
 National Biobank Consortium of Taiwan (網頁連結)	國家級人體生物資料庫整合平台 標準作業程序	編號: NBCT SOP-004
	標題: 整合平台新鮮冷凍組織檢體 採集與 DNA 萃取流程	版本/總頁數: 第 1.1 版/17 頁
		發布日期: 114-12-01

本文件歷次變更紀錄：

版本	制定單位	核可日期	核可者	發布日期
1.0	中央辦公室	110-07-14	衛生福利部	110-07-20
1.1	中央辦公室	114-09-16	衛生福利部	114-12-01

目錄

一、目的.....	2
二、範圍.....	2
三、權責.....	2
四、說明.....	2
五、作業流程	
5.1 手術切除或切片取得之新鮮冷凍組織檢體採集.....	2
5.2 冷凍組織包埋及切片染色判讀.....	3
5.3 冷凍組織DNA萃取.....	4
5.4 冷凍組織DNA純化（視需要）.....	7
5.5 冷凍組織DNA品質檢測（進行水平電泳鑑定）.....	8
5.6 製備冷凍組織小塊供蛋白質抽取用.....	10
六、出庫品質標準.....	11
七、參考文獻.....	12
八、附件	
一:利用超微量分光光度計測量冷凍組織 DNA 濃度和 O.D 值範例.....	12
二:冷凍組織抽取之 DNA 濃度，O.D 值，和水平電泳跑膠圖範例.....	14
三:冷凍組織腫瘤成分判讀範例.....	15

 National Human Biobank Consortium of Taiwan (網頁連結)	國家級人體生物資料庫整合平台 標準作業程序	編號: NBCT SOP-004
	標題: 整合平台新鮮冷凍組織檢體 採集與 DNA 萃取流程	版本/總頁數: 第 1.1 版/17 頁
		發布日期: 114-12-01

一、目的

「國家級人體生物資料庫整合平台」(下稱整合平台)主要透過雲端整合國內人體生物資料庫,資料、生物檢體及其資訊(下稱整合平台檢體資料),並供全國醫學、臨床、產業及相關醫療生技研究者申請使用。為能夠達成跨機構的合作,需要建立一致性的檢體出庫品質標準和臨床資料內容。為維持檢體的良好品質,使新鮮冷凍組織檢體採集與 DNA 操作之步驟具有一致性,以利未來進行相關研究,因此訂定此標準作業流程。

二、適用範圍

此作業流程適用於從新鮮冷凍組織檢體採集到萃取組織 DNA,完成品質檢測的流程。

三、權責

所有加入整合平台之人體生物資料庫,欲將其所收集之人體組織萃取 DNA 時,建議都依此標準作業流程辦理,或是必須達到相同品質及產出量。

四、說明

此作業流程可以分為五個階段


1. 手術切除或切片取得之新鮮冷凍組織檢體採集
2. 冷凍組織包埋及切片染色判讀
3. 冷凍組織 DNA 萃取
4. 冷凍組織 DNA 純化(視需要)
5. 冷凍組織 DNA 品質檢測(進行水平電泳鑑定)

五、作業流程

5.1 手術切除或切片取得之新鮮冷凍組織檢體採集

材料與設備: 冷凍小管、滅菌過尖頭小鑷子(11cm)、解剖刀片、鋁箔紙、液態氮、保溫瓶,抗凍貼紙、-80℃冰箱或液態氮桶

步驟: 在取得個案同意之後,先準備好欲留存組織之冷凍小管,貼上已編號之抗凍貼紙,並先用保溫瓶裝取適量之液態氮。在病理科醫師之指導下,切取病理檢查後剩餘之手術或切片取得之組織檢體,分為腫瘤組織及週邊非腫瘤組織,放在鋁箔紙上,立即用解剖刀片切成小塊(大約 5x5x5 mm³),用液態氮迅速冷凍,

 National Health Research Institute (網頁連結)	國家級人體生物資料庫整合平台 標準作業程序	編號: NBCT SOP-004
	標題: 整合平台新鮮冷凍組織檢體 採集與 DNA 萃取流程	版本/總頁數: 第 1.1 版/17 頁
		發布日期: 114-12-01

用尖頭小鑷子，放入冷凍小管(一管可以放很多塊)，保存於-80°C冰箱/液態氮桶。

注意事項:

1. 由於採集新鮮組織檢體有多變數，需要配合實際狀況處理。
2. 須以足夠組織做病理診斷為優先，若剩餘組織不夠，就不留存冷凍組織。
3. 切取之腫瘤組織檢體已經很小時，就不用再切成小塊。
4. 有時開刀開得很晚，無法當日收集，若開刀房人員可以協助先冷藏於 4°C 冰箱 (不可以泡福馬林)，可以隔夜再取(要註記隔夜取)，不要放棄這個檢體，新鮮檢體若快速放入冰箱冷藏，即使隔夜再取，有些組織的 DNA 品質仍可以很好。

5.2 冷凍組織包埋及切片染色判讀


設備:-80°C冰箱、冷凍切片機、染色機、封片機

耗材:

1. 鋁箔紙模(說明:將鋁箔紙裁切成約 4 公分正方形，利用白板筆尾端當模型，作成鋁箔紙模。)
2. OCT
3. 滅菌過尖頭小鑷子(11cm)
4. 100ml 燒杯
5. 檢體紙盒 (10x10 格)(需把內格紙間格抽掉，讓格子空間變成 5x5 格，可以放 25 個鋁箔紙模。)
6. 1.5ml 微量離心管(eppendorf)
7. 保麗龍箱 (裝冷凍組織與乾冰)
8. 乾冰
9. 玻片

步驟:

1. 要抽取組織 DNA 前，先備好保麗龍箱 (已裝好乾冰)，以及待取名單，從-80°C 冰箱將裝冷凍小管的 9x9 格檢體紙盒，取出放在保麗龍箱(已裝好乾冰)，一一取出冷凍組織塊放入各個已寫好編號之微量離心管。然後將冷凍小管一一歸位。此動作需有兩人，另一人負責核對放入之已編號之微量離心管是否正確。
2. 將已裝有待取名單組織之微量離心管放置 9x9 格檢體紙盒，收在於-80°C冰箱待用。
3. 將鋁箔紙模側邊寫上檢體編號待用。
4. 將已裝有冷凍組織塊之微量離心管的檢體紙盒取出，放入裝有乾冰的保麗龍箱內，保持冷凍待用。

 National HiBank Consortium of Taiwan (網頁連結)	國家級人體生物資料庫整合平台 標準作業程序	編號: NBCT SOP-004
	標題:	版本/總頁數: 第 1.1 版/17 頁
	整合平台新鮮冷凍組織檢體 採集與 DNA 萃取流程	發布日期: 114-12-01

5. 在裝有乾冰的保麗龍箱內，將寫上檢體編號的鋁箔紙模放置於乾冰上，用滅菌過的鑷子從微量小管夾取組織檢體，將其最大面積朝下快速放入鋁箔紙模底部，加入 OCT 將檢體完全覆蓋，全程盡量避免組織解凍。
6. 將使用過鑷子放入裝有清水的燒杯中，之後再一起清洗滅菌。
7. 等 OCT 凍成白色，放入已拆成 5x5 格的檢體紙盒。並置於-80°C 冰箱，冷凍半小時後，就可以做冷凍切片。需註記每一格子內的組織編號。
8. 由-80°C 冰箱拿出已冷凍完成之 OCT 包埋的組織檢體，撕掉鋁箔紙，放入冷凍切片機中，以 4 um 厚度進行切片(玻片已寫好編號)，室溫風乾至少 2 小時後，才進行 H&E 染色。若能風乾四小時或隔夜更佳，以防掉片。
9. 請病理醫師判讀腫瘤診斷和百分比，並建檔。

注意事項:

1. 全程皆須注意編號是否一致。
2. OCT 包埋時，組織可能會稍微解凍，較有利與 OCT 密切接合。這個不影響 DNA 的品質。但是若要抽 RNA，就一定不能有解凍過。因此抽取 RNA，最好是選取冷凍組織已經有切片確認者，不需再做冷凍切片。


5.3 冷凍組織 DNA 萃取

設備:

1. 水浴槽(說明: 需要兩台, 溫度分別為: 55°C 與 37°C。)
2. -80°C 冰箱
3. 微電腦大容量高速離心機
4. 桌上型微量高速冷凍離心機(eppendorf centrifuge 5415 R 或同等級產品)
5. 桌上型微量高速離心機
6. 超微量分光光度計(Thermo NANODROP 2000 或同等級產品)
7. 上下震盪混合器(FN-CR95 或同級產品)
8. 微量吸管(pipetman)(1,000ul、200ul、10ul)
9. 純水系統
10. 化學排煙櫃(chemical hood)

試劑:

1. 細胞溶解液(cell lysis solution)(QIAGEN, Cat.No.158908)
2. 蛋白酶 K(proteinase K)(Ambion, AM2546, 20mg/ml)
3. 核糖核酸酶 (RNase)(AMRESCO CAT#0675-1G, 10mg/ml) 以 500ul 分裝於 1.5ml 微量離心管(eppendorf), 冷凍存放-20°C 備用。
4. 蛋白質沉澱液 (Protein Precipitation solution)(QIAGEN, Cat.No.158912)

 (網頁連結)	國家級人體生物資料庫整合平台 標準作業程序	編號: NBCT SOP-004
	標題: 整合平台新鮮冷凍組織檢體 採集與 DNA 萃取流程	版本/總頁數: 第 1.1 版/17 頁
		發布日期: 114-12-01


5. 100%異丙醇 (100% isopropanol)
6. 75%乙醇 (75% EtOH)
7. 滅菌過的二次水, ddH₂O (簡稱二次水)

耗材:

1. 抗汗紙(說明: 裁切數個約 5 公分正方形抗汗紙)
2. 鋁箔紙(說明: 將鋁箔紙裁切約 5 公分正方形)
3. 石蠟封口膜(parafilm)(說明: 將 parafilm 裁切約 5 公分正方形)
4. 滅菌過尖頭小鑷子(11cm)
5. 乾冰
6. 21 號手術刀片
7. 15ml 尖底離心管(說明: 每個組織檢體各需要三支 15ml 尖底離心管)
8. 1.5ml 微量離心管(eppendorf)
9. 3ml 滴管(dropper)
10. 過濾型試滴管尖頭(Filter tip) (1,000ul、200ul、10ul)
11. 檢體紙盒(9x9 格)


步驟:

1. 備好已寫好編號的鋁箔紙和石蠟封口膜, 在上蓋及側邊寫好檢體編號的 15ml 尖底離心管(三支), 以及 1.5ml 微量離心管。
2. 打開水浴槽, 並將溫度調至 55°C。
3. 從-80°C冰箱將「已確認腫瘤診斷和百分比」的 OCT 包埋冷凍組織塊取出, 放在鋁箔紙上, 室溫靜置解凍(10 分鐘)。
4. 等候檢體解凍期間, 在第一支 15ml 尖底離心管, 用 3ml 滴管加入 3ml 的細胞溶解液。
5. 用滅菌過鑷子從已解凍的 OCT 中, 將檢體夾出放到石蠟封口膜上(用鑷子移走檢體外的 OCT, 盡量減少殘留)。
6. 用 21 號手術刀片將放在石蠟封口膜上的檢體切碎, 下面墊裁切成面積 5x5cm² 抗汗紙。以刀片將檢體放入步驟 4 的尖底離心管, 並蓋緊蓋子輕輕搖晃, 讓檢體與細胞溶解液混合均勻。
7. 用 200ul 微量吸管加入 20μl 蛋白酶 K, 並混合均勻。
8. 將 15ml 尖底離心管放入 55°C 水浴槽, over night。(因組織檢體會沉澱在尖底管底端, 故要不時去搖晃尖底離心管, 加速檢體溶解。)
9. 隔天打開第二個水浴槽, 並將溫度調至 37°C。
10. 從-20°C 冰箱將已分裝好 500μl/管的核糖核酸酶(RNase)放到 4°C 冰箱, 使其

 (網頁連結)	國家級人體生物資料庫整合平台 標準作業程序	編號: NBCT SOP-004
	標題: 整合平台新鮮冷凍組織檢體 採集與 DNA 萃取流程	版本/總頁數: 第 1.1 版/17 頁
		發布日期: 114-12-01

慢慢解凍。

11. 確認在 15ml 尖底離心管內的檢體已完全溶解後(完全透明)，用 10ul 微量吸管將 6ul 的核糖核酸酶(RNase)加入尖底離心管，輕輕混合均勻，再放入 37°C 水浴槽，靜置 60 分鐘。
12. 將尖底離心管從 37°C 的水浴槽移出，於室溫下靜置冷卻。在化學抽風櫃用 3ml 滴管加入 2ml 的蛋白質沉澱液，混合均勻。再移入 4°C 冰箱，靜置 30 分鐘。
13. 將尖底離心管移出 4°C 冰箱，並搖晃使底部白色沉澱物均勻散佈管中。隨後將尖底離心管放入微電腦大容量高速離心機，3,200rpm 離心 25 分鐘。
14. 用 3ml 滴管抽取已完成離心的 15ml 尖底離心管上清液，移入第二支 15ml 尖底離心管中。
15. 將已抽完上清液的第一支 15ml 尖底離心管，放入微電腦大容量高速離心機，3,200rpm 離心 1 分鐘，用 200ul 微量吸管把殘留的上清液，再次移入到第二支 15ml 尖底離心管中。
16. 已裝有上清液的第二支 15ml 尖底離心管，用 3ml 滴管加入 4ml 100%異丙醇(需在化學抽風櫃中操作)，鎖緊蓋子並混合均勻，用石蠟封口膜將蓋子封好。隨後將尖底離心管放於上下震盪混合器上，在室溫下混合 50 分鐘。(說明：此時可能會有絲狀物產生。)
17. 將第二支 15ml 尖底離心管放入微電腦大容量高速離心機，3,200rpm 離心 25 分鐘。
18. 將步驟 17 第二支 15ml 尖底離心管的上清液，移入第三支 15ml 尖底離心管保存。(說明：此上清液先保留，待確認抽取的 DNA 沒問題後，再丟棄。)
19. 用 1,000ul 微量吸管將步驟 18 離心管的沉澱物移入 1.5ml 微量離心管，並加入 1ml 75% EtOH，輕輕混合均勻。
20. 微量離心管放入預冷的微量高速冷凍離心機(4°C)中，16,100xg 離心 10 分鐘。
21. 倒掉上清液，保留沉澱物，利用桌上型微量高速離心機(或微量高速冷凍離心機)，16,100xg 離心 30 秒。最後再用 200ul 微量吸管將殘留的上清液吸掉。
22. 室溫風乾，同時目測片狀沉澱物 (pellet)大小，以評估所需回溶的加水體積。用 200ul 微量吸管加入所需二次水。
23. 待片狀沉澱物全部溶解後，輕輕拍 1.5 ml 微量離心管底部，讓管內組織 DNA 混合均勻。利用桌上型微量離心機，16,100xg，離心 30 秒。將 1.5 ml 微量離心管放在裝有碎冰的保冰桶裡，用 10ul 微量吸管吸取 2ul 組織 DNA，利用超微量分光光度計(Nanodrop)測量 DNA 濃度和 O.D 值: 260/280 & 260/230 (如附件一)。
24. 超微量分光光度計測量結果，如果 260/280 或 260/230 之 O.D 值低於 1.8，需

 (網頁連結)	國家級人體生物資料庫整合平台 標準作業程序	編號: NBCT SOP-004
	標題: 整合平台新鮮冷凍組織檢體 採集與 DNA 萃取流程	版本/總頁數: 第 1.1 版/17 頁
		發布日期: 114-12-01

進行 DNA 純化(DNA Purification)。

25. 若 0. D 值理想，則可將已測完濃度的組織 DNA 微量離心管，按照編號順序放入檢體紙盒(9x9 格)(紙盒上蓋、側邊註記檢體編號及檢體別)，先暫放在 4°C 冰箱，等跑完水平電泳膠圖之後，再存放於-80°C 冰箱保存。

說明: 因為檢體寶貴，若組織 DNA 總量小於 30ug，建議不要再純化。若組織 DNA 總量小於 50ug，建議與生醫主管討論是否需要純化，因為 DNA 純化過程會流失三分之一到二分之一以上的 DNA。


5.4 冷凍組織 DNA 純化(視需要) (全程需在化學抽氣櫃中操作)

試劑:

1. 酚氯仿異戊醇 Phenol:chloroform:isoamyl alcohol(25:24:1)
2. 氯仿(Chloroform)
3. 100%乙醇(100% EtOH)
4. 75%乙醇(75% EtOH)
5. 5M 氯化鈉(NaCl)
6. 滅菌過的二次水，ddH₂O (簡稱二次水)

步驟:

1. 將裝在 1.5ml 微量離心管的組織 DNA，加入二次水將體積放大到 500μl，再加入 500μl phenol/chloroform，劇烈搖晃約 20 秒，讓有機溶劑跟水層均勻混合。
2. 將均勻混合的 1.5ml 微量離心管，用微量高速冷凍離心機 25°C，16,100xg 離心 5 分鐘。
3. 將完成離心後的 1.5ml 微量離心管上清液，小心移入第二支新的 1.5ml 微量離心管。
4. 將第二支 1.5ml 微量離心管，加入相同體積(約 500μl) phenol/chloroform，劇烈搖晃約 20 秒，將有機溶劑跟水層均勻混合。
5. 將均勻混合的第二支 1.5ml 微量離心管，用微量高速冷凍離心機 25°C，16,100xg 離心 5 分鐘。
6. 將完成離心後的 1.5ml 微量離心管上清液，小心移入第三支新的 1.5ml 微量離心管。
7. 將第三支 1.5ml 微量離心管，加入 500μl chloroform，劇烈搖晃約 20 秒，讓

 National HiBank Consortium of Taiwan (網頁連結)	國家級人體生物資料庫整合平台 標準作業程序	編號: NBCT SOP-004
	標題: 整合平台新鮮冷凍組織檢體 採集與 DNA 萃取流程	版本/總頁數: 第 1.1 版/17 頁
		發布日期: 114-12-01

有機溶劑跟水層均勻混合。


8. 將第三支 1.5ml 微量離心管，用微量高速冷凍離心機 25°C，16,100xg 離心 5 分鐘。
9. 將完成離心後的 1.5ml 微量離心管上清液，小心移入第四支新的 1.5ml 微量離心管。
10. 將第四支 1.5ml 微量離心管，加入 1,000µl 100%酒精，及 50µl 5M NaCl 輕輕均勻混合。
11. 將此微量離心管放入-20°C冰箱 30 分鐘，使其完全反應。
12. 將微量離心管放入預冷的微量高速冷凍離心機(4°C)，16,100xg 離心 10 分鐘。
13. 倒掉上清液，保留沉澱物，加入 1,000µl 75%酒精，微量高速冷凍離心機(4°C)，16,100xg 離心 10 分鐘。
14. 利用桌上型微量離心機，16,100xg 離心 30 秒。最後再用 200µl 微量吸管將殘留的上清液吸掉。
15. 室溫風乾，同時目測片狀沉澱物 (pellet)大小，以評估所需回溶的加水體積。用 200ul 微量吸管加入所需二次水。
16. 待片狀沉澱物全部溶解後，輕輕拍 1.5 ml 微量離心管底部，讓管內 DNA 混合均勻。利用桌上型微量高速離心機，16,100xg 離心 30 秒。將 1.5 ml 微量離心管放在裝有碎冰的保冰桶裡，用 10ul 微量吸管吸取 2ul 組織 DNA，利用超微量分光光度計測量組織 DNA 濃度和 O.D 值。因為檢體寶貴，若 O.D 值仍不理想，需與生醫主管討論是否需要再度純化。
17. 將已測完濃度的組織 DNA，按照檢體編號順序放入檢體紙盒(9x9 格)(紙盒上蓋、側邊註記檢體編號及檢體別)，先暫放在 4°C 冰箱，等跑完水平電泳膠圖之後，再存放於-80°C 冰箱保存。

5.5 冷凍組織 DNA 品質檢測(進行水平電泳鑑定)

設備:

1. 高感度照膠系統(SYNGENE In Genius 3 或同級產品)
2. 微波爐
3. 迷你電泳槽
4. 微量電子天平
5. 桌上型水平震盪器(DSR-2800D-N 或同級產品)

試劑:

 (網頁連結)	國家級人體生物資料庫整合平台 標準作業程序	編號: NBCT SOP-004
	標題: 整合平台新鮮冷凍組織檢體 採集與 DNA 萃取流程	版本/總頁數: 第 1.1 版/17 頁
		發布日期: 114-12-01

1. UltraPure™ TAE Buffer, 10X (Thermo Cat no.15558042)
2. 瓊脂凝膠粉末 Agarose-Molecular Biology Grade(Invitrogen Cat no.75510-019)
3. 溴化乙錠(EtBr)

耗材:

1. 秤藥紙(12x12cm)、藥勺
2. 保鮮膜
3. 500ml 滅過菌的三角錐型瓶
4. 1L 滅過菌的血清瓶
5. 量筒(50ml 及 1L)


步驟:

一、製作瓊脂凝膠 (0.8%gel)

1. 配製 1X TAE Buffer:以 1L 量筒將 100ml UltraPure™ TAE Buffer(10X)倒入 1L 血清瓶中，再加入 900ml 的二次水(ddH₂O)，上下搖晃，混合均勻，存放於室溫。
2. 以 50ml 的量筒將 40ml 的 1X TAE Buffer 倒入已滅菌的三角錐型瓶裡。
3. 秤藥紙放置微量電子天平秤中歸零，以藥勺舀取 Agarose(瓊脂凝膠粉末)0.32g，倒入裝有 1X TAE Buffer 的三角錐型瓶混合。
4. 將三角錐型瓶蓋上保鮮膜，以 filter tip 將保鮮膜戳多個小洞，放進微波爐，微波 30 秒，然後加以搖晃均勻。此步驟需要重覆至瓊脂凝膠粉末 (Agarose)完全溶解於 1X TAE Buffer 中，呈現完全透明才行。(至少重複三次)
5. 將裝有混合均勻的瓊脂凝膠(Agarose)溶液從微波爐取出，放置於桌上型水平震盪器，慢速震盪 5 分鐘。
6. 用 2ul 微量吸管(pipetman)吸取 2ul EtBr 加入三角錐型瓶中，混合均勻。
7. 倒入製膠台，冷卻 1 小時凝固成瓊脂凝膠(gel)。

二、進行水平電泳

1. 將凝固的瓊脂凝膠(gel)的放入迷你電泳槽中，並倒入 450ml TAE Buffer(1X)。
2. 將 1.2ug DNA 與 2ul 6X Loading dye 混合，再加入滅過菌的二次水(ddH₂O)使總體積為 10ul。
3. 用 10ul 微量吸管(pipetman)將上述混和均勻液體全部注入迷你電泳槽中瓊脂凝膠 (gel)的 well 裡。
4. 以電壓 85 伏特(電流 500 mA)進行水平電泳 35 分鐘。
5. 將瓊脂凝膠 (gel)從迷你電泳槽中取出，至高感度照膠系統確認是否有主要橫

 National Health Research Institute Consortium of Taiwan (網頁連結)	國家級人體生物資料庫整合平台 標準作業程序	編號: NBCT SOP-004
	標題: 整合平台新鮮冷凍組織檢體 採集與 DNA 萃取流程	版本/總頁數: 第 1.1 版/17 頁
		發布日期: 114-12-01

紋條帶 (如附件二)。存檔並拍照保存。

5.6 製備冷凍組織小塊供蛋白質抽取用

設備: -80°C 冰箱、滅菌過之四吋小研鉢+杵



耗材:


1. 鋁箔紙
2. 滅菌過尖頭小鑷子(11cm)
3. 液態氮
4. 可裝液態氮的保溫杯 (不銹鋼較佳)
5. 檢體紙盒 (10x10 格)
6. 1.5ml 微量離心管(eppendorf)
7. 保麗龍箱 (裝冷凍組織與乾冰)
8. 乾冰

步驟:



1. 將小研鉢用鋁箔紙完整包覆內層
2. 先備好保麗龍箱 (已裝好乾冰), 以及待取名單, 從-80°C 冰箱將裝有「已確認腫瘤診斷和百分比」的冷凍組織的 9x9 格檢體紙盒, 取出放在保麗龍箱(已裝好乾冰)。
3. 從裝八分滿液態氮的保溫杯, 倒出少量液態氮於小研鉢。
4. 從裝有冷凍組織塊之冷凍小管取出一塊大冷凍組織塊放入小研鉢, 用小杵將冷凍組織塊敲成小塊, 再用尖頭小鑷子夾取小組織塊, 放入已寫好編號之微量離心管。小研鉢務必全程維持有足夠液態氮, 以維持組織在冷凍狀態。然後將微量離心管裝放入 9x9 格檢體紙盒(放在有乾冰的保麗龍箱)。
5. 以上動作需有三人, 一人負責取出冷凍組織, 敲成小塊, 放入已寫好編號之微量離心管, 一人準備微量離心管以及核對放入之微量離心管是否正確。第三人負責補充液態氮, 替換小研鉢與杵 (每塊冷凍組織都需要各自一個重新包好鋁箔紙的研鉢和杵)和小鑷子。

說明: 由於冷凍組織檢體寶貴, 一塊 $5 \times 5 \times 5 \text{ mm}^3$ 以上的檢體就可以抽不少 DNA 或 RNA, 可提供給許多申請人。若一整塊提供給一人, 實在浪費。但有些研究者需要組織蛋白質去做實驗。所以建議先敲成小塊, 再提供給申請人去抽取蛋白質。目標就是節省檢體。不過組織塊敲成小塊, 很難尺寸剛好, 碎碎的小組織塊集中放一管也可以(看總體積)。若原始留的組織塊就很小($< 2 \times 2 \times 2 \text{ mm}^3$), 就不要再敲小塊。

 (網頁連結)	國家級人體生物資料庫整合平台 標準作業程序	編號: NBCT SOP-004
	標題: 整合平台新鮮冷凍組織檢體 採集與 DNA 萃取流程	版本/總頁數: 第 1.1 版/17 頁
		發布日期: 114-12-01



取出冷凍組織放在小研鉢



用杵敲成小塊



用尖頭小鑷子把組織取出放入微量離心管

六、出庫品質標準

整合平台出庫之組織 DNA 應提供下列資訊:

1. 腫瘤成分 (須經病理醫師判讀確認)

--腫瘤組織: 其原始組織檢體之腫瘤成分(tumor %) 以>50%為原則, 越高越好。

--腫瘤周遭之非腫瘤組織: 需確認無腫瘤細胞污染。

說明:因為每種檢體性質不同,有些難以取得者,可以調降腫瘤成分,但是至少需要 30%以上,才有良好研究價值。可以配合申請者之要求,來調整腫瘤成分高低。


2. 組織 DNA 之 optical density (O.D)值:

--260/280 比值應介於 1.6-2.2 之間

--260/230 比值應介於 1.6-2.5 之間

說明: (1) 因為有些檢體難以取得或很稀少,能萃取之組織 DNA 量很少且無法純化,可與申請者討論說明狀況,若申請者能接受,即使 O.D 值不理想,也可以出庫,但一定要有註記,並已充分告知申請者。

(2) 260/280 比值與 260/230 比值,建議最好能>1.8,以確認 DNA 內不含大量蛋白質污染。

 (網頁連結)	國家級人體生物資料庫整合平台 標準作業程序	編號: NBCT SOP-004
	標題:	版本/總頁數: 第 1.1 版/17 頁
	整合平台新鮮冷凍組織檢體 採集與 DNA 萃取流程	發布日期: 114-12-01

3. 水平電泳跑膠圖有無 major band (視需要)

--組織 DNA 之 major band 若存在，代表 DNA 品質佳，但非出庫必要條件，只有申請者特別指定時，才須配合。

整合平台出庫之冷凍組織小塊應提供下列資訊:

1. 腫瘤成分 (須經病理醫師判讀確認)
2. 確認自組織冷凍後，都沒有解凍過。

七、參考文獻


1. Hoyo C. Methylation variation at IGF2 Differentially Methylated Regions and Maternal Folic Acid Use before and during Pregnancy. Epigenetics 2011;7(6):928-
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21636975>
2. Hand book:
<https://www.qiagen.com/mx/resources/resourcedetail?id=a9e6a609-4600-4b03-afbd-974318590ce5&lang=en>

八、附件

附件一：利用超微量分光光度計測量冷凍組織 DNA 濃度和 O.D 值範例

表一、Optical density (O.D)值良好，皆>1.8，濃度維持在 2000ng/μl 以下。

組織 DNA O.D.值				
No.	濃度(ng/μl)	O.D 260/280	O.D 260/230	跑膠所需 load DNA 的量(μl)
1T	1495.9	1.86	2.27	0.84
1N	1094.9	1.86	2.25	1.14
2T	1018.7	1.86	2.31	1.23
2N	1079.2	1.87	2.32	1.16
3T	1344.8	1.85	2.01	0.93
3N	1496.7	1.86	2.26	0.84
4T	1313.5	1.85	2.23	0.95
4N	1085.5	1.85	2.27	1.15
5T	1871.3	1.86	2.23	0.67
5N	1144.2	1.86	2.24	1.09


 (網頁連結)	國家級人體生物資料庫整合平台 標準作業程序	編號: NBCT SOP-004
	標題: 整合平台新鮮冷凍組織檢體 採集與 DNA 萃取流程	版本/總頁數: 第 1.1 版/17 頁
		發布日期: 114-12-01

說明: Concentration and O.D. detected by Thermo NANODROP 2000

表二、 Optical density (O.D)值有的會稍差，需要考慮再純化。

組織 DNA O.D 值				
no.	濃度(ng/μl)	O.D 260/280	O.D 260/230	跑膠所需 load DNA 的量(ul)
1T	471.3	1.86	1.65	3.4
1N	915.9	1.86	1.64	1.7
2T	2554.5	1.84	2.12	0.6
2N	817.9	1.85	1.46	2.0
3T	1232.4	1.84	1.89	1.3
3N	1133.0	1.86	1.74	1.4
4T	1237.5	1.85	1.65	1.3
4N	1197.7	1.87	1.75	1.3
5T	981.1	1.84	2.17	1.6
5N	1266.7	1.88	1.92	1.3

說明: Concentration and O.D detected by Thermo NANODROP 2000

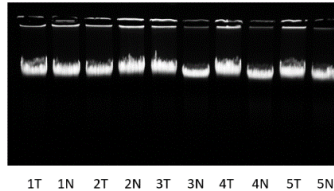
 (網頁連結)	國家級人體生物資料庫整合平台 標準作業程序	編號: NBCT SOP-004
	標題: 整合平台新鮮冷凍組織檢體 採集與 DNA 萃取流程	版本/總頁數: 第 1.1 版/17 頁
		發布日期: 114-12-01

附件二: 冷凍組織抽取之 DNA 濃度, O.D 值, 和水平電泳跑膠圖範例

冷凍組織抽取之 DNA 濃度, O.D. 值, 和水平電泳跑膠圖 範例一

tissue DNA O.D. 值

no.	濃度 (ng/ul)	O.D. 260/280	O.D. 260/230	跑膠所需load DNA 的量(ul)
1T	1495.9	1.86	2.27	0.84
1N	1094.9	1.86	2.25	1.14
2T	1018.7	1.86	2.31	1.23
2N	1079.2	1.87	2.32	1.16
3T	1344.8	1.85	2.01	0.93
3N	1496.7	1.86	2.26	0.84
4T	1313.5	1.85	2.23	0.95
4N	1085.5	1.85	2.27	1.15
5T	1871.3	1.86	2.23	0.67
5N	1144.2	1.86	2.24	1.09

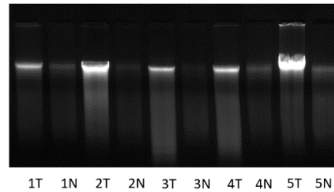


說明: Optical density (OD) 值良好, 所有檢體皆有 major band。

冷凍組織抽取之 DNA 濃度, O.D. 值, 和水平電泳跑膠圖 範例二

tissue DNA O.D. 值

no.	濃度 (ng/ul)	O.D. 260/280	O.D. 260/230	跑膠所需load DNA 的量(ul)
1T	471.3	1.86	1.65	3.4
1N	915.9	1.86	1.64	1.7
2T	2554.5	1.84	2.12	0.6
2N	817.9	1.85	1.46	2.0
3T	1232.4	1.84	1.89	1.3
3N	1133	1.86	1.74	1.4
4T	1237.5	1.85	1.65	1.3
4N	1197.7	1.87	1.75	1.3
5T	981.1	1.84	2.17	1.6
5N	1266.7	1.88	1.92	1.3



說明: Optical density (OD) 值 < 1.8, 不理想者, 有的沒有 major band (1N, 2N, 3N), 或是較淡 (4N), 但是也有 O.D. 值合格, 但是 major band 很淡 (5N)。

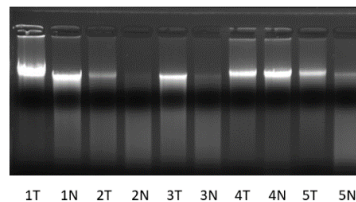
沒有 major band 的 DNA, 還是可以適用於各種 PCR 實驗, 所以要依申請者需求而決定是否適用。不要放棄。




冷凍組織抽取之 DNA 濃度, O.D. 值, 和水平電泳跑膠圖 範例三

tissue DNA O.D. 值

no.	濃度 (ng/ul)	O.D. 260/280	O.D. 260/230	跑膠所需load DNA 的量(ul)
1T	2337.1	1.83	1.97	0.53
1N	2752.1	1.84	1.95	0.45
2T	1859.3	1.9	2.13	0.67
2N	1449.2	1.88	1.79	0.86
3T	2559.1	1.83	1.94	0.49
3N	1548.1	1.89	2.06	0.81
4T	2352.0	1.82	2.07	0.53
4N	2139.0	1.87	1.97	0.58
5T	2489.2	1.84	2.19	0.5
5N	1382.2	1.86	1.93	0.9

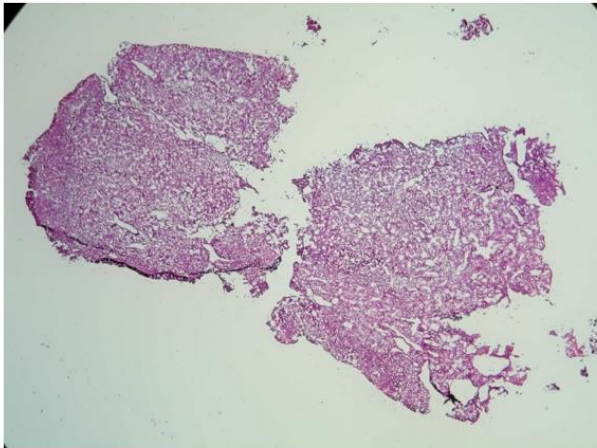


說明: O.D. 值雖合格, 但是沒有 major band (2N) 或是很淡 (3N)。

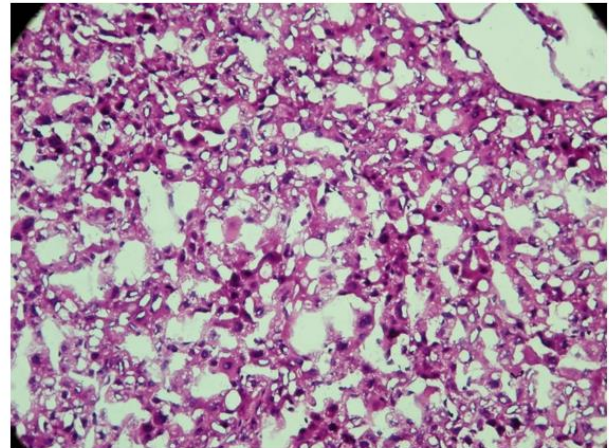
 (網頁連結)	國家級人體生物資料庫整合平台 標準作業程序	編號: NBCT SOP-004
	標題: 整合平台新鮮冷凍組織檢體 採集與 DNA 萃取流程	版本/總頁數: 第 1.1 版/17 頁
		發布日期: 114-12-01

附件三: 冷凍組織腫瘤成分判讀範例

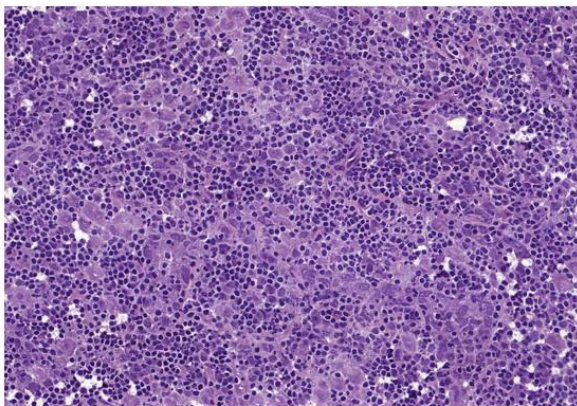
所有冷凍收集之腫瘤組織，需要先進行冷凍切片以判讀腫瘤細胞是否存在



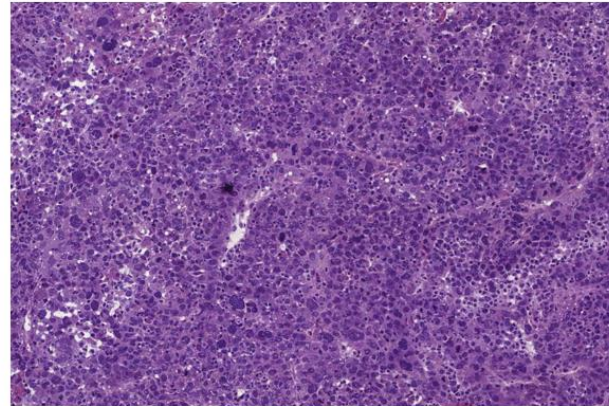
99% 為肝癌腫瘤細胞



99% 為肝癌腫瘤細胞



僅**50%** 為肝癌腫瘤，發炎細胞很多



99% 為肝癌腫瘤細胞



(網頁連結)

國家級人體生物資料庫整合平台
標準作業程序

標題:

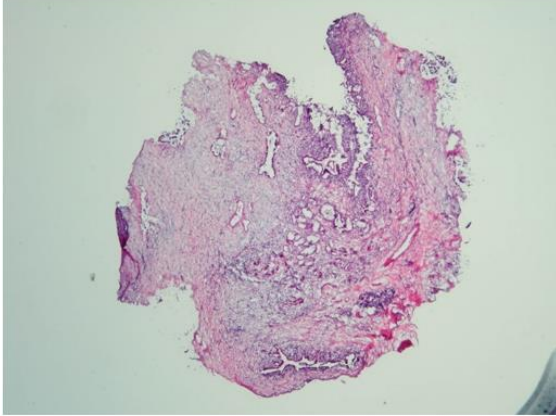
整合平台新鮮冷凍組織檢體
採集與 DNA 萃取流程

編號: NBCT SOP-004

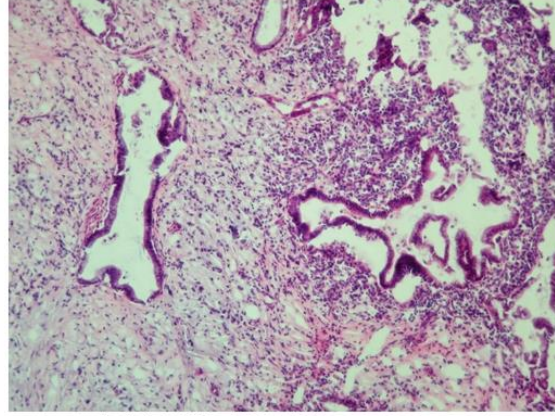
版本/總頁數: 第 1.1 版/17 頁

發布日期: 114-12-01

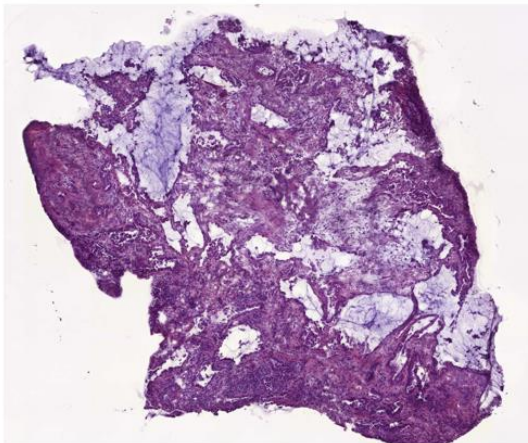
新鮮冷凍腫瘤組織，其冷凍切片圖象



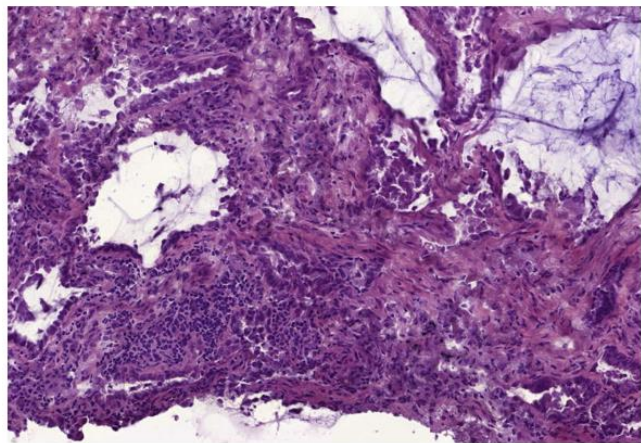
膽管癌 腫瘤細胞 <20%



局部放大圖像



肺腺癌 腫瘤細胞 <50%



局部放大圖像



National Biobank
Consortium of Taiwan

(網頁連結)

國家級人體生物資料庫整合平台
標準作業程序

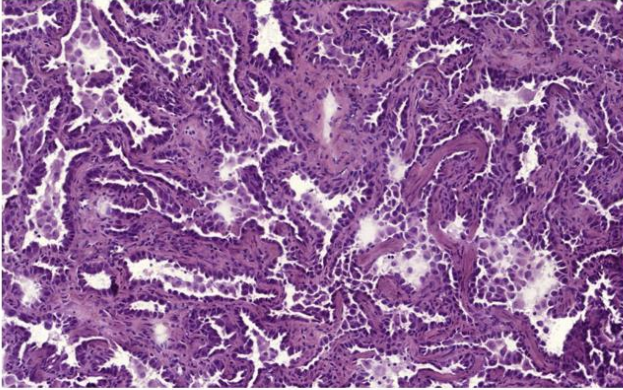
標題:

整合平台新鮮冷凍組織檢體
採集與 DNA 萃取流程

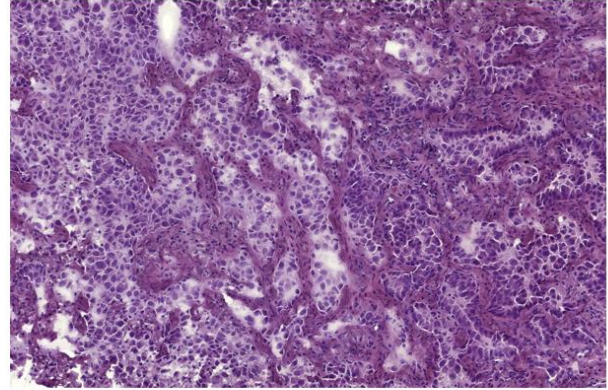
編號: NBCT SOP-004

版本/總頁數: 第 1.1 版/17 頁

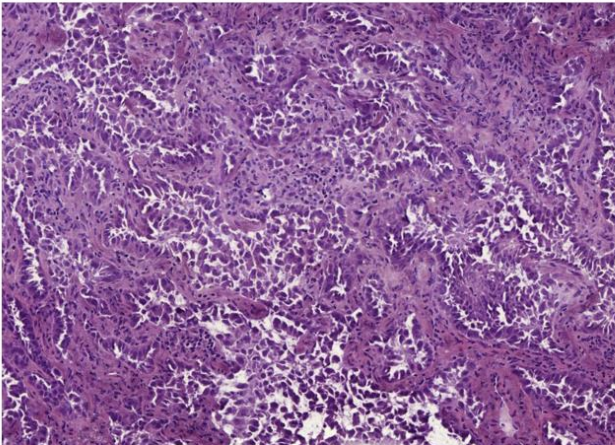
發布日期: 114-12-01



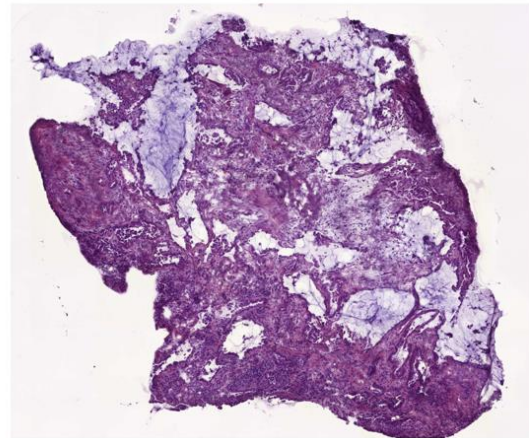
Adenocarcinoma, 50% tumor cells



Adenocarcinoma, 90% tumor cells

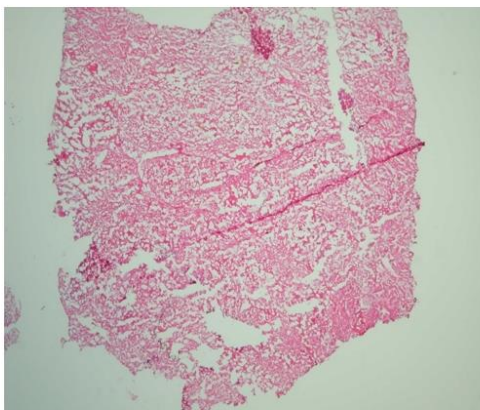


Adenocarcinoma, 70% tumor cells

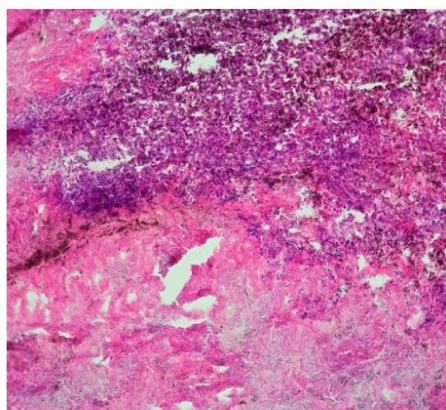


Adenocarcinoma, <50% tumor cells

這些腫瘤組織都無法使用



組織全部壞死



沒有腫瘤細胞