

FastPure FFPE DNA Kit Handbook

FastPure FFPE 石蜡切片基因组 DNA 提取试剂盒

产品组成

FastPure FFPE DNA Kit		
产品编号	EK-1217-50T	EK-1217-100T
纯化次数	50 次	100 次
Buffer ATL	14mL	28mL
Buffer AL	12mL	24mL
Buffer AW1	19mL	38mL
Buffer AW2	17mL	34mL
Buffer ATE	10mL	20mL
Proteinase K Solution (20mg/mL)	1.25mL	2.5mL
DNA Mini Columns	50 个	100 个
2mL Collection Tubes	50 个	100 个
使用手册	1	1

产品介绍

本产品 FFPE 提取试剂盒专为从甲醛固定、石蜡包埋的组织切片中提取 DNA 而设计。该试剂盒采用特殊的裂解条件释放组织切片中的 DNA，并克服了由于甲醛交联核酸而引起的抑制效应。纯化的 DNA 可用于各种下游应用，如 PCR、单核苷酸多态性 (SNP) 和短串联重复 (STR) 基因分型以及药物基因组研究等。

存储条件

Proteinase K Solution 可在 2~8°C 保存，其余试剂可以室温(15~25°C)下保存 12 个月。

需要额外准备的材料

- 无水乙醇 (96%-100%)
- 无菌 1.5mL 离心管

开始前注意事项 请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项:

- Buffer ATL, Buffer AL 或 Buffer AW1 若有沉淀析出，可在 55°C 水浴中重新溶解，摇匀后使用。
- Proteinase K Solution 保存于 2-8°C，反复冻融会影响其活性。
- 小型高速离心机 (~13000rpm)
- 水浴锅/加热块温度分别设置至 56°C 和 90°C

开始前试剂准备

- 按瓶子标签所示，加入相应体积的无水乙醇稀释 Buffer AW1，于室温密封保存。
- 按瓶子标签所示，加入相应体积的无水乙醇稀释 Buffer AW2，于室温密封保存。

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 小时为宜。时间过长导致基因组断裂，影响下游实验。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。
2. 本产品所提取的 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 (超过 1 年)，则易导致 DNA 完整性受损，无法扩出长片段。由于 FFPE 样本的特殊性，建议下游 PCR 扩增产物长度控制在 200 bp 以内，以获得最佳成功率。
3. 环境温度较低时建议观察 Buffer ATL 是否澄清，若有沉淀，必须 55°C 加热至完全透明方可使用，否则裂解效率会大打折扣。
4. 本试剂盒中离心步骤全程室温离心，低温会使石蜡析出，这是 FFPE 提取失败最常见的原因。

操作步骤:**1. 样本处理**

a. **石蜡切片:** 取 5-8 张石蜡切片, 每张厚度为 5-10 μ m, 尺寸为 1 \times 1cm。

b. **石蜡块:** 使用手术刀刮取约 30mg 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。

c. **福尔马林等固定液中的样本:** 取 30mg 样本, 用手术刀切成数块, 置于 1.5mL 离心管中, 加入 500 μ L 1 \times PBS, 涡旋振荡混匀, 以 12,000 \times g 室温离心 1min。弃去上清, 重复此步骤 3 次。

2. 将石蜡切片或石蜡块切片放入 1.5 或 2mL 微量离心管中, 并向样品中加入 1mL 二甲苯。关闭盖子, 剧烈振荡 10s。

3. 在室温 (15-25 $^{\circ}$ C) 下以 12,000 \times g 离心 2 min, 弃上清。注意: 不要倒掉沉淀。

4. 向沉淀中加入 1mL 无水乙醇, 并通过涡旋混合约 10s。

5. 在室温 (15-25 $^{\circ}$ C) 下以 12,000 \times g 离心 2 min, 弃上清。注意: 不要倒掉沉淀。

注意: 尽可能用细管吸弃更多上清乙醇液。若沉淀中仍有明显的石蜡块, 建议重复一次二甲苯脱蜡步骤。加入乙醇后务必彻底涡旋, 以确保二甲苯被完全洗去。

6. 打开离心管盖, 并在室温放置 10min 或直到所有残留的乙醇挥发。

7. 加入 180 μ L Buffer ATL 和 20 μ L 蛋白酶 K 溶液, 并通过涡旋混合。在 56 $^{\circ}$ C 下孵育 1h (或直到样品完全裂解)。

8. 转移到 90 $^{\circ}$ C 下再孵育 1h

注意: 在 Buffer ATL 中的 90 $^{\circ}$ C 孵育部分地逆转了核酸的甲醛修饰。严禁超过 90 $^{\circ}$ C 或延长孵育时间, 否则会导致 DNA 进一步降解, 影响下游长片段 PCR 扩增。此步骤用于释放被甲醛锁住的 DNA 碱基, 是保证 PCR 扩增成功的前提。

9. (可选步骤) 加入 2 μ L RNase A Solution (100mg/mL) 至消化液中, 颠倒混匀, 室温孵育 2min。注: 在加入 RNase A 前, 让样品冷却至室温。

10. 在上管样品中加入 200 μ L Buffer AL, 必须先剧烈涡旋混匀; 然后加入 200 μ L 无水乙醇, 再次通过涡旋彻底混合。

注意: 加入 Buffer AL 和乙醇时可能会形成白色沉淀物为正常现象, 不会影响后续提取。

11. 把吸附柱套在 2mL 收集管中。将上一步骤所得溶液加入柱中, 8000 \times g 离心 1min。倒掉收集管中的废液, 将吸附柱放回收集管中。

注意: 若柱子出现堵塞, 可提高转速至 14000 \times g 离心 3-5min。若溶液体积超过 700 μ L 则分次上柱。

12. 向吸附柱中加入 500 μ L Buffer Buffer AW1 (请先检查是否已加入无水乙醇), 8000 \times g 离心 1min, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱放回收集管中。

13. 向吸附柱中加入 500 μ L Buffer AW2 (请先检查是否已加入无水乙醇), 8000 \times g 离心 1min, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱放回收集管中。

14. 重复步骤 13 一次。

15. 倒掉收集管中的废液后将吸附柱再次套入收集管中, 最大转速 (~13,400 \times g) 离心 2min 以干燥吸附柱膜。将吸附柱移入新的 1.5 mL 离心管, 开盖室温静置 5-10 min。

注意: Buffer AW2 中的乙醇残留会影响后续的酶反应实验, 直至观察吸附柱膜表面无明显液体反光, 且闻不到酒精味。若环境湿度大, 可适当延长晾干时间。

16. 向吸附柱膜中央位置悬空滴加 50-100 μ L Buffer ATE, 室温静置 1min 后, 最大转速 (~13,400 \times g) 离心 2min 收集 DNA 溶液并置于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

注意: 洗脱体积不应小于 30 μ L, 体积过少会影响回收效率。洗脱液的 pH 值对于洗脱效率有很大影响。为了提高 DNA 的回收量, 可将 Buffer ATE 加热 (约 60 $^{\circ}$ C) 并洗脱两次, 可增加约 15-20% 得率。对于组织量较少的切片 (<3 张), 建议洗脱体积缩小至 30-50 μ L, 以获得更高浓度的 DNA 用于下游扩增。