

## 石蜡包埋组织基因组DNA抽提试剂盒(离心柱式)

产品编号	产品名称	包装
D0064S	石蜡包埋组织基因组DNA抽提试剂盒(离心柱式)	50次

### 产品简介:

- 碧云天研发生产的石蜡包埋组织基因组DNA抽提试剂盒(离心柱式) (Paraffin-embedded Tissue Genomic DNA Purification Spin Kit), 也称石蜡包埋组织基因组DNA提取试剂盒、包埋组织DNA抽提试剂盒、FFPE组织基因组DNA抽提试剂盒等, 是一种采用环保脱蜡方式去除石蜡后抽提DNA的试剂盒。抽提获得的DNA可以应用于PCR、qPCR或基因组学研究等下游实验。
- 福尔马林固定石蜡包埋(Formalin fixation and paraffin embedding, FFPE), 常应用于癌症等疾病研究中保存离体组织的形态学和组织学结构, 以便于运输和储存, 是病理样品长期保存的主要方法之一[1]。组织样品经福尔马林固定时, 组织内细胞中的核酸和蛋白质等分子间随机交联, 核酸出现片段化, 因此难以获得高质量核酸。本试剂盒采用环保脱蜡法去除石蜡, 以特殊的裂解条件释放FFPE组织样本中的DNA分子, 最大程度地降低了福尔马林固定时组织内细胞中DNA与其它分子交联的不利影响, 经本试剂盒抽提获得的DNA纯度高、完整性好、质量稳定。
- 本试剂盒抽提DNA的实验流程如图1所示。首先使用环保的脱蜡剂和蛋白酶K将FFPE样品脱蜡、消化, 随后加入适合DNA结合到纯化柱上的缓冲液, 然后加入到纯化柱内。通过高速离心, 使DNA在穿过纯化柱的瞬间, 结合到纯化柱上, 随后通过三次洗涤去除各种杂质, 最后通过洗脱液把DNA洗脱下来。

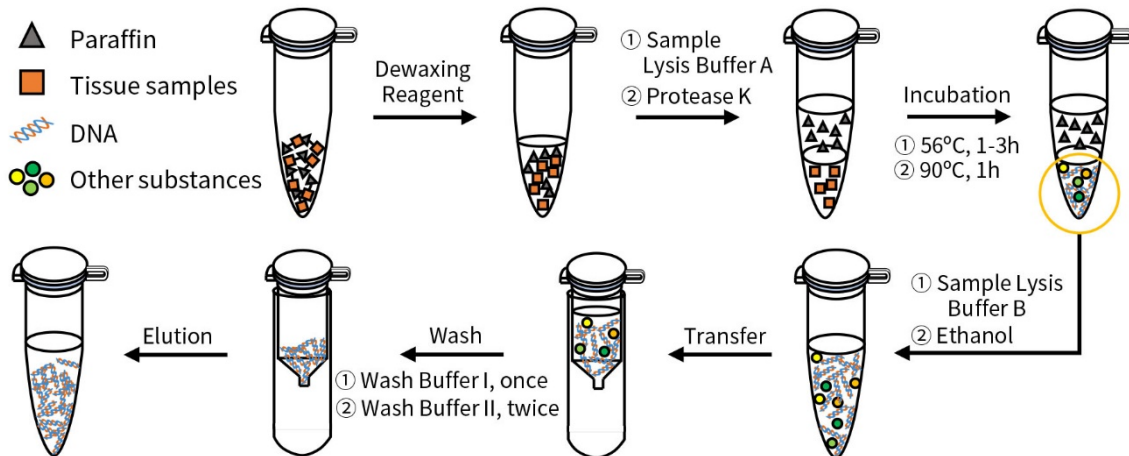


图1. 碧云天石蜡包埋组织基因组DNA抽提试剂盒(离心柱式) (D0064)的实验流程图。

- 本试剂盒抽提获得的石蜡包埋组织样品基因组DNA纯度高。本试剂盒提供的纯化柱对于DNA的最大容量约为30 $\mu$ g, 抽提获得的DNA A260/A280的范围通常在1.6-1.9之间。本试剂盒与常见的T品牌同类产品的抽提效果对比图参见图2。

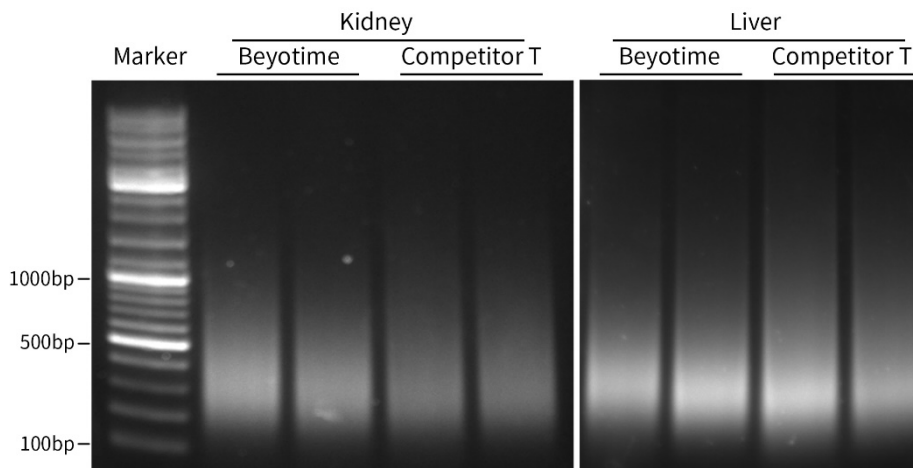


图2. 碧云天石蜡包埋组织基因组DNA抽提试剂盒(离心柱式) (D0064)与T品牌同类产品(Competitor T)的DNA抽提效果对比图。

样品为小鼠肾脏和肝脏组织石蜡切片，样品用量为5片10 $\mu$ m厚切片。抽提后洗脱体积均为50 $\mu$ l，取10 $\mu$ l的洗脱样品与2 $\mu$ l BeyoRed DNA上样缓冲液(6X) (D0072)混合均匀后，在1%琼脂糖凝胶中电泳30分钟后拍照。如图所示，本试剂盒用于抽提小鼠肾脏、肝脏FFPE样品的DNA时，抽提得到的DNA的量与T品牌的同款试剂盒基本一致或略好。注：抽提得到的基因组DNA经RNase A处理。实际结果会因样品、实验条件、检测仪器等的不同而存在差异，图中数据仅供参考。

- **本试剂盒使用安全、高效。**本试剂盒通过特殊的柱纯化介质进行DNA分离纯化，能有效避免常规方法抽提DNA时使用的酚、氯仿等有毒有害有机试剂。
- **本试剂盒操作快速、便捷。**本试剂盒采用柱纯化，无需繁琐的DNA沉淀步骤，纯化DNA操作过程仅需约15分钟即可完成。和国外同类柱纯化产品相比，所需操作步骤和操作时间基本一致。碧云天同时提供更加便捷的BeyoMag™石蜡包埋组织基因组DNA抽提试剂盒(磁珠法) (D0089)。
- 本试剂盒的标准操作步骤抽提得到的总DNA含有少量RNA，但如果按照可选步骤加入RNase A，就可以获得不含RNA的高纯度总DNA。
- 本试剂盒小包装可用于50个样品的总DNA抽提。

#### 包装清单：

产品编号	产品名称	包装
D0064S-1	脱蜡剂	50ml
D0064S-2	样品裂解液A	10ml
D0064S-3	样品裂解液B	11ml
D0064S-4	洗涤液I (首次使用前加17ml无水乙醇)	13ml (+17ml)
D0064S-5	洗涤液II (首次使用前加39ml无水乙醇)	26ml (+39ml)
D0064S-6	洗脱液	11ml
D0064S-7	蛋白酶K	1.1ml
D0064S-8	DNA纯化柱及废液收集管	50套
—	说明书	1份

#### 保存条件：

蛋白酶K -20 $^{\circ}$ C保存，其余均室温保存，一年有效。蛋白酶K室温(15-25 $^{\circ}$ C)存放一周，活力无明显下降。

#### 注意事项：

- 如果希望获得更高质量的DNA，宜尽量使用新鲜固定和包埋的组织样品。拿到组织样品后尽快在4-10%福尔马林中固定，固定时间最好在8-24小时之间或更短时间，长时间固定会使DNA断裂更为严重。
- 样品包埋前应确保彻底脱水，残留的甲醛可能抑制蛋白酶K的消化等相关实验步骤。
- 本试剂盒抽提DNA依赖于样品类型、储存时间以及固定条件。样品固定时间和保存时间过长(>1年)易破坏DNA完整性，无法抽提出长片段。
- 如需制备不含RNA的高纯度总DNA，需自备RNase A，推荐使用碧云天的RNase A (100mg/ml, DNase free) (ST577)。
- 温度较低时样品裂解液A或样品裂解液B中可能会有沉淀产生，属正常现象。使用前必须检查一遍，如有沉淀，55 $^{\circ}$ C水浴孵育使沉淀溶解，混匀后使用。
- **第一次使用前小包装洗涤液I需添加17ml无水乙醇，洗涤液II需添加39ml无水乙醇，混匀，并在瓶上做好标记。**
- 本试剂盒须将FFPE样品56 $^{\circ}$ C和90 $^{\circ}$ C孵育，推荐使用碧云天的BeyoBath™干式恒温金属浴(1.5/2ml $\times$ 40) (E6662)。
- 使用本试剂盒须提前备好无水乙醇。
- 除特别说明外，每次Vortex应控制在5-10秒左右，推荐使用碧云天的BeyoVortex™调速式涡旋混匀仪(E6699)或BeyoVortex™基础型涡旋混匀仪(E6788)。
- 本试剂盒所有操作均在室温进行，操作时无需冰浴。所有离心也均在室温进行。
- 废液收集管在一次抽提中需多次使用，切勿中途丢弃。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

#### 使用说明：

##### 1. 样品处理。

- a. **石蜡包埋组织蜡块：**手术刀切或刮取约10-25mg的组织样品(尽量去除组织周围的石蜡块)。较小的组织碎片会使裂解速度加快，裂解效率提高。
- b. **石蜡包埋组织切片：**取5-8张的石蜡切片(5-10 $\mu$ m厚，表面积小于1 $\times$ 1cm<sup>2</sup>)。如果样品表面暴露于空气中，尽量避免使用。
- c. **福尔马林固定组织：**取10-25mg福尔马林固定液中的组织，用手术刀充分切碎后，置于1.5ml离心管中，加入500 $\mu$ l的PBS, pH7.4 (DNase, RNase & Protease free, Sterile) (ST478)，Vortex震荡混匀，12,000 $\times$ g离心1分钟后充分去除上清，再重复清洗2次，然后从步骤2b开始操作。

## 2. 脱蜡和裂解。

- 将石蜡块样品或者石蜡切片置于1.5ml离心管中，加入600µl的脱蜡剂，剧烈Vortex 30秒，以充分脱蜡。  
福尔马林固定液中的组织样品无需加脱蜡剂，直接转入步骤2b开始操作；如果石蜡样品过多，可以将脱蜡剂用量增加至1ml。
- 加入180µl样品裂解液A和20µl蛋白酶K，Vortex混匀，56°C金属浴或水浴孵育1小时或直至样品完全裂解。  
裂解过程中可多次从金属浴中取出离心管颠倒混匀以促进裂解。裂解的时间因组织不同而有所不同，通常可在1-3小时内完成。为方便起见，可以直接过夜裂解，过夜裂解对DNA抽提效果通常无负面影响。
- 将完全裂解的组织样品置于90°C孵育1小时，之后短暂离心使盖子上的蒸发液体回到管中。  
90°C孵育对解开DNA与其它分子的交联至关重要，但是必须严格控制孵育的温度和时间，否则可能产生更多的DNA碎片，因此应先将金属浴或水浴加温至90°C再放入样品进行孵育。
- 将离心后的离心管室温静止5分钟，用吸头缓慢穿过上层脱蜡剂，吸取下层的澄清液体(约180µl)至新的离心管中。
- 清除RNA(可选做)。如果希望获得不含RNA的高纯度DNA，加入2µl的RNase A (100mg/ml, DNase free) (ST577), Vortex混匀。室温放置2分钟后，进行下一步操作。  
如果残余的少量RNA对后续下游实验没有干扰，可以不进行本步实验操作，直接进入步骤2f。
- 向上述新的离心管中加入200µl样品裂解液B，Vortex混匀；再加入200µl无水乙醇，Vortex混匀。  
加入样品裂解液B后可能会产生白色沉淀，需立即Vortex混匀，但不会干扰后续实验；加入无水乙醇后也可能产生白色沉淀，必须Vortex充分混匀，后续步骤中必须把白色沉淀和溶液全部转移到纯化柱内。

## 3. 纯化DNA。

- 将步骤2f中的混合溶液加入到DNA纯化柱内。≥6000×g (约≥8000rpm)离心1分钟。倒弃废液收集管内液体。  
进行本步骤前需将纯化柱置于废液收集管上。倒弃废液后回收废液收集管。  
注：必须将步骤2f中的溶液和白色沉淀全部转移到DNA纯化柱内，否则会严重影响抽提效果！
- 向纯化柱中加入500µl洗涤液I，≥6000×g (约≥8000rpm)离心1分钟。倒弃废液收集管内液体。  
进行本步骤前需将纯化柱置于废液收集管上。倒弃废液后回收废液收集管。
- 向纯化柱中加入600µl洗涤液II，≥18,000×g (约≥12,000rpm)离心1分钟。倒弃废液收集管内液体。  
进行本步骤前需将纯化柱置于废液收集管上。倒弃废液后回收废液收集管。
- 重复步骤3c一次。
- 再≥18,000×g (约≥12,000rpm)离心1分钟，以去除残留的乙醇。  
不可把步骤3d的离心时间延长而省略本步骤，倒弃废液后再离心可以确保充分去除残留的乙醇。
- 将DNA纯化柱置于一洁净的1.5ml离心管上，加入30-100µl洗脱液。室温放置1-3分钟。≥18,000×g (约≥12,000rpm)离心1分钟。所得液体即为纯化得到的总DNA。  
洗脱液需要直接加至纯化柱管内柱面中央，使液体被纯化柱吸收。如果有必要，可以使用去离子水。使用较小体积的洗脱液可以使获得的总DNA的浓度较高，但洗脱下来的DNA量相对较少。洗脱液的pH对洗脱效率有很大影响，使用去离子水洗脱时应保证其pH值在7.0-8.5之间。如果对于获得较多量的DNA非常重要，可以在第一次洗脱后，再用同体积洗脱液重复洗脱一次。第二次洗脱可增加DNA洗脱量，但会降低洗脱DNA的浓度。经65°C预热过的洗脱液可增加DNA的洗脱量。

## 参考文献：

- Lee H, Ryu HS, Park HC, et al. Int J Mol Sci. 2022. 23(21):12923.

## 相关产品：

产品编号	产品名称	包装
D0061	哺乳动物基因组DNA抽提试剂盒	50次
D0063	基因组DNA小量抽提试剂盒(通用型, 离心柱式)	50次
D0064S	石蜡包埋组织基因组DNA抽提试剂盒(离心柱式)	50次
D0065	动物基因组DNA快速抽提试剂盒(PCR分析用)	100次/500次
D0072	BeyoRed DNA上样缓冲液(6X)	2ml
D0085	BeyoMag™磁珠法Cell-free DNA抽提试剂盒	50次/200次
D0088S	BeyoMag™基因组DNA小量抽提试剂盒(通用型, 磁珠法)	50次
D0089S	BeyoMag™石蜡包埋组织基因组DNA抽提试剂盒(磁珠法)	50次
D0091	BeyoMag™磁珠法血液基因组DNA抽提试剂盒	50次/200次/800次
FTUB306	BeyoGold™ 1.5毫升离心管(无色, Nuclease free)	500个/盒, 10盒/箱
ST478-500ml	PBS, pH7.4 (DNase, RNase & Protease free, Sterile)	500ml
ST533	Proteinase K (20mg/ml)	0.2ml/1ml/5ml
ST535	Proteinase K	100mg/500mg/2g
ST576	RNase A (10mg/ml, DNase free)	1ml
ST577	RNase A (100mg/ml, DNase free)	0.5ml