

新型石蜡包埋组织DNA 提取试剂盒

(离心柱型)

AT3013-01/02 使用说明书

产品简介

本试剂盒采用安全无毒的环保脱蜡试剂去除石蜡，并且兼容二甲苯脱蜡。应用特殊的裂解条件将石蜡组织中的 DNA 释放出来，再采用可以特异性结合核酸的离心吸附柱和缓冲液系统，完成对 DNA 的提取。

整个提取过程不涉及有毒有害试剂，安全、便捷，提取的基因组 DNA 纯度高，质量稳定可靠。使用本试剂盒提取的 FFPE DNA 可适用于多种下游应用，如 PCR、NGS 捕获测序、Real-time PCR、SNP 基因分析 STR 基因分析、药物基因组学研究等。

试剂盒组成

产品成分	AT3013-02 (50 次)	AT3013-02 (200 次)	保存条件
缓冲液 TA	50 mL	200 mL	室温
缓冲液 TL	10 mL	40 mL	室温
蛋白酶 K	1 mL	4 mL	室温
缓冲液 TB	15 mL	60 mL	室温
缓冲液 TW1	19 mL	76 mL	室温
缓冲液 TW2	26 mL	104 mL	室温
缓冲液 TE	5 mL	20 mL	室温
吸附柱	50 个	200 个	室温
收集管	50 个	200 个	室温

注意事项

1. 试验前请仔细阅读本说明书，注意每个组分的保存温度，确保实验顺利完成；
2. 操作过程请注意避免样本之间的交叉污染；
3. 请使用 DNase/RNase-Free 的枪头、EP 管进行试验；
4. 初次使用时，请按照缓冲液 TW1 和 TW2 试剂瓶标签上的指示，加入无水乙醇，并做好标记；
5. 若缓冲液 TL、TB 中有沉淀，可在 55°C 水浴重新溶解，摇匀后使用；
6. 本产品所提 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；

需自备试剂和耗材

无水乙醇，DNase/RNase-Free H₂O，RNase A (100mg/ml)
各类移液吸头；1.5mL 离心管；

操作步骤

第一次使用前，应按照试剂瓶标签在 TW1, TW2 中加入无水乙醇并充分摇匀；所有离心步骤均为使用台式离心机在室温下离心；实验开始前请提前设置 56°C 和 90°C 预热水浴锅或恒温金属浴。

1. 样本处理

a. 石蜡涂片：刮取石蜡涂片 5~10 张。

b. 石蜡切片：取石蜡切片 (5-10 μm 厚, $1\times 1\text{ cm}^2$ 大小) 2-5 张。

c. 石蜡块：手术刀刮取约 30 mg 的组织样本（尽量去除多余的石蜡）。

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。

d. 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 无菌离心管中，加入 500 μl PBS (10 mM, pH7.4) 涡旋振荡混匀 12,000 rpm (~13,400 $\times$ g) 室温离心 1 min, 重复 3 次。

2. (本试剂盒默认无毒脱蜡方案并提供无毒脱蜡液，客户亦可根据偏好选取二甲苯脱蜡，须自备二甲苯。二甲苯脱蜡方案详细步骤见说明书附 1。)

将石蜡切片或石蜡块样本装于 1.5ml 无菌离心管中，加入 1ml 缓冲液 TA，剧烈涡旋 1min，56°C 放置 10min。

3. 全速离心 2min，彻底吸弃上清。注意：不要吸到沉淀。

4. 加入 200 μl 缓冲液 TL，20 μl 蛋白酶 K，充分混匀，56°C 孵育 1h，期间颠倒混匀 3 次。

5. 将上一步骤产物置于 90°C 孵育 1h。

6. (可选步骤) 如果要去掉 RNA，可以将样品中加入 2 μl RNase A (100 mg/ml，客户自备)，室温孵 2 min 后，进行下一步操作。

7. 将孵育好的产物稍微冷却，12,000 rpm (~13,400 $\times$ g) 室温离心 5 min。

8. 小心转移上清到新的 1.5mL 离心管中，加入 300 μl 缓冲液 TB，250 μl 无水乙醇，充分涡旋混匀。短暂离心使管壁上的溶液收集到管底。

9. 将以上混合液转入到吸附柱中，8,000rpm (~6,000 $\times$ g) 室温离心 2min，倒掉废液，重新将吸附柱放回收集管中。

注意：吸附柱的容积为 750 μl ，可将剩余液体重复上述步骤上柱。

10. 向吸附柱中加入 500 μl 缓冲液 TW1 (请确认是否已添加无水乙醇)，8,000rpm (~6,000 $\times$ g) 离心 30 sec，倒掉废液，重新将吸附柱放回收集管中。

11. 向吸附柱中加入 700 μl 缓冲液 TW2 (请确认是否已添加无水乙醇)，8,000rpm (~6,000 $\times$ g) 离心 30 sec，倒掉废液，重新将吸附柱放回收集管中。

12. 重复操作步骤 11。

室温放置2-5min，以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。注意：漂洗液中乙醇的残留会影响后续的酶反应，所以晾干时要确保乙醇挥发干净，但

注意：漂洗液中乙醇的残留会影响后续的酶反应，所以晾干时要确保乙醇挥发干净，但也不要过分干燥，以免影响 DNA 洗脱。

14. 将吸附柱转入一个干净的离心管中，向吸附膜的中间部位悬空滴加 65℃预热的 50μl ~100μl 缓冲液 TE 或 ddH₂O 洗脱，室温放置 2~5min，12,000rpm(~13,400×g)离心 2min，将溶液收集到离心管中，样本可放置于-20℃长期保存。

注意：洗脱缓冲液体积不应少于 30 μl，体积过小影响回收效率。为增加基因组 DNA 的得率，可将离心得到的溶液再加入吸附柱中，室温放置 2 min，12,000 rpm (~13,400×g)离心 2 min。洗脱液的 pH 对于洗脱效率有很大影响。若用水做洗脱液应保证其 pH 值在 7.5-8.5 范围内，pH 值低于 7.5 会降低洗脱效率；且 DNA 产物应保存在-20℃，以防 DNA 降解。

附 1：二甲苯脱蜡操作步骤

- A1. 将步骤 1 中的石蜡切片或石蜡块样本装于 1.5ml 无菌离心管中，加入 1ml 二甲苯，剧烈涡旋 1min。
- A2. 全速离心 2min，弃上清。**注意：不要倒掉沉淀。**
- A3. 向上述管中加入 1ml 无水乙醇，涡旋混匀 1min。
- A4. 全速离心 2min，弃上清。重复步骤 4 一次。**注意：不要倒掉沉淀。**
- A5. 将沉淀放入 56℃干燥 5min，充分挥发乙醇。
- A6. 按步骤 4-14 进行操作。

常见问题 Q1：柱子堵塞

Q1： 柱子堵塞

A1： 样品用量太多：起始量与 DNA 分离的组织类型、大小和数量均有关系，建议的组织厚度为 5-10 μm 。所用的切片数量取决于组织类型（决定细胞密度）和表面积大小(推荐大小：50-200 mm^2)。建议减少样品用量，石蜡组织切片不要超过 5~10 片。

A2： 脱蜡不充分：切片过厚或包埋时使用过量石蜡。建议 1) 室温下重复用二甲苯或无毒脱蜡液脱蜡，以彻底去除石蜡。2) 必要情况下，可在更为强效的 37–55°C 条件下处理达 30 分钟。3) 在二甲苯脱蜡操作完成后，须对沉淀物进行两次 100%乙醇漂洗再彻底去除 100%乙醇。

A3： 样品消化不充分：把组织块尽量切成小碎片或切片。延长 56°C 温浴时间，最长可过夜孵育。

Q2: DNA 产量低

A1： 参考 1 柱子堵塞解决方案。

A2： 解交联不充分：延长 90°C 温浴时间至 90~120 分钟。

A3： 缓冲液 TW1/TW2 没有加入乙醇稀释。

A4： 洗脱不充分：洗脱液需保证 pH 值在 7.5-8.5 之间，并提前预热；洗脱液需加到膜中央；增加洗脱体积或次数。

A5： Proteinase K 活性下降：使用保质期内的蛋白酶 K，超过保质期请更换试剂。

Q3: DNA 纯度不达标

A： 参考 1 和 2 中的解决方案。

Q4: RNA 残留

A： 加入 RNASE 处理: 90°C 去交联后，加入 2~5 μl RNase A 至消化液中，混匀后室温放置 15 分钟。

Q5：是否可以通过缩短孵育时间加快实验速度

A： 可以，我们的试剂可以匹配快速操作方案，DNA 得率较标准法会有所降低，但可以满足大多数的实验需求。参考条件为：56°C 裂解时间最低可以调整至 30min, 90°C 复性时间最低可以调整至 30min，其余条件均不改变。

对于质量差的石蜡切片样本或者下游实验对得率要求较为严苛的情况，我们强烈推荐使使用标准说明书进行 DNA 提取，以获得满意的实验结果。