

# 抽取血液 DNA 作業流程

## 步驟一.配緩衝液(buffer)

### 一. 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(pHmeter)
5. 4°C 冰箱
6. 純水系統

### 二. 耗材

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

### 三. 試劑

1. 滅菌過的二次水(ddH<sub>2</sub>O)，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(MgCl<sub>2</sub>)
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)

### 四. 配製

#### 1. 配製 10mM 三羥甲基氨基甲烷(Tris-HCl) 500ml 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**。

#### 2. 配製 10mM 氯化鉀(KCl) 500ml 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。

#### 3. 配製 10mM 氯化鎂(MgCl<sub>2</sub>) 500ml 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。

#### 4. 配製 2mM 乙二胺四乙酸(EDTA) 500ml 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**。

#### 5. 配製 20% 十二烷基硫酸鈉(SDS)溶液

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。

#### 6. 配製 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。

#### **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。

#### **8.配製 1000 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

**1000 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(MgCl<sub>2</sub>)**

**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

**1000 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(MgCl<sub>2</sub>)**

**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(MgCl<sub>2</sub>)

5ml 乙二胺四乙酸(EDTA)

40ml 氯化鈉(NaCl)溶液

175ml 二次水

## 步驟二. 抽取血液 DNA

### 一.設備

1. 化學排煙櫃(chemical hood)
2. 水浴槽
3. -80℃ 冰箱
4. 微電腦大容量高速離心機、離心機接頭專用上蓋(以防止血液濺出，汙染微電腦大容量高速離心機內部)
5. 低溫離心機(eppendorf Centrifuge 5415 R)
6. 桌上型微量離心機
7. 超微量分光光度計(Thermo NANODROP 2000)
8. 微量吸管(pipetman) (1000ul、200ul、10ul)
9. 自動微量吸管(autopipetman)
10. 純水系統
11. 製冰機

### 二.試劑

(說明:取八支 50ml 尖底離心管，各自分裝 50ml 下述的緩衝液，並在上蓋及側邊寫上緩衝液名稱。)

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(ddH<sub>2</sub>O)，簡稱二次水。

### 三.耗材

1. 15ml 尖底離心管
2. 50ml 尖底離心管
3. 3cc 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(1000ul、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)

### 四. 抽取血液檢體 DNA (步驟 1-16.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)與裝中間層(**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中間層(**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.用自動微量吸管吸取 **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，並利用 **10ml** 定量吸管加入 **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。
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 **1000ul** 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 **50µl** 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 **1000ul** 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，**3200 rpm** 離心 **25** 分鐘。
- 20.用 **1000ul** 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**，並輕輕混合均勻。
- 23.放入**-30°C** 冰箱 **30** 分鐘，使其完全反應。
- 24.自**-30°C** 冰箱取出 **15ml** 尖底離心管，於室溫下靜置回溫。
- 25.用 **1000ul** 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(**eppendorf 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** 孔) (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。

#### Reference:

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.**