



NuClean FFPE DNA Kit

新型固定组织DNA提取试剂盒

目录号：CW2646S (50 preps)

保存条件：Spin Columns DF 2-8°C保存,其余组分常温 (15-30°C)保存。

产品内容

Component	CW2646S 50 preps
Buffer DS	30 mL
Buffer GTL	15 mL
Buffer GL	15 mL
Buffer GW1 (concentrate)	13 mL
Buffer GW2 (concentrate)	15 mL
Buffer TE	10 mL
Proteinase K	2×25 mg
Proteinase K Storage Buffer	2×1.25 mL
RNase A (100 mg/mL)	0.4 mL
Spin Columns DF With Collection Tubes	50
Centrifuge Tubes (L-1.5 mL)	50

产品简介

本试剂盒适用于从福尔马林固定、石蜡包埋组织中有效纯化基因组DNA。本品使用专门优化脱蜡剂和裂解液，释放福尔马林固定或组织切片样本中的DNA，不涉及有机试剂二甲苯，无需过夜操作；消化后的样品在较高的温度孵育后，去除游离DNA的福尔马林交联，有效提高DNA的产量和纯度；优化的缓冲系统使裂解液中的DNA可特异结合到吸附膜上，抑制剂通过两步漂洗步骤有效去除，最后使用低盐缓冲液或水洗脱，即可获得高纯度DNA。同时配置高效微量吸附柱，洗脱体积可低至20 μ L。经过纯化的DNA可以直接用于PCR、Real-time PCR、SNP 基因分型、STR基因分型、二代测序和药物基因组学研究等。

从福尔马林固定、石蜡包埋样本中分离的DNA分子量通常低于新鲜或冷冻样本中的DNA。DNA片段化的程度取决于样本类型、储存时间以及固定的条件。

自备试剂：无水乙醇（北京化工厂）

实验前准备及重要注意事项

1. 获得样品后，要尽快将样品在4%–10%的福尔马林中固定，固定时间以14–24小时为宜，时间过长易导致基因组断裂，影响下游实验。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。
2. 确保包埋前的样品彻底脱水，残留的福尔马林会抑制Proteinase K的作用。
3. 向Proteinase K中加入1.25 mL Proteinase K Storage Buffer使其溶解，-20 $^{\circ}$ C保存。配制好的Proteinase K勿长时间室温放置，以免影响其活性。
4. 第一次使用前应按试剂瓶标签说明先在Buffer GW1和Buffer GW2中加入无水乙醇。
5. 使用前请检查Buffer GTL、Buffer GL和Buffer DS是否出现结晶或者沉淀，如有结晶或者沉淀，请将Buffer GTL、Buffer GL和Buffer DS于56 $^{\circ}$ C水浴重新溶解。
6. 实验开始前将水浴锅或恒温混匀仪预热至56 $^{\circ}$ C，离心机保持25 $^{\circ}$ C。
7. 如果下游实验需要降低低频发生的 C>T | G>A 转换（人为突变），将假阳性风险降至最低，可以在90 $^{\circ}$ C孵育1小时后加入7 μ L UNG（1U/ μ L），UNG本试剂盒并未提供，如果需要可单独向本公司订购，货号：CW0951S。

操作步骤

1. 样本处理:

- 1a. 石蜡包埋样本: 用手术刀将组织块中多余的石蜡修剪掉, 露出组织后切成5-10 μm 的薄片。取约1 \times 1 cm^2 的切片 (共约4-5片切片) 置于离心管 (自备) 中, 加入160 μL Buffer DS, 涡旋震荡10秒, 再加入180 μL Buffer GTL和20 μL Proteinase K, 涡旋震荡10秒。12000 rpm, 25 $^{\circ}\text{C}$ 离心1分钟。

注意: 1) 如果样品表面已经暴露在空气中, 请将接触空气的2-3片弃掉不用。

2) DS低于18 $^{\circ}\text{C}$ 会凝固, 如果凝固不影响下面的实验。

- 1b. 福尔马林等固定液中的样本: 取约20 mg的样本, 切成小块, 置于离心管中, 加入500 μL 10 mM PBS (PH7.4), 涡旋振荡, 12000 rpm 离心1分钟, 弃上清, 重复3次。加入180 μL Buffer GTL, 20 μL Proteinase K, 涡旋震荡混匀。
2. 56 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1小时, 直至样品完全溶解。90 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1小时。12000 rpm, 25 $^{\circ}\text{C}$ 离心1分钟, 用移液器沿管壁小心吸取下层水相 (约180 μL) 于新离心管中, 尽量避免吸入管底沉淀和上层蜡液。

注意: 1) 56 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 后再把样品置于90 $^{\circ}\text{C}$ 孵育。

2) 可选步骤: 加入7 μL UNG (1U/ μL), 50 $^{\circ}\text{C}$, 5 min, 不震荡。此步骤的目的是降低低频发生的 C>T | G>A 转换 (人为突变), 同时有效保留真实发生的突变, 从而使假阳性风险降至最低。UNG本试剂盒并未提供, 如果需要可单独向本公司订购, 货号: CW0951S。

3. 可选步骤: 如需除去RNA, 可将样品温度降到室温后, 加入2 μL 浓度为100 mg/mL的RNase A 溶液, 震荡混匀, 室温放置2分钟。
4. 加入20 μL Proteinase K, 65 $^{\circ}\text{C}$, 450 rpm孵育15 min 。
5. 加入200 μL Buffer GL, 涡旋震荡混匀后加入200 μL 无水乙醇, 涡旋震荡彻底混匀。短暂离心, 使管壁上的溶液收集到管底。

注意: 1) 加入Buffer GL和无水乙醇后要立即充分混匀。

2) 加入Buffer GL和无水乙醇后可能会产生白色沉淀, 不会影响后续实验。

3) 如果需要对多个样品进行操作, 可以将Buffer GL和无水乙醇事先混匀后加样。

6. 将步骤5所得溶液全部加入已装入收集管的吸附柱 (Spin Columns DF) 中, 25 $^{\circ}\text{C}$, 12000 rpm 离心2分钟, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。
7. 向吸附柱中加入500 μL Buffer GW1 (使用前检查是否已加入无水乙醇), 12000 rpm 离心1分钟, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。

8. 向吸附柱中加入500 μL Buffer GW2 (使用前检查是否已加入无水乙醇), 12000 rpm 离心1分钟, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。

注意: 如需进一步提高DNA纯度, 可重复步骤8。

9. 12000 rpm离心2分钟, 倒掉收集管中废液。将吸附柱置于室温数分钟以彻底晾干。

注意: 这一步目的是将吸附柱中残余乙醇去除, 乙醇残留会影响后续酶促反应。

10. 将吸附柱置于一个新的1.5 mL收集管中, 向吸附柱的中间部位悬空加入20-100 μL Buffer TE 或灭菌水, 室温放置2-5分钟, 12000 rpm离心1分钟, 收集DNA溶液,

-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存DNA。

注意: 1) 洗脱液的pH值对洗脱效率有很大影响, 若用水做洗脱液应保证其pH值在7.0-8.5, pH值低于7.0时洗脱效率不高。

2) 如果要提高DNA的终浓度, 可以将步骤10所得的DNA洗脱液重新加至吸附膜上, 室温放置2分钟, 12000 rpm离心1分钟。