

FFPE DNA Kit

石蜡包埋组织 DNA 提取试剂盒

目录号：DHYC27-01；DHYC27-02

试剂盒组成

Component	DHYC27-01 (50 preps)	DHYC27-02 (100 preps)
Buffer SL	15 ml	25 ml
Buffer VL	15 ml	25 ml
Buffer WB1	25 ml	50 ml
Buffer WB2	13 ml	25 ml
	第一次使用前按说明加指定量无水乙醇	
Buffer EB	10 ml	20 ml
Proteinase K (20 mg/ml)	1 ml	1 ml x 2
Spin Columns AC with Collection Tubes	50	100

保存方法

室温（15-30°C）保存。

本产品仅供科研使用。请勿用于医药、临床治疗、食品及化妆品等用途。

产品介绍

本试剂盒采用二甲苯脱蜡方式去除石蜡，应用特殊的裂解条件释放组织切片中的 DNA，克服了福尔马林交联造成的抑制效应。本试剂盒适用于从福尔马林固定、石蜡包埋的组织中有效纯化总 DNA，包括基因组 DNA 和线粒体 DNA。采用优化的缓冲体系使裂解液中的 DNA 高效特异的结合到硅基质离心吸附柱上，而其他杂质可流过膜，PCR 和其他酶促反应的抑制剂可通过两步洗涤被有效去除，最后使用低盐缓冲液或水洗脱，即可获得高纯度 DNA，可以直接用于酶切、PCR、Real-Time PCR、文库构建、Southern Blot、分子标记等下游实验。

注意事项

1. 拿到样品后要尽快在 4-10%的福尔马林中固定，固定时间以 8-24 h 内为宜，时间过长导致基因组断裂，影响下游实验。
2. 确保包埋前的样品彻底脱水，残留的福尔马林会抑制 PCR 检测酶的作用。
3. 本试剂盒适用于医学、科学实验研究。
4. 本试剂盒所提 DNA 的完整性依赖于样本类型、储存时间以及固定条件。如果甲醛固定时间过长或样本存放时间过久 (>1 年) 则易导致 DNA 完整性受损，无法扩出长片段。
5. 若 Buffer SL 和 VL 中有沉淀，可在 37°C 水浴中重新溶解，摇匀后使用。
6. 试剂盒中各试剂在使用前应按照说明书要求操作。

标准抽提步骤（以下所有离心步骤均在室温下进行）

- 第一次使用前请先在 Buffer WB2 瓶加入指定量无水乙醇，充分混匀，加入后请及时在方框内打钩标记，以免重复加入！

1. 样本处理

- a. 石蜡切片：取石蜡切片（5-10 μm 厚，1x1 cm^2 大小）5-8 张。
- b. 石蜡块：手术刀刮取约 30 mg 的组织样本（尽量除去多余的石蜡）。

注意：如果样品表面暴露于空气中，最初刮取的 2-3 片弃掉不用。

- c. 福尔马林等固定液中的样本：取 30 mg 样本，用手术刀切为数块，置于 1.5 ml 离心管中，加入 500 μl PBS (10 mM, pH7.4) 涡旋振荡混匀，12,000 rpm ($\sim 13,400\times g$) 室温离心 1 min，弃上清，重复 3 次，可直接步骤 6 开始操作。

2. 将石蜡切片或石蜡块样本放入 1.5 ml 离心管中，加入 **1 ml 二甲苯**，盖紧管盖，剧烈涡旋振荡 10-30 sec。
-

3. 12,000 rpm 室温离心 2 min, 弃上清, **注意不要吸弃沉淀。**
4. 加入 **1 ml 无水乙醇**, 涡旋混匀 10 sec. 12,000 rpm 室温离心 2 min, 弃上清。 **注意不要吸弃沉淀。**
5. 打开管盖, 室温或 37°C 干燥 150 min, 直至无乙醇残留。
6. 加入 180 μ l Buffer SL 和 20 μ l Proteinase K, 涡旋混匀, 56°C 孵育 1-2 h 直至样本完全裂解。
7. 90°C 孵育 1 h. 短暂离心, 使管壁上的溶液收集到管底。
注意: 1) 此步骤的目的是修复由甲醛变性的核酸, 孵育的温度过高或时间过长可能造成 DNA 断裂, 产生 DNA 碎片。
2) 56°C 孵育后的样品可置于室温, 直至水浴锅或干浴锅温度达到 90°C 后再把样品置于 90°C 孵育。
3) 如需除去 RNA, 可将样品温度降到室温后, 加入 10 μ l 浓度为 25 mg/ml 的 RNase A 溶液 (货号: N63), 震荡混匀, 室温放置 5 min。
8. **可选步骤:** 若消化液仍存在明显不消化的杂质, 12,000 rpm (\sim 13,400 \times g) 离心 2 min 去除杂质。 **转移上清液至新的离心管。**
9. 加入 200 μ l Buffer VL 和 200 μ l 无水乙醇, 涡旋混匀 15 sec。
注意: 处理多个样品时, Buffer VL 和无水乙醇可按 1:1 比例预先混合后加样。
10. 将得到的溶液转入已装入收集管的吸附柱(Spin Columns AC)中。12,000 rpm 离心 1 min, 弃废液。
11. 向吸附柱 AC 中加入 500 μ l Buffer WB1, 12,000 rpm 离心 1 min, 倒掉废液。
12. 向吸附柱 AC 中加入 600 μ l Buffer WB2 (**使用前请检查是否已加入无水乙醇!**), 12,000 rpm 离心 1 min, 倒掉废液。
13. 重复步骤 12。
14. 将吸附柱 AC 放回空收集管中, 12,000 rpm 离心 2 min, 尽量除去残留的 WB2, 弃掉收集管和废液。
注意: 这一步的目的是将吸附柱中残余的乙醇去除, 乙醇的残留会降低洗脱效率, 影响后续的酶促反应 (酶切、PCR 等)。为确保下游实验不受残留乙醇的影响, 可以将吸附柱开盖放置几分钟, 以彻底晾干残余乙醇。
15. 将吸附柱 AC 放入一个新的 1.5 ml 离心管中, 向吸附膜的中间部位悬空滴加 30-100 μ l

Buffer EB, 室温放置 3-5 min, 12,000 rpm 离心 1 min, 收集 DNA 溶液。 -20°C 保存 DNA。

注意: 1) Buffer EB 在 56°C 中预热可以增加产量。也可用无菌水洗脱, 但应确保其 PH 在 7.0-8.5 范围内。

2) 如果要提高 DNA 的终浓度, 可以使用小于 100 μ l EB 洗脱, 也可以将步骤 15 所得的 DNA 溶液重新加至吸附膜上, 再次离心洗脱。如果预期 DNA 的量小于 1 μ g, 推荐用 30 μ l Buffer EB 进行洗脱。
