

## M5 NuClean FFPE DNA kit

### 新型固定组织基因组提取试剂盒使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 NuClean FFPE DNA kit	50T	MF115-01

#### 【储存条件】

Spin Columns DF 室温下可保存 2 个月，2-8°C 保存 1 年，其余组分常温 (15-25°C) 保存。

#### 【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 $\mu$ 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。

#### 【产品组份】

	50T
Buffer GTL	15 ml
Buffer GL	15 ml
Buffer GW1 (concentrate)	13 ml
Buffer GW2 (concentrate)	15 ml
Buffer EB	10 ml
Buffer DS	10 ml
Proteinase K	25 mg
Proteinase K Storage Buffer	1.25ml
Spin Columns DF	
With Collection Tubes	50
Centrifuge Tubes (L-1.5ml)	50

【自备试剂】 无水乙醇

#### 【实验准备】

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°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°C 水浴重新溶解。
6. 如果下游实验对 RNA 污染比较敏感，可以在加入 Buffer GL 前加入 2  $\mu$ l DNase-Free 的 RNase A (100 mg/ml)。
7. 实验开始前将水浴锅或恒温混匀仪预热至 56°C。

## 【操作步骤】

### A、石蜡包埋样本

1. 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  $\mu\text{m}$  的薄片。
2. 取约  $1 \times 1 \text{ cm}^2$  的切片（共约 3-8 片切片）置于离心管（自备）中，加入 160  $\mu\text{l}$  Buffer DS，涡旋震荡 10 秒。短暂离心将样本收集到管底。56°C 孵育 3 分钟，水浴锅中取出后静置，降至室温后进行下一步操作。

**注意：如果样品表面暴露在空气中，最初的 2-3 片弃掉不用。**

3. 上述管中加入 180  $\mu\text{l}$  Buffer GTL，涡旋震荡混匀，12,000 rpm 离心 1 分钟，溶液分为两层。取 20  $\mu\text{l}$  Proteinase K 加入到下层溶液中，移液器小心吹吸混匀。
4. 56°C 孵育 1 小时，直至样品完全溶解。90°C 孵育 1 小时。12,000 rpm 离心 1 分钟，使用 200  $\mu\text{l}$  枪头沿管壁小心吸取下层的水相于新的离心管中。

**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 2  $\mu\text{l}$  浓度为 100 mg/ml 的 RNase A 溶液。**

### B、福尔马林等固定液中的样本

1. 取约 20 mg 的样本，切成小块，置于离心管中，加入 500  $\mu\text{l}$  10mM PBS (PH7.4)，涡旋振荡，12,000 rpm ( $\sim 13,400 \times g$ ) 离心 1 分钟，弃上清，重复 3 次。
2. 上述管中加入 180  $\mu\text{l}$  Buffer GTL，20  $\mu\text{l}$  Proteinase K，涡旋震荡混匀。
3. 56°C 孵育 1 小时，直至样品完全溶解。90°C 孵育 1 小时。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。**

4. 12,000 rpm 离心 1 分钟，使用 200  $\mu\text{l}$  枪头沿管壁小心吸取上清到新的离心管中。

**注意：如需除去 RNA，可将样品温度降到室温后，加入 2  $\mu\text{l}$  浓度为 100 mg/ml 的 RNase A 溶液。**

**以下为两种不同来源样本提取的共同步骤：**

5. 加入 200  $\mu\text{l}$  Buffer GL，涡旋震荡混匀后加入 200  $\mu\text{l}$  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，若一次不能加完溶液，可分多次转入。12,000 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。
7. 向吸附柱中加入 500  $\mu\text{l}$  Buffer GW1 (*使用前检查是否已加入无水乙醇*)，12,000 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  $\mu$ l Buffer GW2 (*使用前检查是否已加入无水乙醇*)，12,000 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. 12,000 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  $\mu$ l Buffer EB 或灭菌水，室温放置 2-5 分钟，12,000 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，12,000 rpm 离心 1 分钟。**



**【备注】**

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。