

# 石蜡包埋组织 DNA 快速提取试剂盒

## (离心柱法)

AT3116-01/02 使用说明书

### 产品简介

本试剂盒采用特殊的脱蜡方式和裂解条件能快速的释放组织切片中的 DNA，最大程度上减少了因福尔马林交联对 DNA 的损伤。此外，采用可以特异性结合 DNA 的离心吸附柱和独特的缓冲液系统进行 FFPE DNA 快速提取。整个操作过程不超过 1 小时，并且不涉及有毒有害的有机试剂。提取的基因组完整性好，纯度高，质量稳定可靠。适用于医学临床检验以及科学研究。

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	AT3116-01 (50 次)	AT3116-02 (200 次)	保存条件
裂解液 SL	25mL	100mL	室温
缓冲液 TA	6mL	24mL	室温
缓冲液 SP	2.5mL	10mL	室温
缓冲液 TW1	15mL	60mL	室温
缓冲液 TW2	26mL	104mL	室温
缓冲液 TE	5mL	20mL	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、TW2 试剂瓶标签上的指示，加入无水乙醇，并做好标记。
5. 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 H<sub>2</sub>O，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 98°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  $\mu\text{m}$  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  $\mu\text{l}$  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. 将样本放入 1.5ml 无菌离心管中，加入 500  $\mu\text{l}$  裂解液 SL，再加入 120  $\mu\text{l}$  缓冲液 TA，剧烈涡旋 10 sec。

3. 98°C 孵育 30 min，期间颠倒混匀 3 次，直至样品完全溶解。

**注意：若水浴，请使用长镊子操作。**

4. 12,000 rpm (~13,400 $\times$ g) 室温离心 5 min。

5. 使用 200  $\mu\text{l}$  枪头沿管壁小心吸取中间层的水相清液于新的离心管中 (上层是石蜡及蛋白混合物，下层为少许杂质沉淀，如果分层不彻底可以延长离心时间，直到上层混合物和水相清液很好的分开)。

**注意：如果要去除 RNA，可以在样品中加入 2  $\mu\text{l}$  RNase A (100 mg/ml, 客户自备)，室温孵 2 min 后，进行下一步操作。**

6. 加入 50  $\mu\text{l}$  缓冲液 SP，再加入 450  $\mu\text{l}$  无水乙醇，充分混匀，静置 1min。

7. 将上一步所得的混合液加入一个吸附柱中，8,000 rpm (~6,000 $\times$ g) 室温离心 1 min，倒掉收集管中的废液，重新将吸附柱放回收集管中。

**注意：吸附柱最大容量为 750  $\mu\text{l}$ ，可将剩余液体重复上述步骤上柱。**

8. 向吸附柱中加入 500  $\mu\text{l}$  缓冲液 TW1 (**缓冲液 TW1 在使用前请按照试剂瓶标签的说明加入无水乙醇**)，8,000 rpm (~6,000 $\times$ g) 室温离心 1min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱放回收集管中。

9. 向吸附柱中加入 700  $\mu\text{l}$  缓冲液 TW2 (**缓冲液 TW2 在使用前请按照试剂瓶标签的说明加入无水乙醇**)，8,000 rpm (~6,000 $\times$ g) 室温离心 1 min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱放回收集管中。

10. 重复操作步骤 9。

11. 将吸附柱放回收集管中，12,000 rpm (~13,400 $\times$ g) 离心 2min，倒掉废液，将吸附柱置于室温放置数分钟，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，但也不要过分干燥，以免难以洗脱 DNA。**

12. 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°C 预热的 50-100  $\mu\text{l}$  缓冲液 TE 或

ddH<sub>2</sub>O 洗脱，室温放置 2-5min，12,000 rpm (~13,400×g)离心 2 min，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 50 μl，体积过小影响回收效率。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 7.0-8.5 范围内，pH 值低于 7.0 会降低洗脱效率；且 DNA 产物应保存在-20℃，以防 DNA 降解。**

## 附：常见问题

### 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<sup>2</sup>)。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。延长孵育时间至 60min，最长不超过 2h。

### Q2: DNA 产量低

A1: 参考 1 柱子堵塞解决方案。

A2: 缓冲液 TW1/TW2 没有加入乙醇稀释。

A3: 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。

### 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℃去交联后，加入 2~5μl RNase A 至消化液中，混匀后室温放置 15 分钟。