

HiPure Bone DNA Kit

骨头 DNA 试剂盒

本产品适合于从骨头样品中提取 DNA，得到的 DNA 可直接用于 PCR 和 STR 检测。

产品组份

产品编号	D3127-01	D3127-02	D3127-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure DNA Mini Columns I	10	50	250
2ml Collection Tubes	10	50	250
Buffer BGL	10 ml	40 ml	180 ml
Buffer GXP	10 ml	30 ml	150 ml
Buffer GW1	6 ml	13 ml	50 ml
Buffer GW2	6 ml	20 ml	2 x 50 ml
DTT Powder	235 mg	235 mg	2 x 235 mg
Proteinase K	12 mg	48 mg	240 mg
Protease Dissolve Buffer	1.8 ml	5 ml	15 ml
Elution Buffer	5 ml	15 ml	60 ml

保存条件

本产品室温(15~25℃)可保存 18 个月。Proteinase K/DTT 干粉室温运输和保存，长期保存(>6 个月)建议放置于-20~8℃。溶解后的 Proteinase K 需保存于-20~8℃。溶解后的 DTT 需保存于-20℃。

准备事项

- 溶解 Proteinase K (20mg/ml): 加入适量的 Protease Dissolve Buffer 溶解 Proteinase K 至终浓度为 20mg/ml, 颠倒混匀让蛋白酶充分溶解。Proteinase K 干粉可在室温下保存一年, 但溶解的 Proteinase K 保存于-20~-8℃。
- DTT 溶解: 加入 1.5ml Elution Buffer 至 DTT 干粉中颠倒混匀, 待用或保存于-20℃。
- Buffer GW1 使用前, 须按瓶子标签所示, 加入无水乙醇进行稀释。
- Buffer GW2 使用前, 须按瓶子标签所示, 加入无水乙醇进行稀释。

骨头研磨

来自骨骼样本的 STR 图谱的质量取决于骨骼的类型、年龄和环境储存条件。土壤条件和湿度对 DNA 质量有着深远的影响。提取过程成功取决于研磨程度, 研磨可以通过物理研磨或用低速操作的钻头来实现, 以减少热量积聚。提取过程对细磨骨粉最有效, 其中散布在骨基质中的细胞更容易消化。

骨粉研磨: 用液氮预冷牙齿或骨头, 用液氮预冷骨粉研磨器。把样品转移至骨粉研磨器中, 用锤子用力敲打数次, 用液氮再预冷研磨器, 再敲打数次直至样品形成部分细少粉末和细小的骨碎, 把样品转移至容器中, 轻轻振荡, 把大块样品继续研磨成细少粉末。在容器中轻轻振荡, 挑选出细少粉末进行实验。

珠磨仪: 请参考珠磨仪的参数。

实验步骤

1. 转移 100~200mg 骨粉至 2.0ml 离心管中。加入 600 μ l Buffer BGL, 6 μ l 1M DTT 和 40 μ l Proteinase K, 颠倒混匀数次。55 $^{\circ}$ C, 1000-1500rpm 振荡温浴 3~24 小时。
细小骨粉消化 3 小时也可得到足够 DNA, 有条件时消化时间可以延长至 24 小时。
2. 室温下, 13,000 \times g 离心 3 分钟。
3. 转移 500 μ l 上清液至新的 2.0ml 离心管中。加入 500 μ l Buffer GXP 和 250 μ l 无水乙醇至上清液中, 颠倒混匀 10-15 次。
4. 把 HiPure DNA Mini Column I 装在 2ml 收集管中。转移 600 μ l 混合液转移至柱子中。12,000 \times g 离心 1 分钟。
5. 倒弃滤液, 把柱子装回收集管中。把余下的混合液转移至柱子中, 12,000 \times g 离心 1 分钟。
6. 倒弃滤液, 把柱子装回收集管中。加入 500 μ l Buffer GW1 至柱子中。12,000 \times g 离心 1 分钟。
7. 倒弃滤液, 把柱子装回收集管中。加入 500 μ l Buffer GW2 至柱子中。12,000 \times g 离心 1 分钟。
8. 倒弃滤液, 把柱子装回收集管中。加入 500 μ l Buffer GW2 至柱子中。12,000 \times g 离心 1 分钟。
9. 倒弃滤液, 把柱子装回收集管中。12,000 \times g 离心 2 分钟。
10. 打开柱子盖子, 静置 10~15 分钟让柱子的滤膜充分干燥。
11. 将柱子装在新的 1.5ml 离心管中, 加入 20~100 μ l 预热至 55 $^{\circ}$ C Elution Buffer 柱子的膜中央, 放置 3 分钟。12,000 \times g 离心 1 分钟。
12. 转移洗脱液或 20-100 μ l 预热至 65 $^{\circ}$ C Elution Buffer 至柱子的膜中央, 放置 3 分钟。12,000 \times g 离心 1 分钟。
13. 丢弃 DNA 结合柱, 把 DNA 保存 2-8 $^{\circ}$ C, 长期保存需放置于-20 $^{\circ}$ C。

常见问题

1. 柱子堵塞

- **样品用量太多**：减少样品量，富含核酸样品如肝脏、脾脏、肺脏，用量不要超过 10mg。
- **样品消化不充分**：用液氮或玻璃匀浆器对样品进行研磨和匀浆，提高样品的消化效果。延长 Proteinase K 消化时间或过夜消化。
- **消化液存在不溶解物质**：若样品消化后仍存在明显的颗粒，于 12,000 x g 离心 3 分钟去除未消化的物质。

2. DNA 产量低

- 参考柱子堵塞部分。
- **样品消化不充分**：延长消化时间让样品充分消化，用玻璃匀浆器对样品进行匀浆。
- Buffer GW1/GW2 没有加入乙醇稀释。
- **洗脱不充分**：洗脱液需加到膜中央，增加洗脱体积或次数。

3. DNA 纯度不达标

- **样品用量太多**：减少样品用量。
- **复杂样品**：对于一些富含代谢物质的组织，样品经 Buffer ATL/Proteinase K 消化后，用等体积的酚氯仿抽提后，再继续操作。