

磁珠法FFPE组织基因组DNA提取试剂盒 MagBeads FFPE Tissue DNA Extraction Kit

【目录号】FFPE-5005、FFPE-5010、FFPE-5030、FFPE-5100；

【运输条件】蛋白酶K 0~8℃运输，其它组分常温运输；

【保存条件】蛋白酶K -20℃保存，其它组分室温保存；

【保质期】1年（建议保存条件下）；

【试剂盒组成】

Kit Component 试剂盒组成	FFPE-5005 (50T)	FFPE-5010 (100T)	FFPE-5030 (300T)	FFPE-5100 (1000T)
① FFPE MagBeads 磁珠液	4mL	8mL	24mL	80mL
② FFPE Buffer ML 裂解液	25mL	50mL	150mL	500mL
③ FFPE DW Buffer 除蜡剂	15mL	30mL	90mL	300mL
④ FFPE Binding Buffer 结合液	25mL	50mL	150mL	500mL
⑤ FFPE Wash Buffer 清洗液	35mL	70mL	210mL	700mL
⑥ Proteinase K 蛋白酶 K	1.5mL	3mL	9mL	30mL
⑦ Elute Buffer 洗脱液	10mL	20mL	45mL	100mL

【注意事项】

1. 磁珠悬浮液严禁反复冻融和离心，以免磁珠受到损害，使用前务必充分混匀；
2. 使用前检查除蜡剂（室温低于18℃时易结晶）、裂解液及结合液中是否出现沉淀，如有沉淀请置于37℃水浴温热至澄清；
3. 蛋白酶K长期不使用，请置于-20℃保存，融化后4℃保存，并尽快使用；
4. 本操作指南经过反复验证，使用前请仔细阅读，并按照操作指南的建议操作。

【产品简介】

本试剂盒适用于从石蜡包埋组织切片、石蜡块、或福尔马林等固定液的组织样本中分离纯化基因组DNA。本产品采用无毒除蜡剂代替传统二甲苯进行除蜡，基因组DNA在裂解液环境中快速释放，然后经磁珠结合、清洗、洗脱步骤，得到高质量的基因组DNA产物， $OD_{A260/280}$ 在1.7~2.0之间，完整性好，可直接应用于PCR模板、杂交、STR、SNP等下游分子生物学实验。整个操作过程简单、快速且高效。

本试剂盒可在EP管中手动法操作，亦可配合英芮诚自动化核酸提取仪或其它品牌磁棒法核酸提取仪使用，实现高通量操作。

【试剂盒说明】

样本类别	样本量	说明
石蜡包埋组织切片（FFPE）	2~8片	切片厚度 5~10 μ m、面积 \leq 1cm ²
石蜡组织块（FFPE）	30mg	尽量去除石蜡
福尔马林等固定液样本	30mg	尽量切成小块

本试剂盒DNA提取结果跟组织类型、样本固定效果以及储存条件等因素密切相关。一般来讲，固定时间越久、保存时间越长的样本，基因组DNA受损程度越高。制作FFPE样本时应注意：1）组织在福尔马林中固定时间不宜过长，否则DNA易交联或断裂；也不可以太短，否则组织固定不充分，核酸易降解。一般来讲，以固定8~24h为宜；2）确保样本在石蜡包埋以前脱水完全，并尽量去除残留的福尔马林。

【自备仪器、耗材和试剂】

仪器自动版：涡旋混合仪、多功能动态金属浴（英芮诚ETP-MH96型，若无，可用静态金属浴或水浴锅代替）、2.0mL EP管、96孔方孔圆底板、80%乙醇、PBS溶液（pH值7.4）、RNase A溶液(100mg/mL，分散液10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH值8.0)、英芮诚ETP-300核酸提取仪。

手动版：涡旋混合仪、多功能动态金属浴（英芮诚ETP-MH96型，若无，可用静态金属浴或水浴锅代替）、2.0mL EP管、英芮诚16孔磁力架（p/n: CQT-0001）或者多功能磁力架（p/n: CQT-0011）、80%乙醇、PBS溶液（pH值7.4）、RNase A溶液(100mg/mL，分散液10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH值8.0)、真空干燥箱。

【仪器自动版操作步骤】

以下内容以英芮诚ETP-300型核酸提取仪为例，可同步完成32例样本的提取工作。

1. 上样准备

参照下表用量向96孔板中分别加入相应试剂：

样品位	1、7	2、8	3、9	4、10	5、11	6、12
试剂	磁珠悬浮液 80 μ L	结合液 500 μ L	清洗液 1 700 μ L	80%乙醇 700 μ L	80%乙醇 700 μ L	洗脱液 100 μ L

注：1) 每次吸取磁珠悬浮液前尽量摇晃均匀；2) 为提高效率建议使用排枪；3) 试剂加板完毕请尽快使用，以免醇挥发导致结果波动。

2. 样本裂解

2.1 FFPE组织样本

取2~8张FFPE组织切片或30mg石蜡组织块，转移至1.5mL EP管中，加入300 μ L除蜡剂，450 μ L裂解液和30 μ L蛋白酶K溶液，混匀后置于ETP-MH96型多功能动态金属浴上：①800rpm、70 $^{\circ}$ C加热裂解5min；②800rpm、60 $^{\circ}$ C加热裂解50min；③800rpm、90 $^{\circ}$ C加热裂解1h（若无多功能动态金属浴，亦可在水浴锅或者静态金属浴上70 $^{\circ}$ C加热裂解5min；60 $^{\circ}$ C加热裂解50min，需期间每隔15min颠倒混匀3次；接着90 $^{\circ}$ C加热裂解1h，需期间每隔15min颠倒混匀3次）。

注：暴露在空气中的石蜡包埋样本，最初刮取的2~3片请弃掉不用。

2.2 福尔马林等固定液样本

取30mg样本尽量切成小块，转入1.5mL EP管内，加入500 μ L PBS溶液（pH值7.4），涡旋振荡混匀，12,000rpm室温离心1min，吸弃上清液（该操作重复3次）；向EP管中加入450 μ L裂解液和30 μ L蛋白酶K溶液，混匀后置于ETP-MH96型多功能动态金属浴上：①800rpm、70 $^{\circ}$ C加热裂解5min；②800rpm、60 $^{\circ}$ C加热裂解50min；③800rpm、90 $^{\circ}$ C加热裂解1h（若无多功能动态金属浴，亦可在水浴锅或者静态金属浴上70 $^{\circ}$ C加热裂解5min；60 $^{\circ}$ C加热裂解50min，需期间每隔15min颠倒混匀3次；接着90 $^{\circ}$ C加热裂解1h，需期间每隔15min颠倒混匀3次）。

注：如需去除RNA，可加入2 μ L RNase A 溶液，室温孵育10min后，再进行下一步操作。

3. 上机提取

3.1.1 FFPE组织样本

将裂解完毕EP管，12,000rpm室温离心1min，用枪头小心刺穿液面上层蜡膜，吸取400 μ L下层水相清液至96孔板第2/8列孔位中。

注：切勿吸取到上层浑浊蜡层，否则会带入石蜡，影响DNA纯度。

3.1.2 福尔马林等固定液样本

将裂解完毕EP管，吸取400 μ L裂解液至96孔板第2/8列孔位中。

3.2 将上样完毕96孔板置于ETP-300型核酸提取仪中，插入磁棒套，打开仪器操作软件，调用并运行“石蜡样本DNA提取”程序。

“石蜡样本DNA提取”程序参数如下，如仪器参数与说明书不一致，请以说明书为准：

步骤编号	孔位	运行类型	振荡时间(s)	分离时间(s)	挥发时间(s)	振荡幅度	振荡强度	一组温度($^{\circ}$ C)	二组温度($^{\circ}$ C)	三组温度($^{\circ}$ C)	四组温度($^{\circ}$ C)
1	1	磁珠转移	2	1	0	2	弱	0	0	0	0
2	2	DNA 结合	600	1	0	4	中	0	0	0	0
3	3	清洗 1	180	1	0	5	强	0	0	0	0
4	4	清洗 2	120	1	0	5	强	0	0	0	0
5	5	清洗 2	120	2	300	5	强	0	0	0	0
6	6	洗脱	300	20	0	2	中	60	60	60	60
7	3	弃磁珠	5	0	0	5	强	0	0	0	0

4. 核酸转移

程序运行完毕，取出试剂板，将洗脱液转移至干净EP管中，做好标记，提取过程完毕。

【手动版操作步骤】

1. 样本裂解

参考【仪器自动版操作步骤】中步骤2操作。

2. 核酸与磁珠结合

参考【仪器自动法操作步骤】中步骤 3.1.1 或 3.1.2，吸取 400 μ L 裂解液至新的 EP 管中，加入 80 μ L 磁珠液和 500 μ L 结合液。涡旋振荡 5min 后静置 2min（重复两次）。

注：1) 每次吸取磁珠悬浮液前尽量摇晃均匀；2) 混匀不充分可能导致得量降低。

3. 磁性分离

将EP管置于磁力架上静置约20s至磁珠吸附完全，如EP管内盖有液体，可保持EP管在磁力架上，整体上下颠倒2~3次，使磁珠完全被磁力架吸附。保持EP管固定于磁力架上，用移液枪吸弃上清液，期间避免移液枪的Tip吸头接触到磁珠。

4. 清洗1

向EP管中加入700 μ L清洗液，将EP管从磁力架上取下，用力摇动使磁珠充分分散，高速涡旋震荡2min，参照步骤3进行磁性分离，吸弃上清液。

注：若磁珠出现团聚现象，是因为DNA含量过多引起，不影响洗脱效率及核酸得量。

5. 清洗2

使用700 μ L 80%乙醇，参照步骤4操作2次。

6. 除醇

将弃尽上清液后的EP管置于磁力架上，连同磁力架一起放入45 $^{\circ}$ C真空干燥箱中，干燥约10min至无明显乙醇气味。

注：若无真空干燥箱，亦可将EP管置于通风橱通风或电风扇吹大约10min，至磁珠干燥完全，具体时间根据气温变化可能需要适当调整，干燥至磁珠颜色变浅，无明显乙醇气味即可，过度干燥会严重影响DNA产物的洗脱效率。清洗液2清洗结束后，用无水乙醇漂洗一遍，可以提高除醇的效率。

7. 洗脱

取出EP管，加入50~100 μ L洗脱液，用移液枪吹打使磁珠与洗脱液充分混匀，将EP管置于ETP-MH96型多功能动态金属浴上，800rpm、60 $^{\circ}$ C加热洗脱8min（若无多功能动态金属浴，亦可在水浴锅或者静态金属浴上60 $^{\circ}$ C加热洗脱10min，需期间每隔3min涡旋振荡30s）。

8. 核酸转移

将EP管置于磁力架上静置约20s至磁珠吸附完全，将移液枪将洗脱液转移至另一干净EP管中，提取过程完毕。

版权声明：© 英芮诚生化科技（上海）有限公司保留本使用指南所有权利。版本：V201901.061

英芮诚生化科技（上海）有限公司

地址：上海市杨浦区国权北路 1688 号湾谷科技园 A8 座 303 室

电话：021-55809378

网址：www.bio-enriching.com

电子邮件：marketing@bio-enriching.com