

# TBONE EX KIT

硬组织（牙齿/骨骼）DNA 提取改进方法

- 20 人份 -

[室温稳定]

操作手册

第 4 版 (V3.4)

	目录	页码
1	关于「TBONE EX KIT」 .....	2
2	试剂盒组分和储存条件 .....	3
3	用户自备仪器和试剂 .....	4
4	DNA 提取流程 .....	5
5	实验环境准备 .....	6
6	牙齿和骨骼 DNA 提取步骤 .....	7
7	参考和疑难解答 .....	11
8	声明 .....	12

## 1. 关于「TBONE EX KIT」

本产品是从硬组织如骨骼和牙齿中提取 DNA 的改进方法。

用户可以从质量较差的样本，如泥土中长久掩埋的尸体，灾难受害者（如火灾，洪灾，飓风，地震，坠机等）中提取 DNA，进行线粒体 DNA 测序和短串联重复序列（STR）分析。

使用本试剂盒，用户无需进行样本研磨，可以直接使用整个牙齿或一小块骨骼。

用户需要自备部分试剂和耗材完成整个提取流程，请参考 [3. 用户自备仪器和试剂]。

如果对所推荐使用的试剂有疑问，请联系生厂商。

## 2. 试剂盒组分和储存条件

### ●TBONE EX KIT (20 人份)

#### 【组分】

- 溶液 A (30 mL, 绿帽) : 20 管
- 溶液 B (1.9 mL, 红帽) : 20 管
- 溶液 C (600  $\mu$ L, 蓝帽) : 20 管

#### 【储存】

所有试剂必须室温 (15°C~25°C) 避光储存。

#### 【有效期】

请在试剂盒包装上标明的有效期前使用。试剂开盖后请尽快使用。未开盖试剂可以室温保存。

#### 【安全信息】

人眼或皮肤直接接触溶液 A 是有危害性的, 会导致灼伤。请参考试剂盒中的物料安全数据表 (MSDS), 并小心使用。

### 3. 用户自备仪器和试剂

#### ① 指定试剂

DNA 提取步骤中，用户需要使用以下试剂盒或类似的产品。

【Product】	【Manufacturer】
QIAamp® DNA Mini and Blood Mini	QIAGEN
PrepFiler® BTA Forensic DNA Extraction Kit	Thermo Fisher Scientific

\*如果使用 PrepFiler BTA Forensic DNA Extraction Kit 试剂盒, 可以跳过步骤「6-4. DNA 提取」(参见「6-4. DNA 提取」)。

#### ② 其它试剂 (未指明生产商)

- 蛋白酶 K
- TE 饱和酚
- 纯水
- 100% 乙醇
- 次氯酸钠溶液 (清洁台面)

#### ③ 耗材(未指明生产商)

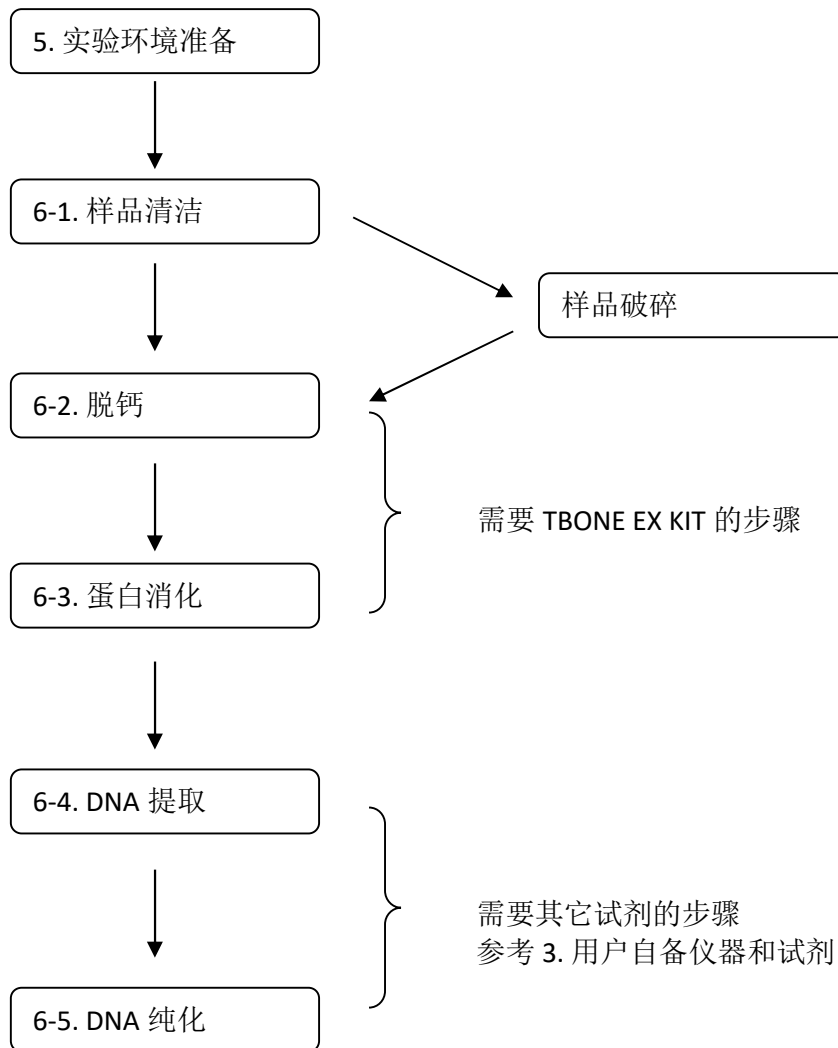
- 中性去污剂(厨房洗碗剂)
- 牙刷
- 牙科探针 (可选)
- 1.5 mL 离心管

#### ④ 仪器 (未指明生产商)

- 吹风机
- 离心机
- 孵育器

## 4. DNA 提取流程

下面是使用 TBONE EX KIT 进行 DNA 提取的流程图。



## 5. 实验环境准备

### ① 物理分离

建议从 PCR 实验台中分出一个台面用于 DNA 提取。并且 DNA 扩增后应避免再次使用提取台面。同时建议将孵育器和离心机放置在附近的实验台上，避免携带样品来回走动。

### ② 人员防护

如果样品被污染那么除样品以外的其它 DNA 也会被扩增出来，而且一些物质可能会抑制 PCR。因为这些原因，工作人员应小心不要造成任何污染。请洗手，穿戴实验服，手套（经常更换），帽子和口罩。

### ③ 实验台准备

移除其它不需要物体，创造一个洁净的实验环境。使用次氯酸钠溶液浸湿的纸巾擦拭台面，然后使用纯水清洁台面。

### ④ 工具和仪器准备

使用次氯酸钠溶液和纯水按照步骤③的方法清洁移液器，离心机和孵育器。使用灭菌去离子水清洗牙刷和牙科探针等样品清洁工具。管和枪头必须是一次性使用不能重复利用。

### ⑤ 其它

请遵守实验室和机构各自规定，参照 MSDS 和当地规定处理样品和试剂。

## 6. 牙齿和骨骼 DNA 提取步骤

### 6-1. 样品清洁

#### (1) 中性去污剂清洁

用牙刷使用稀释的中性去污剂清洁样品表面。必要时使用牙科探针清除污垢。使用灭菌去离子水冲洗样本将去污剂冲洗干净。

#### (2) 乙醇清洁

使用 100%乙醇冲洗样本，然后将样本放置到塑料托盘中。使用吹风机吹干样品表面和内部水分。

如果样本骨骼较大，可以使用电工刀切成合适大小，使样品尽可能多的浸没到「6-3. 蛋白消化」溶液中。作为参考，样品重量约为 0.5g 或者大小为 1cm x 0.5cm x 0.5cm。

注意：

\* 立即提取 DNA ⇒ 转到「6-2. 脱钙」

\* 稍后提取 ⇒ 转到「(3) 保存」.

#### (3) 保存

如果不立即使用样品，将样品室温（23℃）避光保存在 50mL 离心管中。

### 6-2. 脱钙

#### (1) 孵育

将样品放入溶液 A 中，23℃孵育 12 小时。孵育过程中颠倒混匀 3 至 4 次。

孵育 12 小时后，将温度调至 37℃。同时提前将溶液 B 放置在孵育器中预热 15min。



**(2) 添加溶液 B**

向 50mL 离心管中加入 1.8mL 预热的溶液 B，拧紧管盖，颠倒混匀 3 至 4 次。37℃ 孵育 2 小时。孵育过程中颠倒混匀 3 至 4 次。

注意：确保在添加溶液 B 前将孵育器提前加热至 37℃。

**(3) 设置孵育器**

将样品从孵育器中取出，调整温度至 56℃ 用于「6-3. 蛋白消化」。

**(4) 移除溶液 A 和溶液 B**

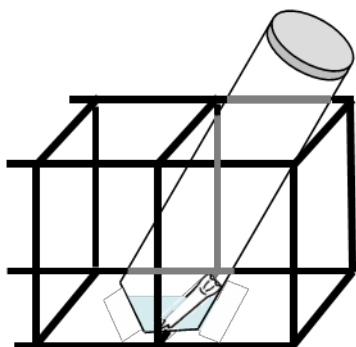
使用一次性 50mL 移液管从样品中移除溶液 A 和溶液 B。短暂离心后将残余液体完全移除。

**6-3. 蛋白消化****(1) 添加溶液 C**

向「6-2(4)」中的 50mL 离心管加入 400 $\mu$ L 溶液 C，尽量不要接触管壁。

**(2) 添加蛋白酶 K**

加入 50 $\mu$ L 蛋白酶 K (20mg/mL) 并倾斜离心管使样品完全浸没【图 1】。56℃ 孵育 3 小时。孵育过程中旋转混匀 3 至 4 次，保持液体在管底部【图 2】。



【图 1. 倾斜离心管完全浸没样品】



【图 2. 旋转混匀】

## 6-4. DNA 提取

\*如果使用“PrepFiler BTA Forensic DNA Extraction Kit”试剂盒，可以跳过「6 - 4」（酚-氯仿）DNA 提取步骤。然而，如果跳过酚-氯仿提取步骤，DNA 结合将需要更长时间。

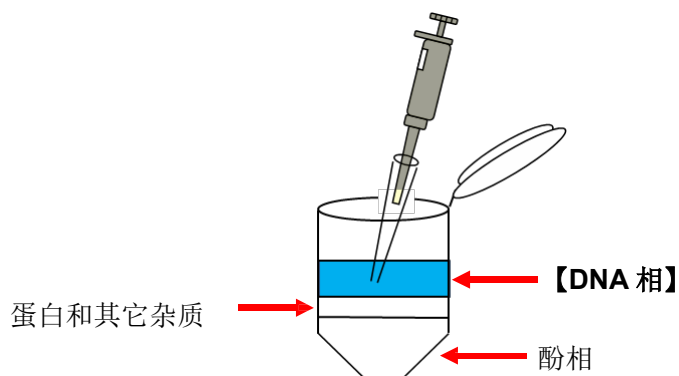
### (1) 添加 TE 饱和酚

转移「6-3(2)」的混合液（约 500 $\mu$ L）至 1.5mL 离心管中。加入 TE 饱和酚颠倒混匀 15 次。

注意：TE 饱和酚有毒性和腐蚀性。直接接触眼睛或皮肤是有害的。如果通过皮肤吸收会导致中毒，并且会抑制中枢神经系统。请佩戴好手套并小心操作。

### (2) 相分离

13,000rpm 离心 5 分钟。转移上层含有 DNA 的水相（约 400 $\mu$ L）至一个新的离心管中。



【图 3 相分离和样品转移】

注意：如【图 3】所示，轻轻移除上层水相，不要触碰到蛋白层。蛋白和其它杂质有可能是不可见的。小心不要触碰有机相。

## 6-5. DNA 纯化

\*继续使用下面的 DNA 提取试剂盒进行 DNA 纯化，这些试剂盒已经测试过可以跟 TBONE EX KIT 兼容。

【Product】	【Manufacturer】
QIAamp® DNA Mini and Blood Mini	QIAGEN
PrepFiler® BTA Forensic DNA Extraction Kit	Thermo Fisher Scientific

用户也可以继续使用自己常用的 DNA 纯化方法。

### < 示例 >

如果用户使用「QIAamp® DNA Blood Mini Kit」;

- (1) 在「6-4(2)」样品中加入约 400 $\mu$ L 的缓冲液 AL。
- (2) 加入 400 $\mu$ L 100%乙醇，涡旋混匀。
- (3) 转移到离心柱中，按照「QIAamp® DNA Blood Mini Kit」的洗涤步骤操作。
- (4) 从离心柱上洗脱 DNA，进行下游实验，如 PCR 进行线粒体测序和 STR 分析。

## 7. 参考和疑难解答

	Question	Answer
【1】	有关于这个产品的文章吗?	请参考「Evaluation of a new experimental kit for the extraction of DNA from bones and teeth using a non-powder method. Leg Med (Tokyo). 2010 Mar;12(2): 84-9. Epub 2010 Jan 27.」
【2】	溶液 B 中有少许沉淀。	37°C 孵育至完全溶解。
【3】	步骤「6-4(1)」中的液体体积太大无法加入到 1.5mL 离心管中。	有可能脱钙步骤中的「6-2(4)」步液体未完全移除。可以转移到 2mL 离心管中继续实验或者使用超滤离心柱浓缩至约 500μL。
【4】	可以获取该手册电子版吗?	请联系弘德网客服索取。
【5】	我的样品在蛋白消化步骤「6-3」中，没有完全分解。	样品分解程度取决于样品条件以及样品大小。清洁不完全或者脱钙不完全影响蛋白消化效果。完全分解对于获取 DNA 是非必需的。
【6】	不能提取足够的 DNA	将样品破碎成小块有助于 DNA 提取。或者，可以尝试在洗去之前的溶液后重新提取该样品(参考文献【1】中的方法)。

## 8. 声明

### ① 使用须知

使用前请勿重新分装试剂避免造成试剂污染其它 DNA。试剂是由指定的已经确定基因组信息的人员生产。

### ② 版权

不得编辑、复制或重制本手册的部分或全部并发给第三方。

### ③ 免责声明

1. 不赔偿因使用本试剂盒造成的损失（直接或间接损失，利益损失等任何损失）。
2. 本试剂盒说明书如有更改恕不提前通知。
3. 信息最后更新日期: 2015 年 12 月