 (二孔) (Cat.# Z5332)
- ⑥ 95-100%乙醇
- ⑥ 异丙醇
- ⑥ 65℃加热块, 水浴箱或热循环仪
- ⑥ 涡旋混合器
- ⑥ 1.5ml 离心管 (Cat.# V1231)

A. 试剂配制

蛋白酶K储存液的配制

1. 向冻干的蛋白酶 K 瓶中加入 5.5ml 温育缓冲液, 轻摇使之完全溶解。此蛋白酶 K 储存液的终浓度为 18mg/ml。
2. 将蛋白酶 K 储存液分装成小包装, 可在 -20℃使用保存至 1 年。蛋白酶 K 反复冻融不要超过 5 次, 反复冻融在 5 次之内其活性不会有显著下降。使用前, 将蛋白酶K放置在冰上融化及保存。

1M DTT 的配制

将 5g DTT 溶于无核酸酶的水中至终体积为 32.4ml, 则 DTT 的终浓度为 1M。将 DTT 分装成小包装使用并保存在-20℃。

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。

注意：对每一个 DNA 纯化，温育缓冲液/蛋白酶 K 溶液均应新鲜配制。

温育缓冲液/蛋白酶K溶液的配制

1. 以下面的比例混合温育缓冲液、1M DTT 和蛋白酶K 储存液配制温育缓冲液/蛋白酶 K 溶液。每个发囊样品需用 25-100ul 温育缓冲液/蛋白酶 K 溶液（参见章节 III.B.）。每个组织样品需要 50-100ul 温育缓冲液/蛋白酶 K 溶液（参见章节III.C.）。蛋白酶 K 的终浓度为 1.8mg/ml。

温育缓冲液	800ul
1M DTT	100ul
蛋白酶K储存液	100ul
总体积	1000ul

2. 轻轻混匀，放置在冰上直到使用。

1x 洗涤缓冲液的配制

注意：用于配制 1x洗涤缓冲液的 2x洗涤缓冲液为DNA IQ™系统（Cat.# DC6700 及 DC6701）中提供。组织和毛发提取试剂盒中（与 DNA IQ™系统结合使用）不提供 2x洗涤缓冲液。

1. 对用于 400 人份的 DNA IQ™系统（Cat.# DC6700），向 2x 洗涤缓冲液中加入 35ml 95-100%的乙醇和 35ml 异丙醇。
对用于 100 人份的 DNA IQ™系统（Cat.# DC6701），向 2x 洗涤缓冲液中加入 15ml 95-100%的乙醇和 15ml 异丙醇。
2. 盖上瓶盖，颠倒几次混匀。
3. 将瓶标记为 1x 洗涤缓冲液，写明已加入醇。此溶液可放置在室温保存，要拧紧瓶盖以防挥发。

裂解液的配制

注意：裂解缓冲液为DNA IQ™系统（Cat.# DC6700 及 DC6701）中提供。组织和毛发提取试剂盒中（与DNA IQ™系统结合使用）不提供裂解缓冲液。

1. 确定所需的裂解缓冲液的总量。从每个发囊样品中提取基因组 DNA 需 150-300ul 的裂解缓冲液（见章节 III.B.）。从每个新鲜的、冻存的、福尔马林固定的和石蜡包埋的组织样品中提取基因组 DNA 需 150-300ul 的裂解缓冲液（见章节III.C.）。从每个发根样品中提取基因组 DNA 需 450ul 的裂解缓冲液。
2. 每 100ul 裂解液中加入 1ul 1M DTT。
3. 颠倒几次混匀。
4. 将瓶标记上日期，写明已加入DTT。若拧紧瓶盖，此溶液可在室温保存一个月。

B. 从发囊及发根中纯化DNA

1. 基因组DNA 的提取，切下发囊放入 1.5ml 离心管内。加入新鲜制备的 25-100ul 温育缓冲液/蛋白酶K 溶液。混匀，盖紧管盖，56℃温育 1 小时。

对于线粒体DNA 的提取，切下 1 个或多个 1-4cm 长的发根放入 1.5ml 离心管内。加入 100ul 1M DTT 和 75ul 蛋白酶 K 储存液。混匀，盖紧管盖，56℃温育 1 小时。要确保全部的发根被溶液浸没。

注意：此步处理后的发根可能依然是完整的，但在下一步加入裂解缓冲液后将全部融化。

2. 在室温向样品中加入 2 倍体积的裂解缓冲液和 7ul 完全悬浮的 DNA IQ™系统中的DNA IQ™树脂。高速涡旋振荡 3 秒钟后室温温育 5 分钟。

注意：若裂解缓冲液温育后仍有可见的发根残留，可将残留物去除，液体转移至另一管中。或将残留物保留在管中，它们不会干扰DNA的纯化。

3. 高速涡旋振荡 2 秒钟，将管子放在 MagneSphere® 磁分离架上。磁分离立刻进行。

4. 小心去除所有溶液，不要触碰管壁上的树脂。
5. 加入 100ul 裂解缓冲液，从磁分离架上取下管子，并高速涡旋振荡 2 秒钟。
6. 将管子放回到磁分离架上，并去除所有的裂解液。
7. 加入 100ul 配制的 1x 洗涤液，从磁分离架上取下管子，并高速涡旋振荡 2 秒钟。
8. 将管子放回到磁分离架上，去掉所有洗涤液。
9. 重复步骤 7 和 8 两次，共 3 次洗涤，并确保在最后一次洗涤后，除去所有的液体。
10. 打开盖子，将管子放在磁分离架上，空气中干燥 5 分钟。
11. 根据 DNA 提取所用的检材量，加入 2.5 – 100ul 洗脱液，小的洗脱体积有助于获得终浓度较高的DNA。
12. 盖上管盖并高速涡旋振荡 2 秒钟。65℃温育 5 分钟。
13. 取出温育的管子，高速涡旋振荡 2 秒钟。立即放到磁分离架上。
14. 将 DNA 溶液小心地转移到选定的容器中。
- 15.

注意：DNA 溶液可以在 4℃作短期保存，在-20 或-70℃作长期保存。

C. 从新鲜的、冻存的、福尔马林固定的和石蜡包埋的组织样品中纯化DNA

1. 将 1mg 或少于 1mg 的组织放入 1.5ml 离心管内。根据样品的状况和形式决定用于纯化的组织的量。若在蛋白酶 K 处理前切碎，多至 2.5 mg 的组织亦可用于纯化（见注意 1 – 2）。

注意：

1. 对于薄的福尔马林固定的和石蜡包埋的组织切片，不必脱腊或切碎。
2. 大的组织可能不能被有效地消化并包含大量的DNA。使得裂解物非常粘稠阻止磁分离过程中DNA IQ™树脂的收集。

注意：加入温育缓冲液/蛋白酶 K 溶液至没过整个样品。

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。

干燥时间不要超过 20 分钟以免 DNA 难于洗脱。

注意：加入温育缓冲液/蛋白酶 K 溶液至没过整个样品。

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。

干燥时间不要超过 20 分钟以免 DNA 难于洗脱。

2. 加入新鲜制备的 50-100ul 温育缓冲液/蛋白酶 K 溶液。根据样品的类型，56℃ 温育 2 小时至过夜。大多数的组织可在两小时内完全消化，但福尔马林固定的和石蜡包埋的组织样品应该温育过夜。
3. 取出温育的样品管，加入两倍体积的 DNA IQ™ 系统中的裂解缓冲液（见注意事项 1-2）

注意：

1. 如果样品中存在大量的石蜡，管的顶部会形成一个石蜡层。在加入两倍体积的 DNA IQ™ 系统中的裂解缓冲液前，小心将 DNA 溶液转移到一个新的管中，不要吸取石蜡层。
2. 如果组织在裂解缓冲液中不能完全溶解，可将溶液放入一个新的管中。大的、未完全消化的组织块不应该转移到新管中。小的、未完全消化的组织块可通过离心去除，将离心后的上清液转移至新管中。小量的未消化的组织不干扰 DNA 的纯化。
4. 加入 7ul 完全悬浮的 DNA IQ™ 系统中的 DNA IQ™ 树脂。高速涡旋振荡 3 秒钟后室温温育 5 分钟。
5. 高速涡旋振荡 2 秒钟，将管子放在 MagneSphere® 磁分离架上。磁分离立刻进行。
6. 小心去除所有溶液，不要触碰管壁上的树脂。
7. 加入 100μl 配制好的裂解缓冲液，从磁分离架上取管子，并高速涡旋振荡 2 秒钟。
8. 将管子放回到磁分离架上，并去除所有的裂解液。
9. 加入 100μl 配制的 1 x 洗涤液，从磁分离架上取管子，并高速涡旋振荡 2 秒钟。
10. 将管子放回到磁分离架上，去掉所有洗涤液。
11. 重复步骤 9 和 10 两次，共 3 次洗涤，并确保在最后一次洗涤后，除去所有的液体。
12. 打开盖子，将管子放在磁分离架上，空气中干燥 5 分钟。
13. 根据 DNA 提取所用的检材量，加入 25—100μl 洗脱液，小的洗脱体积有助于获得终浓度较高的 DNA。
14. 盖上管盖并高速涡旋振荡 2 秒钟。65℃ 温育 5 分钟。15. 取出温育的管子，高速涡旋振荡 2 秒钟。立即放到磁分离架上。16. 将 DNA 溶液小心地转移到选定的容器中。

注意：DNA 溶液可以在 4℃ 作短期保存，在 -20 或 -70℃ 作长期保存。

II. 疑难解答

问题	可能原因	评论
样品没有被消化	组织块太大	将组织块切成小块。
	DTT 没有加入到温育缓冲液/蛋白酶 K 溶液中	确定温育缓冲液/蛋白酶K溶液中包含终浓度为 100mM DTT（见章节 III.A）。
DNA的产量低	起始样品中蛋白的含量太高	使用较少量的样品。样品中蛋白的量太大会与DNA IQ™树脂竞争结合 DNA。
	太多的微生物DNA	从组织中受污染最少的区域收集样品。
		微生物 DNA 会和人基因组 DNA 竞争结合 DNA IQ™ 树脂。提高加入的树脂量至 20ul 以提高全部的总DNA的产量。
大片段产物的扩增差	用于扩增的DNA量太大	定量人基因组DNA。
	样品中的DNA不完整	将每一个扩增循环中的延伸时间加倍以补偿 DNA 受损或降解所引起的扩增问题。

V. 参考文献

1. Linch, C.A. et al.(1998) Evaluation of the human hair root for DNA typing subsequent to microscopic comparison. *J. Forensic Sci.* **43**, 305-14
2. Hellmann, A et al.(2001) STR typing of human telogen hairs-A new approach. *Int. J. Legal Med.* **114**, 269-73

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
PolyAtract® System 1000 Magnetic Separation Stand	1 个	Z5410
DNA IQ™ Spin Baskets	1,000 个	V1221
ART® 20P, Pipet Tip 20µl	960 个	DY1071
ART® 20P, Pipet Tip 200µl	960 个	DY1121
ART® 20P, Pipet Tip 1,000µl	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