

# 抽取冷凍組織 DNA 作業流程

## 一. 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. 低溫離心機(eppendorf Centrifuge 5415 R)
5. 桌上型微量離心機
6. 超微量分光光度計(Thermo NANODROP 2000)
7. 水平震盪器
8. 微量吸管 (pipetman))( 1000ul、200ul、10ul)
9. 純水系統
10. 化學排煙櫃(chemical hood)

## 二. 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 500µl 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](#))
5. 100%異丙醇 (100% isopropanol)
6. 75%乙醇 (75% EtOH)
7. 滅菌過的二次水 , ddH<sub>2</sub>O (簡稱二次水)

## 三. 耗材

1. 抗汙紙(說明：裁切數個約 5 公分正方形抗汙紙)
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. 3c.c 滴管(dropper)
10. 過濾試滴管尖頭(Filter tip) (1000ul、200ul、10ul)
11. 檢體紙盒(9x9 格)

#### 四.抽取 DNA

1. 開水浴槽，並將溫度調至 55°C。
2. 從-80°C 冰箱將檢體取出，將包埋在 OCT 的冷凍組織檢體，放在寫好檢體編號的鋁箔紙上，室溫靜置解凍(10 分鐘)。
3. 等候檢體解凍期間，取一支 15ml 尖底離心管，在上蓋及側邊寫好檢體編號，用 3c.c 滴管加入 3ml 的細胞溶解液。
4. 用滅菌過鑷子從已解凍的 OCT 中，將檢體夾到寫好編號的石蠟封口膜上 (用鑷子移走檢體外的 OCT，盡量減少殘留)。
5. 用 21 號手術刀片將放在石蠟封口膜上的檢體切碎。以刀片將檢體放入步驟 3 的 15ml 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. 隔天開水浴槽，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 6μl 的核

糖核酸酶(RNase)加入 15 ml 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。用 3c.c 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，3200rpm 離心 25 分鐘。

14.取第二支 15ml 尖底離心管，在上蓋及側邊寫好檢體編號。

15.用 3c.c 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。

16.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，3200rpm 離心 1 分鐘，用 3c.c 滴管把殘留的上清液，再次移入到第二支 15ml 尖底離心管中。

17.裝有上清液的第二支 15ml 尖底離心管，用 3c.c 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。隨後將尖底離心管放於水平震盪器上，在室溫下混合 50 分鐘。(說明：此時可能會有絲狀物產生。)

18.將此尖底離心管放入微電腦大容量高速離心機，3200rpm 離心 25 分鐘。

19.取第三支 15ml 尖底離心管以及一支微量離心管 (eppendorf)，在上蓋及側邊寫好檢體編號。

20.將步驟 18 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。)

21.用 1000ul 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。

22.微量離心管放入預冷的低溫離心機(4°C)中，13,200rpm 離心 10 分鐘。

23.倒掉上清液，保留沉澱物，利用桌上型微量離心機，離心 1 分鐘。最後再用 200ul 微量吸管將殘留的上清液吸掉。

24.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。

- 25.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。利用桌上型微量離心機，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 DNA 濃度和 O.D 值。
- 26.超微量分光光度計測量結果，如果 260/280 及 260/230 低於 1.8，需進行純化(DNA Purification)程序。
- 27.若 O.D 值理想，則可將已測完濃度的 DNA，按照編號順序放入檢體紙盒(9x9 孔) (紙盒上蓋、側邊註記檢體編號及檢體別)，先暫放在 4°C 冰箱，等跑完膠之後，再存放於-80°C 冰箱保存。

#### DNA 純化流程:(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. 75%乙醇(75% EtOH)
4. 5mM 氯化鈉(NaCl)
5. 滅菌過的二次水，ddH<sub>2</sub>O (簡稱二次水)

- (1) 將裝在 1.5ml 微量離心管 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，用低溫離心機(eppendorf Centrifuge 5415 R) 25°C 離心 13000rpm，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 1.5ml 微量離心管，用低溫離心機(eppendorf Centrifuge 5415 R) 25°C 離心 13000rpm，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 500 $\mu$ l chloroform，劇烈搖晃約 20 秒，讓有機溶劑跟水層均勻混合。
- (8) 將第三支 1.5ml 微量離心管，用低溫離心機(eppendorf Centrifuge 5415 R) 25 $^{\circ}$ C 離心 13000rpm，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 1000 $\mu$ l 100%酒精，及 50 $\mu$ l 5M NaCl 輕輕均勻混合。
- (11) 將此微量離心管放入-30 $^{\circ}$ C 冰箱 30 分鐘，使其完全反應。
- (12) 將離心管放入預冷的低溫離心機(4 $^{\circ}$ C)中，13,200rpm 離心 10 分鐘。
- (13) 倒掉上清液，保留沉澱物，1000 $\mu$ l 75%酒精，13,200rpm 離心 10 分鐘。
- (14) 利用桌上型微量離心機，離心 1 分鐘。最後再用 200 $\mu$ l 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 200 $\mu$ l 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。利用桌上型微量離心機，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 10 $\mu$ l 微量吸管吸取 2 $\mu$ l 組織 A，利用超微量分光光度計測量 DNA 濃度和 O.D 值。
- (17) 將已測完濃度的 DNA，按照編號順序放入檢體紙盒(9x9 孔) (紙盒上蓋、側邊註記檢體編號及檢體別)，先暫放在 4 $^{\circ}$ C 冰箱，等跑完膠之後，再存放於-80 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

## 進行水平電泳以鑑定 DNA 品質

### 一.設備

1. 多功能凝膠成像系統(Alphamager HP)
2. 微波爐
3. 迷你電泳槽

4. 微量電子天平

## 二.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)

## 三.耗材

1. 秤藥紙(12X12)、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)

## 四、製作瓊脂凝膠(1%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(ddH<sub>2</sub>O)，上下搖晃，混合均勻，存放於室溫。

(2) 以 50ml 的量筒將 20ml 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(瓊質凝膠粉末) 0.16g，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。

注意：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，放置軌道型震盪器，3 分鐘。

(6) 用 2ul 微量吸管(pipetman)吸取 0.2ul 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)。

## 五、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(ddH<sub>2</sub>O)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多功能凝膠成像系統確認是否有主要橫紋條帶。  
存檔並拍照保存

### Reference

1. Hoyo C. Methylation variation at IGF2 Differentially Methylated Regions and Maternal Folic Acid Use before and during Pregnancy. Epigenetics 2011;7(6):928-36.

<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>