
 (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-007
	標題: 整合平台血液檢體 DNA 萃取流程	版本/總頁數: 第 1.1 版/11 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 配製試劑.....	2
5.2 血液DNA萃取.....	5
5.3 血液檢體DNA品質檢測(視需要進行水平電泳鑑定).....	8
六、出庫品質標準.....	9
七、參考文獻	10
八、附件	
一:利用超微量分光光度計測量血液 DNA 濃度和 O.D 值範例.....	11
二:血液檢體抽取之 DNA 濃度，O.D 值，和水平電泳跑膠圖範例.....	11

 (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-007
	標題: 整合平台血液檢體 DNA 萃取流程	版本/總頁數: 第 1.1 版/11 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,使萃取血液檢體 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

此作業流程適用於萃取血液檢體 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血液萃取 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三個階段

1. 緩衝液配製
2. 血液 DNA 萃取
3. 血液檢體 DNA 品質檢測


五、作業流程

5.1 配製試劑

設備:

1. 微量電子天平
2. 電磁攪拌器
3. 攪拌子
4. 酸鹼度測定計(pH meter)
5. 4°C 冰箱
6. 純水系統

耗材:

 (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-007
	標題: 整合平台血液檢體 DNA 萃取流程	版本/總頁數: 第 1.1 版/11 頁
		發布日期: 114-12-01


1. 秤藥紙、藥杓
2. 量筒(50ml、500ml、1000ml)
3. 3ml 滴管(dropper)
4. 血清瓶(1L)

原料:

1. 滅菌過的二次水(ddH₂O)，簡稱二次水
2. 三羥甲基氨基甲烷(Tris-HCl)
3. 氯化鉀(KCl)
4. 氯化鎂(MgCl₂)
5. 乙二胺四乙酸(EDTA)
6. 十二烷基硫酸鈉(SDS)
7. 氯化鈉(NaCl)
8. 乙基苯基聚乙二醇(NP40)界面活性劑
9. 氯化氫(HCl)(說明:用於調整酸鹼值)
10. 氫氧化鈉(NaOH)(說明:用於調整酸鹼值)

步驟:

1. 配製庫存(stock) 500ml 的 1M 三羥甲基氨基甲烷(Tris-HCl)溶液:
 用微量電子天平秤量 78.82g 三羥甲基氨基甲烷粉末，倒入血清瓶中，並加入 400ml 的二次水及消毒過的攪拌子。將此血清瓶移置於電磁攪拌器上攪拌均勻，並同時以酸鹼度測定計(pH meter)調整 pH 值至 7.6。最後以二次水調整溶液體積到 500ml。置於 4°C 冰箱存放。
2. 配製庫存(stock) 500ml 的 1M 氯化鉀(KCl)溶液:
 用微量電子天平秤量 37.275g 氯化鉀粉末，倒入血清瓶中，並加入 500ml 二次水及消毒過的攪拌子。將此血清瓶移置於電磁攪拌器上攪拌均勻。置於 4°C 冰箱存放。
3. 配製庫存(stock) 500ml 的 0.1M 氯化鎂(MgCl₂)溶液:
 用微量電子天平秤量 10.165g 氯化鎂粉末，倒入血清瓶中，並加入 500ml 二次水及消毒過的攪拌子。將此血清瓶移置於電磁攪拌器上攪拌均勻。置於 4°C 冰箱存放。
4. 配製庫存(stock) 500ml 的 0.1M 乙二胺四乙酸(EDTA)溶液:
 用微量電子天平秤量 18.612g 乙二胺四乙酸粉末，倒入血清瓶中，並加入 400ml 的二次滅菌過的水及消毒過的攪拌子。將此血清瓶移置於電磁攪拌器上攪拌均勻，並同時以酸鹼度測定計(pH meter)調整 pH 值至 8。最後以二次水調整溶液體積到 500ml。置於 4°C 冰箱存放。
5. 配製庫存(stock) 200ml 的 20% 十二烷基硫酸鈉(SDS)溶液:

 (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-007
	標題: 整合平台血液檢體 DNA 萃取流程	版本/總頁數: 第 1.1 版/11 頁
		發布日期: 114-12-01

用微量電子天平秤量 40g 十二烷基硫酸鈉粉末，倒入血清瓶中，並加入 200ml 二次水及消毒過的攪拌子。將此血清瓶移置於電磁攪拌器上攪拌均勻。置於常溫存放。

6. 配製庫存(stock) 500ml 的 5M 氯化鈉(NaCl)溶液:

用微量電子天平秤量 146.1g 氯化鈉粉末，倒入血清瓶中，並加入 500ml 二次水及消毒過的攪拌子。將此血清瓶移置於電磁攪拌器上攪拌均勻。置於 4°C 冰箱存放。

7. 分裝乙基苯基聚乙二醇(NP40):

將乙基苯基聚乙二醇(NP40)倒入血清瓶中，並在血清瓶外側瓶身包覆一層鋁箔紙遮光。置於常溫存放。

8. 配製 1,000 ml TKM1:

自前述 7 項溶液中取用如下所述之溶液，並以所述用量比例混和即可得 1,000 ml TKM1 溶液。配方比例如下所述：

10ml 三羥甲基氨基甲烷(Tris-HCl)

10ml 氯化鉀(KCl)

100ml 氯化鎂(MgCl₂)

20ml 乙二胺四乙酸(EDTA)

860ml 二次水

9. 配製 1000ml TKM2:

自前述 7 項溶液中取用如下所述之溶液，並以所述用量比例混和即可得 1,000 ml TKM2 溶液。配方比例如下所述：

10ml 三羥甲基氨基甲烷(Tris-HCl)

10ml 氯化鉀(KCl)

100ml 氯化鎂(MgCl₂)

20ml 乙二胺四乙酸(EDTA)

25ml 乙基苯基聚乙二醇(NP40)

835ml 二次水

10. 配製 250ml TKM3:


自前述 7 項溶液中取用如下所述之溶液，並以所述用量比例混和即可得 250 ml TKM3 溶液。配方比例如下所述：

2.5ml 三羥甲基氨基甲烷(Tris-HCl)

2.5ml 氯化鉀(KCl)

25ml 氯化鎂(MgCl₂)

5ml 乙二胺四乙酸(EDTA)

 (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-007
	標題: 整合平台血液檢體 DNA 萃取流程	版本/總頁數: 第 1.1 版/11 頁
		發布日期: 114-12-01

40ml 氯化鈉(NaCl)溶液

175ml 二次水

注意事項:

1. 配製試劑時，其 pH 值必須正確，否則會影響血液 DNA 之萃取。試劑若放置隔夜，使用前須再次確認 pH 值是否正確。

5.2 血液 DNA 萃取

設備:


1. 水浴槽
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(ependorf 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. 微量吸管(pipetman)(1000ul、200ul、10ul)
8. 純水系統
9. 化學排煙櫃(chemical hood)
10. 製冰機

試劑:

1. TKM1
2. TKM2
3. TKM3
4. 20%十二烷基硫酸鈉(SDS)溶液
5. 5M 氯化鈉(NaCl)溶液
6. 75%乙醇(75% EtOH)
7. 100%乙醇(100% EtOH)
8. 滅菌過的二次水(ddH₂O)，簡稱二次水。

說明: 實驗開始前，先準備好八支 50ml 尖底離心管，各自分裝 50ml 上述的八種試劑，並在上蓋及側邊寫上緩衝液名稱。


耗材:

 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-007
	標題: 整合平台血液檢體 DNA 萃取流程	版本/總頁數: 第 1.1 版/11 頁
		發布日期: 114-12-01


1. 15ml 尖底離心管
2. 50ml 尖底離心管
3. 3ml 滴管(dropper)
4. 已滅過菌的 1.5ml 微量離心管(eppendorf)
5. 10ml 定量吸管(pipette)
6. Filter tip(1,000ul、200ul、10ul)
7. 保冰桶
8. 檢體紙盒(9x9 孔)
9. 微量離心管架(裝 1.5ml 微量離心管)
10. 不鏽鋼試管架(5x10, 裝 15ml 尖底離心管)
11. 不鏽鋼試管架(4x4, 裝 50ml 尖底離心管)

步驟: (全程需在化學排煙櫃操作)

1. 開水浴槽，並將溫度調至 55°C。
2. 取兩支 50ml 尖底離心管，在上蓋及側邊寫好檢體編號。
3. 將冷凍保存的 CBC 管(內有剩餘紅血球層)與裝白血球層(buffy coat)的 1.5ml 微量離心管解凍。用滴管分別將已解凍的紅血球層與白血球層(buffy coat)，都移入同一支 50ml 尖底離心管。該滴管暫勿丟棄。
4. 另取第二支新的滴管吸取 3ml TKM1 加至 CBC 管，用步驟 3 的滴管清洗 CBC 管及 1.5ml 微量離心管。將清洗下來的殘餘檢體同樣移入步驟 3 的 50ml 尖底離心管。
5. 用滴管吸取 10 ml TKM2，加入步驟 3 的 50ml 尖底離心管中。再用步驟 3 的滴管，以輕吸輕放的方式，上下混合約 100 次，將檢體的細胞打破。
6. 將此 50ml 尖底離心管放入微電腦大容量高速離心機，並蓋好離心機接頭專用上蓋，3,200 rpm 離心 15 分鐘。
7. 移除上清液，保留沉澱物，用滴管加入 10ml TKM1，將沉澱物搖散。
8. 將此 50ml 尖底離心管放入微電腦大容量高速離心機，並蓋好離心機接頭專用上蓋，3,200 rpm 離心 10 分鐘。
9. 移除 50ml 尖底離心管上清液，保留沉澱物。
10. 用滴管將離心後的 50ml 尖底離心管沉澱物，移入一支新的 15ml 尖底離心管。
11. 另取新的滴管吸取 1ml 的 TKM1，加入裝有沉澱物的 15ml 尖底離心管。將沉澱物搖散。
12. 將此 15ml 尖底離心管放入微電腦大容量高速離心機，並蓋好離心機接頭專用上蓋，3,200 rpm 離心 3 分鐘。

 (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-007
	標題: 整合平台血液檢體 DNA 萃取流程	版本/總頁數: 第 1.1 版/11 頁
		發布日期: 114-12-01

13. 移除 15ml 尖底離心管上清液，保留沉澱物。重覆沉澱物清洗步驟 11 到 12，直到上清液呈現清澈透明外觀，並保留沉澱物。
14. 清洗完後的沉澱物，用 1000ul 微量吸管加入 0.4ml 的 TKM1，並搖散之。
15. 用 1,000ul 微量吸管再加入 0.4ml 的 TKM3，再次搖散之。
16. 用 200ul 微量吸管加入 50 μ l 的 20% 十二烷基硫酸鈉溶液，再次搖散之。
17. 將此 15ml 尖底離心管放入 55°C 水浴槽，直到上清液呈現清澈透明外觀 (此步驟至少需要 30 分鐘)。因檢體會沉澱在尖底管底端，故可常去搖晃尖底離心管，加速組織檢體溶解。
18. 將此 15ml 尖底離心管自 55°C 的水浴槽移出，於室溫下靜置冷卻，用 1,000ul 微量吸管加入 0.4ml 5M 氯化鈉(NaCl)溶液，混合均勻。
19. 放入微電腦大容量高速離心機，並蓋好離心機接頭專用上蓋，3,200 rpm 離心 25 分鐘。
20. 用 1,000ul 微量吸管取離心後的上清液，裝入第二支新的 15ml 尖底離心管。
21. 將取完上清液的 15ml 尖底離心管，再次放入微電腦大容量高速離心機，並蓋好離心機接頭專用上蓋，3,200 rpm 離心 1 分鐘。用 200ul 微量吸管把殘留的上清液，移入第二支新的 15ml 尖底離心管中。
22. 加入 2.5ml 100% ETOH 到第二支只有上清液的 15ml 尖底離心管，並輕輕混合均勻。
23. 放入 -20°C 冰箱 30 分鐘，使其完全反應。
24. 自 -20°C 冰箱取出 15ml 尖底離心管，於室溫下靜置回溫。
25. 用 1,000ul 微量吸管吸取 15ml 尖底離心管中的白色絲狀物，移入新的 1.5 ml 微量離心管，並加入 1ml 75% ETOH，輕輕混合均勻。
26. 將 1.5 ml 微量離心管放入 4°C 預冷的低溫離心機(ependorf Centrifuge 5415 R)中，13,200 rpm 離心 10 分鐘。
27. 倒掉上清液，保留沉澱物，利用桌上型微量離心機，離心 30 秒。最後再用 200ul 微量吸管將殘留的上清液吸掉，室溫風乾。
28. 同時目測片狀沉澱物 (pellet)大小，以評估所需回溶的加水體積。
29. 用 200ul 微量吸管加入所需二次水。
30. 待片狀沉澱物全部溶解後，輕輕拍 1.5 ml 微量離心管底部，讓管內血液 DNA 混合均勻。利用桌上型微量離心機，離心 30 秒。
31. 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 血液 DNA，利用超微量分光光度計測量 DNA 濃度及 O.D 值。
32. 將已測完濃度的血液 DNA，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)，存放於 -80°C 冰箱保存。

 (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-007
	標題: 整合平台血液檢體 DNA 萃取流程	版本/總頁數: 第 1.1 版/11 頁
		發布日期: 114-12-01

說明: 用人工方式萃取血液 DNA，雖然作業較繁複，但是抽取量每 1ml buffy coat 大約可以抽 50-100 ug DNA，這會遠遠高於機器抽取量，而且成本低很多。因此，作為一個人體生物資料庫(biobank)，為了能夠儲存最大量之血液 DNA，建議採用人工方式萃取血液 DNA。

5.3 血液 DNA 品質檢測(視需要進行水平電泳鑑定)

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:

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 0.32g 瓊脂凝膠粉末(Agarose)，倒入裝有 1X TAE Buffer 的三角錐型瓶輕輕混合。

 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-007
	標題:	版本/總頁數: 第 1.1 版/11 頁
	整合平台血液檢體 DNA 萃取流程	發布日期: 114-12-01

4. 將三角錐型瓶蓋上保鮮膜，以 10ul filter tip 尖端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. 將完全溶解至透明的瓊脂凝膠溶液從微波爐取出，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 10u 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紋條帶 (如附件二)。存檔並拍照保存。

說明: 由於血液 DNA 十分寶貴，而且抽取量有限，通常品質良好，所以原則上是可以不用進行水平電泳鑑定。或視情況隨機抽取數管血液 DNA 做檢測即可。

六、出庫品質標準


整合平台出庫之血液 DNA 應提供下列資訊:

1. 血液 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，萃取之血液 DNA 很少且無法純化，可與申請者討論，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 內不含大量蛋白質汙染。

2. 水平電泳跑膠圖有無 major band (視需要)


 (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-007
	標題: 整合平台血液檢體 DNA 萃取流程	版本/總頁數: 第 1.1 版/11 頁
		發布日期: 114-12-01

--血液 DNA 通常品質良好，都會有 major band 存在，因此不會每例都做跑膠圖。
只有申請者特別指定時，才須提供。

 (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-007
	標題: 整合平台血液檢體 DNA 萃取流程	版本/總頁數: 第 1.1 版/11 頁
		發布日期: 114-12-01

七、參考文獻

1. SAJJA SUGUNA, et al. GENOMIC DNA ISOLATION FROM HUMAN WHOLE BLOOD SAMPLES BY NON ENZYMATIC SALTING OUT METHOD. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 2014;6(6): 198-199.
<https://innovareacademics.in/journal/ijpps/Vol6Issue6/9478.pdf>
2. Samuel Asamoah Sakyi, et al. Modified DNA Extraction Technique for Use in Resource-Limited Settings: Comparison of Salting out Methods versus QIAamp Blood Mini Kit, Annals of Medical and Health Sciences Research, 2017; 7(3):131-5.

 (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-007
	標題: 整合平台血液檢體 DNA 萃取流程	版本/總頁數: 第 1.1 版/11 頁
		發布日期: 114-12-01

八、附件

附件一：利用超微量分光光度計測量血液 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 1500ng/μl 以下。

血液 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)
1	1105.9	1.86	2.21	1.80
2	872.4	1.83	2.07	2.29
3	1176.3	1.85	2.03	1.70
4	1094.6	1.85	2.24	1.82
5	1195	1.85	2.18	1.67
6	951.5	1.86	2.05	2.10
7	1238.6	1.85	1.84	1.61
8	1162.5	1.85	2.1	1.72
9	1054.3	1.85	2.1	1.89
10	1206.3	1.87	2.14	1.65

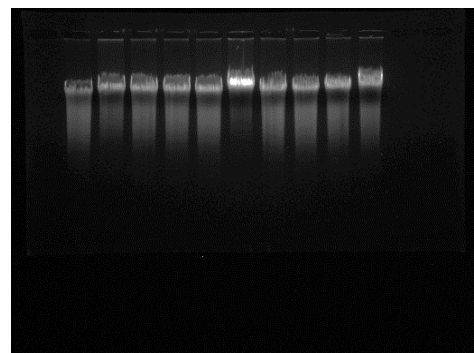
說明: Concentration and O.D. detected by Thermo NANODROP 2000

附件二:血液檢體抽取之 DNA 濃度，O.D 值，和水平電泳跑膠圖範例

新鮮血液抽取之 DNA 濃度，O.D 值，和水平電泳跑膠圖 範例一

Blood DNA O.D 值

no	濃度 (ng/(μl))	OD 260/280	OD 260/230	跑膠所需 load DNA 的量(μl)
1	1105.9	1.86	2.21	1.8
2	872.4	1.83	2.07	2.3
3	1176.3	1.85	2.03	1.7
4	1094.6	1.85	2.24	1.8
5	1195	1.85	2.18	1.7
6	951.5	1.86	2.05	2.1
7	1238.6	1.85	1.84	1.6
8	1162.5	1.85	2.1	1.7
9	1054.3	1.85	2.1	1.9
10	1206.3	1.87	2.14	1.7



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

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