

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 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。

【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 μ 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 μm 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 μl 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 μl Buffer GTL，涡旋震荡混匀，12,000 rpm 离心 1 分钟，溶液分为两层。取 20 μl 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 μl 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 μl 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 μl 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 μl Buffer GTL，20 μl 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 μl 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 μl 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 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，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 μl 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 μ 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 μ 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°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。