

# 司法调查样本 DNA 提取

## 说明书

组分 \ 编号	ZD-TG-15-50	ZD-TG-15-100	ZD-TG-15-200
微量离心柱	50 个/包×1	50 个/包×2	50 个/包×4
1.5 ml 离心管	50 个/包×1	50 个/包×2	50 个/包×4
过滤柱	50 个/包×1	50 个/包×2	50 个/包×4
溶液 ST	60 ml/瓶×1	60ml/瓶×2	120 ml/瓶×2
溶液 GK	12 ml/瓶×1	25ml/瓶×1	25 ml/瓶×2
溶液 GH	30 ml/瓶×1	60ml/瓶×1	120 ml/瓶×1
溶液 W1	8ml/瓶×1	20ml/瓶×1	40 ml/瓶×1
溶液 W1A	9ml/瓶×1	9 ml/瓶×1	18 ml/瓶×1
溶液 W2	6 ml/瓶×1	12 ml/瓶×1	24 ml/瓶×1
Proteinase K	5mg/管×1	5mg/管×2	5mg/管×4
蛋白酶 K	5mg/管×1	5mg/管×2	5mg/管×4
溶液 TE	6ml/瓶×1	12 ml/瓶×1	12 ml/瓶×2
说明书	1 份	1 份	1 份

### ○存储和稳定性

- Proteinase K（固体）和蛋白酶（固体）置于 2~8℃ 长期保存。其余组分室温避光储存。
- 保质期：12 个月。

### ○产品介绍

产品适用于多种法医和人类身份鉴定样本。试剂盒采用独特的试剂配方以及特别制造的固相吸附介质。在缓冲液作用下，DNA 从样本中释放，吸附于高性能的固相基质，洗脱后即获得高纯度 DNA。

### ○使用前准备

- 阅读说明书，备好必需试剂和仪器。

自备试剂、耗材和仪器：无水乙醇、异丙醇、纯水、合适规格离心管（1.5ml 或 2ml）、小型离心机、水浴锅（或可加热振摇的仪器）。

对于组织、拭子、FTA 和 Guthrie 卡、口香糖、烟蒂、指甲和毛发、纸质材料，需准备剪刀或适当的切割装置。

对于小体积血液或唾液、性侵犯样本，需准备生理盐水。

对于指甲和毛发、精液斑和性侵犯样本，需准备 1M DTT。

对于骨头和牙齿，需准备研磨器。

- ◇ 首次使用前，分别向溶液W1、溶液W1A和溶液W2 瓶中按标签要求加入无水乙醇，摇匀后标记备用。

首次使用前，每管Proteinase K用 1100μl纯水完全溶解。每管蛋白酶K用 275μl纯水完全溶解。酶溶解后如未能立即用完，应按每次用量将酶液分装成小份后-20℃ 保存备用，避免反复冻融造成酶活力下降。

- ◇ 盒中的 1.5ml离心管专用于收集最后一步的DNA溶液。

- ◇ 离心均室温进行。

- ◇ 每次使用溶液 ST 前，观察液体是否浑浊或沉淀（室温过低会浑浊或出现沉淀）。若低温导致溶液 ST 浑浊或析出沉淀时，可在 50℃ 左右水浴中重新溶解，摇匀后使用。

## ○操作说明

### 1. 样本处理

注 1: 处理固体样本时, 消化液 GK/ST 应浸没样本。如样本未被完全浸没, 需增加消化液用量, 同时按比例增加 Proteinase K 用量。后续加入消化液等体积的溶液 GH 及异丙醇(即加入的消化液与溶液 GH 及异丙醇体积比为 1:1:1)。消化液用量大于 200 $\mu$ l 时步骤“2”中需多次离心过柱。

注 2: 56 $^{\circ}$ C 温育期间颠倒混摇可大幅提升消化速度, 用自动混摇仪消化效果更佳。

#### 1.1 组织

将组织切碎(尽可能小), 取 1~10mg 于 1.5ml 离心管中, 加入溶液 ST 200 $\mu$ l 及 Proteinase K 5 $\mu$ l, 充分混匀。56 $^{\circ}$ C 温育至组织被完全消化(2~3h 或过夜), 期间缓慢颠倒混摇。加入 200 $\mu$ l 溶液 GH 及 200 $\mu$ l 异丙醇, 充分混匀。12000 $\times$ g 离心 1min, 取上清, 至步骤“2”。

#### 1.2 含组织细胞的拭子

取拭子头于 1.5ml 离心管中, 加入 10 $\mu$ l Proteinase K 及 400 $\mu$ l 溶液 ST, 涡旋混匀 15sec。56 $^{\circ}$ C 温育 1h, 期间缓慢颠倒混摇。将拭子头及裂解液全部移入套有收集管的过滤柱中, 12000 $\times$ g 离心 1min。弃过滤柱, 向收集管液体中加入 400 $\mu$ l 溶液 GH 及 400 $\mu$ l 异丙醇, 充分混匀, 12000 $\times$ g 离心 1min, 取上清, 至步骤“2”。

#### 1.3 FTA 和 Guthrie 卡

用打孔机从干燥的斑点上切下直径 3mm 的孔片。取 3 个孔片于 1.5ml 离心管中, 加入 Proteinase K 5 $\mu$ l 及 200 $\mu$ l 溶液 ST, 涡旋混匀 15sec。56 $^{\circ}$ C 温育 1h, 期间缓慢颠倒混摇。加入 200 $\mu$ l 溶液 GH 及 200 $\mu$ l 异丙醇, 充分混匀。12000 $\times$ g 离心 1min, 取上清, 至步骤“2”。

#### 1.4 体液斑(沾有血液、唾液的材料)

取 0.5cm<sup>2</sup> 斑点材料, 切成小块后移入 1.5ml 离心管。加入 Proteinase K 5 $\mu$ l 及 200 $\mu$ l 溶液 ST, 涡旋混匀 15sec。56 $^{\circ}$ C 温育 1h, 期间缓慢颠倒混摇。加入 200 $\mu$ l 溶液 GH 及 200 $\mu$ l 异丙醇, 充分混匀。12000 $\times$ g 离心 1min, 取上清, 至

步骤“2”。

#### 1.5 口香糖

取约 20mg 口香糖, 切成小块后移入 1.5ml 离心管。加入 Proteinase K 5 $\mu$ l 及 200 $\mu$ l 溶液 ST, 涡旋混匀 15sec。56 $^{\circ}$ C 温育 3h, 期间缓慢颠倒混摇。加入 200 $\mu$ l 溶液 GH 及 200 $\mu$ l 异丙醇, 充分混匀。12000 $\times$ g 离心 1min, 取上清, 至步骤“2”。

#### 1.6 烟蒂

从香烟或过滤嘴的末端取 1cm<sup>2</sup> 外层纸, 切成小块后移入 1.5ml 离心管。加入 Proteinase K 5 $\mu$ l 及 200 $\mu$ l 溶液 ST, 涡旋混匀 15sec。56 $^{\circ}$ C 温育 1h, 期间缓慢颠倒混摇。加入 200 $\mu$ l 溶液 GH 及 200 $\mu$ l 异丙醇, 充分混匀。12000 $\times$ g 离心 1min, 取上清, 至步骤“2”。

#### 1.7 指甲和毛发

将指甲/约 0.5cm 含发根的毛发一段/约 0.5cm 不含发根的毛发多段移入 1.5ml 离心管。加入 Proteinase K 5 $\mu$ l、1M DTT 15 $\mu$ l 及溶液 GK 200 $\mu$ l, 涡旋混匀 15sec。56 $^{\circ}$ C 温育至样本块被完全消化(需 1~2h 或过夜, 大块指甲推荐 56 $^{\circ}$ C 过夜消化), 期间缓慢颠倒混摇。加入 200 $\mu$ l 溶液 GH 及 200 $\mu$ l 异丙醇, 充分混匀。12000 $\times$ g 离心 1min, 取上清, 至步骤“2”。

#### 1.8 纸质材料(如信封盖和邮票上的唾液或文件上的指纹)

从纸质材料上切下 0.5~2.5cm<sup>2</sup> 的样本, 切成小块后移入 1.5ml 离心管。加入 Proteinase K 5 $\mu$ l 及 200 $\mu$ l 溶液 ST。涡旋混匀 15sec。56 $^{\circ}$ C 温育 1h, 期间缓慢颠倒混摇。加入 200 $\mu$ l 溶液 GH 及 200 $\mu$ l 异丙醇, 充分混匀。12000 $\times$ g 离心 1min, 取上清, 至步骤“2”。

#### 1.9 小体积血液或唾液

取 5 $\mu$ l 蛋白酶 K 于 1.5ml 离心管中, 加入血液或唾液 100 $\mu$ l (不足 100 $\mu$ l 时用生理盐水补足), 再加入溶液 GH 100 $\mu$ l, 涡旋混匀 15sec。37 $^{\circ}$ C 温育 10min。加入 100 $\mu$ l 无水乙醇, 充分混匀。12000 $\times$ g 离心 1min, 取上清, 至步骤“2”。

#### 1.10 激光显微切割标本

取激光显微切割标本于 1.5ml 离心管中, 加入 Proteinase K 5 $\mu$ l 及 200 $\mu$ l

溶液 ST, 涡旋混匀 15sec。56□ 温育 3h, 期间缓慢颠倒混摇。加入 200μl 溶液 GH 及 200μl 异丙醇, 充分混匀。12000×g 离心 1min, 取上清, 至步骤“2”。

### 1.11 骨头和牙齿

将骨头或者牙齿研磨成细粉。取 25mg, 加入 Proteinase K 5μl 及 200μl 溶液 ST, 涡旋混匀 15sec。56□ 过夜孵育, 期间缓慢颠倒混摇。加入 200μl 溶液 GH, 充分混匀。12000×g 离心 3min。取上清于新离心管中, 加入 1/2 体积的异丙醇, 充分混匀。至步骤“2”。

注: 注意! 骨粉会吸附加入异丙醇后液体中的 DNA, 所以需在离心去除骨粉/牙粉后向上清中加入异丙醇。如加异丙醇混匀后液体浑浊或沉淀, 12000×g 离心 1min, 取上清液, 至步骤“2”。

### 1.12 性侵犯样本

取拭子或 <0.5cm<sup>2</sup> 的织物于 1.5 ml 离心管中, 加入 Proteinase K 10μl 及 400μl 溶液 ST, 涡旋混匀 15sec。56□ 温育至少 1h, 期间缓慢颠倒混摇。然后将裂解液及固体 (拭子或织物) 全部移入套有收集管的过滤柱中, 12000×g 离心 1min。弃去过滤柱。12000×g 离心 5min。如需获取女性上皮细胞 DNA 用步骤“a”, 获取精子 DNA 用步骤“b”。

#### a、女性上皮细胞 DNA

小心将上层液体 300μl 移入新的离心管中。加入等体积的溶液 GH 及无水乙醇 (即上层液、溶液 GH 及无水乙醇的体积比为 1:1:1), 充分混匀。12000×g 离心 1min, 取上清, 至步骤“2”。

#### b、精子 DNA

小心移除上层液体, 只保留最底部的 20μl。加入生理盐水 500μl, 重悬沉淀, 12000×g 离心 5min, 勿搅动沉淀, 小心移除上层液体, 只保留最底部的 20μl。

按上述方法重复清洗 3 次后, 向管中加 Proteinase K 10μl、1M DTT 10μl 及 200μl 溶液 ST, 涡旋混匀 10sec。56□ 温育至少 1h, 期间缓慢颠倒混摇。加入 240μl 溶液 GH 及 240μl 异丙醇, 充分混匀。最高转速 (12000×g 以上)

离心 1min, 取上清, 至步骤“2”。

2. 将液体移入套有收集管的微量离心柱中 (每次最多移入 600μl, 多于 600μl 时分多次离心), 8000×g 离心 2min。弃去收集管中废液, 将离心柱放回收集管中。

注: 本步及后续步骤中离心后如发现微量柱中有液体残留时, 需增加转速再次离心使液体全部滤过。

3. 血液或唾液采用步骤“3a”, 其他样品按步骤“3b”进行试验:

3a. 向离心柱中加入 200μl 溶液 W1, 8000×g 离心 1min。至步骤“4”。

3b. 向离心柱中加入 200μl 溶液 W1A, 8000×g 离心 1min。至步骤“4”。

4. 向离心柱中加入 200μl 溶液 W2, 8000×g 离心 30sec。弃去收集管中废液, 将离心柱放回。

5. 重复步骤“4”一次。

6. 12000×g 离心 2min。

7. 将离心柱取出后放入新的 1.5ml 离心管中 (使用前将离心管柄处按包装袋上示意图做弯折处理)。向柱中央加入 5~20μl 溶液 TE, 室温放置 2~3min。

12000×g 离心 1min。DNA 溶液即收集在 1.5ml 离心管中。

注意! 核酸溶液用于后续分析前, 12000×g 离心 1min, 小心吸取液体上清使用, 不可振摇或吸打混匀液体, 这会吸入底部沉淀的从柱子上掉落的颗粒, 造成检验结果异常。

注): 为提高得率, 可向离心柱中央再加入 5~20μl 溶液 TE, 室温放置后离心收集 DNA 溶液。注意这会增大溶液体积并降低 DNA 浓度。也可将离心收集的 DNA 溶液重新加回柱膜中央后室温放置 2min, 12000×g 离心 1min 收集液体, 这可提升 DNA 浓度但在提高得率方面稍逊于前法。

## 宁波市重鼎生物技术有限公司

主页: <http://www.genepure.com>

电话: 4008780133