

HiPure FFPE DNA Kit

石蜡包埋组织 DNA 小提试剂盒

本产品为石蜡包埋组织和石蜡组织切片的总 DNA 提取提供了一个简单快速的解决方案。试剂盒基于硅胶柱纯化技术，提取过程中无需使用有毒的酚氯仿抽提，也无需进行耗时的醇类沉淀，整个提取过程只需 20 分钟(除消化时间)。得到的 DNA 可直接用于 PCR、Southern Blot、病毒 DNA 检测等实验。

产品组份

产品编号	D3126-01	D3126-02	D3126-03	D3126-04
纯化次数	20 次	50 次	250 次	1000 次
HiPure DNA Mini Columns I	20	50	250	4 x 250
2ml Collection Tubes	20	50	250	10 x 100
Buffer DPS	20 ml	50 ml	250 ml	4 x 250 ml
Buffer ATL	6 ml	15 ml	60 ml	270 ml
Buffer AL	6 ml	15 ml	60 ml	220 ml
Buffer GW1 *	6.6 ml	13 ml	66 ml	3 x 176 ml
Buffer GW2*	6 ml	20 ml	50 ml	2 x 100 ml
Proteinase K	12 mg	24 mg	120 mg	480 mg
Protease Dissolve Buffer	1.8 ml	1.8 ml	15 ml	30 ml
Buffer AE	5 ml	15 ml	60 ml	120 ml
说明书	1	1	1	1

Buffer AE 成分：10mM Tris, 0.5mM EDTA, pH9.0

保存条件

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

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，轻轻颠倒让蛋白酶 K 充分溶解。Proteinase K 干粉可在室温下保存一年，但溶解的 Proteinase K 须分装保存于-20~8℃。
- 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。
- 福尔马林固定组织切片：样本离体后，请立即加入不低于 10 倍体积的 10%中性福尔马林溶液中进行固定。。福尔马林固定以及石蜡包埋程序会造成核酸的片段化，建议手术切除标本固定时间不超过 24 小时，活检组织标本固定时间小于 12 小时为，样本包被之前必须彻底脱水。切片厚度不超过 20 μ m，切片数应不超过 6 卷，表面积应不超过 250 mm²。初次实验时，用的切片数应不超过 3 片。
- 固定组织：由于福尔马林固定会造成核酸的片段化，样品在福尔马林溶液中浸泡时间不要超过 24 时，达到固定效果后，尽快用无水乙醇清洗数次去除甲醛，浸泡 75%乙醇溶液中，2-8 度保存。提取时，用生理盐水或 PBS 清洗去除乙醇，按操作方农村建设 A 的第 3 步进行操作。

方案. 石蜡包埋组织DNA共提取

● 方案 A: 去除脱蜡液流程

1. 去除多余石蜡，把石蜡包埋组织样品切成 10-20 μ m 的切片，若样品已暴露在空气中，去除表面的 1-2 个切片。转移 1~6 个切片至 1.5ml 离心管中，加入 0.8~1.0ml Buffer DPS，涡旋混匀 10 秒，56℃温育 5 分钟让石蜡充分溶解。

当石蜡较多时，脱蜡液与石蜡比例不够时，常温下脱蜡液/石蜡会固化而影响操作，此时可以加入更多的脱蜡液(总体积 1.5-1.8ml)，56℃温育 1-3 分钟充分溶解。若石蜡去除不充分时，吸弃脱蜡液后再进行第二次脱蜡以充分去除石蜡。

2. 14,000 x g 离心 2 分钟收集组织，小心吸弃上清液，残留少量的脱蜡液不影响操作。
3. 加入 200µl Buffer ATL 和 20µl Proteinase K，混匀，55°C 温育 60 分钟，90°C 温育 60 分钟。55°C 温育时间不要低于 1 小时，但可以温育更长时间，甚至过夜。处理 1-3 个切片时，55°C 温育 1 小时已经足够。当需要处理组织碎块或更多切片时，延长消化时间至 2 小时，或过夜有利于提高 DNA 的产量。
90°C 处理可以逆转被甲醛修饰的核酸。受甲醛固定时间的影响，有部分样品可能需要延长 90°C 的温育时间至 2 小时来提高产量和扩增效率，延长时间 DNA 片段会更短一些。若样品经 55°C 温育过夜后，90°C 温育时间可以缩短至 20-30 分钟来提高 DNA 的完整性。
4. 13,000 x g 离心 3 分钟，转移 200µl 上清液至新的离心管中，按 5 步进行操作。

● **方案 B: 不去除脱蜡液流程**

1. 用干净刀片去除多余石蜡。把样品切成厚度为 10-20µm 的切片。若样品已暴露在空气中，去除表面的 1-3 个切片。转移 1~3 个切片至 1.5ml 离心管中，加入 ~0.6ml Buffer DPS (脱蜡液) 至样品中，涡旋混匀 10 秒，56°C 温育 3~5 分钟让石蜡充分溶解。
2. 14,000 x g 离心 5 分钟让组织碎片沉淀至管底。
3. 加入 200µl Buffer ATL 至离心管底部，然后再加入 20µl Proteinase K 至离心管底部，并轻轻吸打 3~5 次。55°C 温育 60 分钟，90°C 温育 60 分钟。
不要振荡温育以防止 Buffer ATL 和脱蜡液发生乳化发生，影响消化效果。
4. 14,000 x g 离心 1 分钟，转移下层消化液 (~200µl) 至新的离心管中，按 5 步进行操作。离心后，脱蜡液/石蜡在上层，含 DNA 的消化液在下层溶液，转移下层消化液至新的离心管中，转移少量的脱蜡液不影响的提取。

● **方案 C: 无需脱蜡步骤**

1. 用干净刀片去除多余石蜡。把样品切成厚度为 10-20µm 的切片。若样品已暴露在空气中，去除表面的 1-3 个切片。转移 1~4 个切片至 1.5ml 离心管中，13,000 x g 离心 3 分钟让切片尽量沉淀至管底。
2. 加入 250µl Buffer ATL 和 20µl Proteinase K 至样品中，65°C 振荡温育 90 分钟。90°C 温育 60 分钟。

- 立即于 $14,000 \times g$ 离心 1 分钟去除杂质。
- 小心用移液器拨开石蜡层，转移 200 μ l 下层消化液至新的离心管中，按 5 步进行操作。
离心后，石蜡会固定并漂浮在消化液的上面。

DNA 抽提 过柱纯化

- 可选，去除 RNA：加入 10 μ l RNase A(自备，货号 RN25-1)至消化液中，混匀，静置 10~15 分钟消化 RNA。
不加入 RNase A 时，本产品可以提到大量的 RNA。
- 加入 200 μ l Buffer AL 至消化液中，涡旋混匀 5 秒。
- 加入 200 μ l 无水乙醇至消化液中，涡旋混匀 5 秒。
处理多个样品时，Buffer AL 和无水乙醇可按 1:1 比例预先混合。
- 把 DNA 柱装在收集管中，转移全部混合液至柱子。12,000 $\times g$ 离心 30~60 秒。
- 倒弃滤液，把柱子装回收集管中，加入 500 μ l Buffer GW1(已用乙醇稀释)至柱子上，12,000 $\times g$ 离心 30~60 秒。
- 倒弃滤液，把柱子装回收集管中，加入 500 μ l Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中，12,000 $\times g$ 离心 30~60 秒。
- 倒弃滤液，把柱子套回收集管中。加入 300 μ l Buffer GW2 (已用无水乙醇稀释)至柱子中。
12,000 $\times g$ 离心 2 分钟。
取出柱子时不要颠倒或侧转，不要让柱子的底部碰到收集管中的液体。若碰到了液体，倒弃废液后，把柱子放回收集管中再离心一次甩干柱子。
- 将柱子转移至新的 1.5ml 离心管中，加入 20~50 μ l 预热至 65 $^{\circ}$ C Buffer AE 至柱子的膜中央。
放置 1 分钟，12,000 $\times g$ 离心 1 分钟。
- 转移洗脱液或 20-50 μ l 预热至 65 $^{\circ}$ C Buffer AE 至柱子的膜中央，放置 3 分钟。12,000 $\times g$ 离心 1 分钟。
- 丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存于 2~8 $^{\circ}$ C，长期保存需放置于 -20 $^{\circ}$ C 或 -80 $^{\circ}$ C。