

D3591 Forensic DNA Kit

中文简易说明

√实验前请按说明书正确稀释以下试剂

➤ 使用【无水乙醇】对 DNA Wash Buffer 进行稀释，稀释后室温保存

货号	加入量
D3591-00	8mL
D3591-01	80mL (每瓶)
D3591-02	100mL (每瓶)

➤ 使用【异丙醇】对 HBC Buffer 进行稀释，稀释后室温保存

货号	加入量
D3591-00	1.6mL
D3591-01	20mL
D3591-02	32mL

Note: E.Z.N.A.[®] Forensic DNA Kit 为标准方案提供了足够的 Buffer，但在一些实验方案中(如口腔拭子方案)中需要增加溶液体积，则能提取的次数可能减少；另外，Omega Bio-Tek 可提供试剂单独购买，详情请参考目录中的“附件”部分或致电到客户服务部门了解价格信息。

提取步骤：

A. 从干血，体液和精斑中提取 DNA 的标准方案

1. 将血斑（或其他样品）从滤纸上剪下（每个血斑中最多可使用 200µl 血液），剪切成小块并加入到微量离心管中；

Note: 每个样品中含 3-4 个打孔圆（直径 3mm）。

2. 加入 200µl Buffer TL，在 55°C 孵育 15min，孵育期间每隔 2min 取出涡旋混匀；

3. 加入 25µl OB Protease Solution，涡旋混匀，60°C 孵育 45min，期间取出涡旋混匀几次，简单离心将管盖溶液甩下；

4. 加入 225µl Buffer BL，涡旋混匀，在 60°C 孵育 10min，离心将管盖溶液甩下；

5. 加入 300µl 异丙醇，涡旋混匀，离心将管盖溶液甩下；

6. 将 HiBind[®] DNA Mini column 套入到 2mL 收集管中；

7. 选做：

(1) 向 HiBind[®] DNA Mini column 中加入 100µl 3M NaOH；

(2) 室温静置 4min；

(3) 最大速度离心 30s；

(4) 弃滤液，将 HiBind[®] DNA Mini column 套回到 2mL 收集管中；

8. 转移步骤 5 中的混合液（包括不溶物）到 HiBind® DNA Mini column 中，最大速度离心 1min，弃滤液；

9. 将 HiBind® DNA Mini column 套回到 2mL 收集管中，加入 500µl Buffer HBC，8,000xg 离心 1min，弃滤液；

Note: HBC Buffer 在使用前必须按照说明书加入异丙醇稀释。

10. 将 HiBind® DNA Mini column 套回到 2mL 收集管中，加入 700µl DNA Wash Buffer，最大速度离心 1min，弃滤液；

Note: DNA Wash Buffer 在使用前必须按照说明书加入无水乙醇稀释。

11. 重复步骤 10；

12. 将 HiBind® DNA Mini column 套回到 2mL 收集管中，最大速度 (> 10,000xg) 空柱子离心 2min；此步骤除去残留的乙醇，否则可能会影响下游实验；

13. 将 HiBind® DNA Mini column 套入到新的 1.5mL 离心管中，加入 100µl 在 70°C 预热的 Elution Buffer，室温静置 3min，最大速度离心 1min 洗脱 DNA；

14. 重复步骤 13；

Note: 在 70°C 孵育比在室温静置的洗脱效果更好，另外，也可将第一次的洗脱液加回到柱子中进行二次洗脱，提高浓度。

15. 将 DNA 保存至 -20°C 中。

Tip: 手指刺血点的样通常含有不超过 50µl 的血液，能提取到 500ng-1µg 的 DNA，这足以进行 PCR 实验。为了获得更高浓度的 DNA，可用 50µl 预热的 Elution Buffer 或 TE 进行洗脱，也可用第一次的洗脱液进行二次洗脱。

B. 从新鲜或冻存的精液中提取基因组 DNA

Buffer A:	150 mM NaCl 10 mM EDTA, pH8.0	Buffer B:	100 mM Tris-HCl, pH8.0 10 mM EDTA 500 mM NaCl 1% SDS 2% β-巯基乙醇
------------------	----------------------------------	------------------	--

1. 将 50-250µl 的精液样品加入含有 10mL Buffer A 的到 15mL 离心管中；

Note: 使用 Corex 管可防止精子细胞附着在管壁上。

2. 涡旋 10s，2,500xg 离心 10min；

3. 小心吸除上清液，留下大约 1mL 的沉淀物和 Buffer A；

4. 涡旋 10s，最大速度离心甩下管盖溶液；

5. 将样品转移至一个新的 2mL 离心管中；

6. 向步骤 3 中的 15mL 离心管中加入 500 μ l Buffer A 冲洗管壁，涡旋 30s，最大速度离心将管壁或管盖上的液体甩下；
7. 将步骤 6 中的溶液转移至步骤 5 中的 2mL 离心管；
8. 最大速度离心 2min；
9. 小心弃除上清液，注意不要碰到精液沉淀；
10. 加入 200 μ l Buffer B，重悬沉淀；
11. 加入 50 μ l OB Protease Solution；
12. 置于 60 $^{\circ}$ C 孵育 2h，孵育期间可取出颠倒混匀数次；
13. 加入 250 μ l BL Buffer；
14. 加入 260 μ l 无水乙醇，涡旋混匀，离心甩下管盖或管壁上的液滴；
16. 将 HiBind[®] DNA Mini column 套入到 2mL 收集管中；
17. 选做：
 - (1) 向 HiBind[®] DNA Mini column 中加入 100 μ l 3M NaOH；
 - (2) 室温静置 4min；
 - (3) 最大速度离心 30s；
 - (4) 弃滤液，将 HiBind[®] DNA Mini column 套回到 2mL 收集管中；
18. 转移步骤 14 中的混合液到 HiBind[®] DNA Mini column 中，最大速度离心 1min，弃滤液；
19. 将 HiBind[®] DNA Mini column 套回到 2mL 收集管中，加入 500 μ l Buffer HBC，最大速度离心 1min，弃滤液；

Note: HBC Buffer 在使用前必须按照说明书加入异丙醇稀释。
20. 将 HiBind[®] DNA Mini column 套回到 2mL 收集管中，加入 700 μ l DNA Wash Buffer，最大速度离心 1min，弃滤液；

Note: DNA Wash Buffer 在使用前必须按照说明书加入无水乙醇稀释。
21. 重复步骤 20；
22. 将 HiBind[®] DNA Mini column 套回到 2mL 收集管中，最大速度 (> 10,000xg) 空柱子离心 2min；此步骤除去残留的乙醇，否则可能会影响下游实验；
23. 将 HiBind[®] DNA Mini column 套入到新的 1.5mL 离心管中，加入 100 μ l 在 70 $^{\circ}$ C 预热的 Elution Buffer，室温静置 3min，最大速度离心 1min 洗脱 DNA；
24. 重复步骤 23；

Note: 在 70 $^{\circ}$ C 孵育比在室温静置的洗脱效果更好，另外，也可将第一次的洗脱液加回到柱子中进行二次洗脱，提高浓度。

C. 从口腔拭子中提取基因组 DNA 的方案

1. 将棉签紧贴在内侧刮拭 6-7 次，收集细胞后在空气中或真空中干燥棉签 2 小时。供样者在收集前 30min 不应进食或饮水；
2. 将拭子棉头剪下，将棉头放入到 2mL 微量离心管中，加入 550 μ l PBS；
3. 加入 25 μ l OB Protease Solution 和 550 μ l BL Buffer，涡旋混匀 30s，在 60 $^{\circ}$ C 孵育 30min，涡旋混匀，离心将管盖上的溶液甩下；
4. 加入 550 μ l 无水乙醇，涡旋混匀，简单离心将管盖上的溶液甩下；
5. 将 HiBind[®] DNA Mini column 套入到 2mL 收集管中；
6. 选做：
 - (1) 向 HiBind[®] DNA Mini column 中加入 100 μ l 3M NaOH；
 - (2) 室温静置 4min；
 - (3) 最大速度离心 30s；
 - (4) 弃滤液，将 HiBind[®] DNA Mini column 套回到 2mL 收集管中；
7. 转移步骤 4 中的混合液到 HiBind[®] DNA Mini column 中，最大速度离心 1min，弃滤液；
8. 将 HiBind[®] DNA Mini column 套回到 2mL 收集管中，加入 500 μ l Buffer HBC，最大速度离心 1min，弃滤液；

Note: HBC Buffer 在使用前必须按照说明书加入异丙醇稀释。
9. 将 HiBind[®] DNA Mini column 套回到 2mL 收集管中，加入 700 μ l DNA Wash Buffer，最大速度离心 1min，弃滤液；

Note: DNA Wash Buffer 在使用前必须按照说明书加入无水乙醇稀释。
10. 重复步骤 9；
11. 将 HiBind[®] DNA Mini column 套回到 2mL 收集管中，最大速度 (> 10,000xg) 空柱子离心 2min；此步骤除去残留的乙醇，否则可能会影响下游实验；
12. 将 HiBind[®] DNA Mini column 套入到新的 1.5mL 离心管中，加入 200 μ l 在 70 $^{\circ}$ C 预热的 Elution Buffer，室温静置 3min，最大速度离心 1min 洗脱 DNA；
13. 重复步骤 12；

Note: 在 70 $^{\circ}$ C 孵育比在室温静置的洗脱效果更好，另外，也可将第一次的洗脱液加回到柱子中进行二次洗脱，提高浓度。
14. 将 DNA 产物保存至 -20 $^{\circ}$ C 中。

D. 从生物流体中提取细菌 DNA 的方案:

1. 在 5,000rpm 离心 10min 沉淀细菌;
2. 加入 200 μ l TL Buffer 来重悬细菌沉淀;
3. 按照 A 方案步骤 2 继续进行实验。

E. 唾液样品

1. 向预装有 6mL PBS 的 15mL 离心管中加入 1.5mL 的唾液样品, 涡旋混匀;
2. 2,000xg 离心 5min, 吸除上清液;
3. 加入 180 μ l PBS 重悬沉淀;
4. 将样品转移至 1.5mL 或 2mL 无酶离心管中

Note: 如果需要得到无 RNA 污染的 DNA, 可加入 20 μ l RNase A 至样品中, 室温静置 5min。

5. 加入 25 μ l OB Protease Solution 和 200 μ l BL Buffer, 涡旋混匀 30s;
6. 在 60 $^{\circ}$ C 孵育 15min, 孵育期间取出涡旋混匀数次;
7. 离心甩下管壁/管盖上的液滴;
8. 加入 200 μ l 无水乙醇, 涡旋混匀;
9. 按照方案 A 步骤 6 继续进行实验。

F. 毛发、指甲和羽毛样品

1. 将样品切成小块 (0.5-1cm), 转移至 1.5mL 无酶离心管中;

Tip: 头发样品, 从头发的根部剪下来; 羽毛样品, 选用细小的初龄羽毛。(可使用大型鸟类, 选用次尾或胸羽)

2. 加入 250 μ l TL Buffer, 25 μ l OB Protease Solution 和 20 μ l 1M DTT, 涡旋混匀;
3. 置于 60 $^{\circ}$ C 孵育 30min, 孵育期间可取出混匀数次;
4. 加入 250 μ l BL Buffer, 涡旋混匀;
5. 离心甩下管壁/管盖上的液滴;
6. 加入 250 μ l 无水乙醇, 涡旋混匀;
7. 按照方案 A 步骤 6 继续进行实验。

中文翻译仅供辅助阅读, 详情请以英文说明书为准