

NuClean FFPE DNA Kit 新型固定组织 DNA 提取试剂盒

项目号:N665859

保存条件: Spin Columns DF 室温下可保存 2 个月, 2-8℃ 保存 1 年, 其余组分常温 (15-30℃) 保存

产品内容

Component	N665859-50T
Buffer DS	30mL
Buffer GTL	15mL
Buffer GL	15mL
Buffer GW1(concentrate)	13mL
Buffer GW2(concentrate)	15mL
Buffer TE	10mL
Proteinase K	2×1.25mL
RNase A(100mg/mL)	0.4mL
Spin Columns DF With Collection Tubes	50
Centrifuge Tubes (L-1.5mL)	50

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。

自备试剂: 无水乙醇

实验前准备及重要注意事项

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. 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。
4. 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℃ 水浴重新溶解。
5. 实验开始前将水浴锅或恒温混匀仪预热至 56℃, 离心机保持 25℃。
6. 如果下游实验需要降低低频发生的 C>T|G>A 转换 (人为突变), 将假阳性风险降至最低, 可以在 90℃ 孵育 1 小时后加入 7 μ L UNG (1U/ μ L)。

操作步骤

1. 样本处理:

1a. 石蜡包埋样本: 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 μ m 的薄片。取约 1×1cm² 的切片 (共约 4-5 片切片) 置于离心管 (自备) 中, 加入 160 μ L Buffer DS, 涡旋震荡 10 秒, 再加入 180 μ L Buffer GTL 和 20 μ L Proteinase K, 涡旋震

荡 10 秒。12000rpm, 25℃ 离心 1 分钟。

注意: 1) 如果样品表面已经暴露在空气中, 请将接触空气的 2-3 片弃掉不用。

2) DS 低于 18℃ 会凝固, 如果凝固不影响下面的实验。

1b. 福尔马林等固定液中的样本: 取约 20mg 的样本, 切成小块, 置于离心管中, 加入 500 μ L 10mM PBS (PH7.4), 涡旋振荡, 12000rpm 离心 1 分钟, 弃上清, 重复 3 次。加入 180 μ L Buffer GTL, 20 μ L Proteinase K, 涡旋震荡混匀。

2. 56℃ 孵育 1 小时, 直至样品完全溶解。90℃ 孵育 1 小时。12000rpm, 25℃ 离心 1 分钟, 用移液器沿管壁小心吸取下层水相 (约 180 μ L) 于新离心管中, 尽量避免吸入管底沉淀和上层蜡液。

注意: 1) 56℃ 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℃ 后再把样品置于 90℃

孵育。

2) 可选步骤: 加入 7 μ L UNG (1U/ μ L), 50℃, 5min, 不震荡。此步骤的目的是降低低频发生的 C>T|G>A 转换 (人为突变), 同时有效保留真实发生的突变, 从而使假阳性风险降至最低。

3. 可选步骤: 如需除去 RNA, 可将样品温度降到室温后, 加入 2 μ L 浓度为 100mg/mL 的 RNase A 溶液, 震荡混匀, 室温放置 2 分钟。

4. 加入 20 μ L Proteinase K, 65℃, 450rpm 孵育 15min。

5. 加入 200 μ L Buffer GL, 涡旋震荡混匀后加入 200 μ 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, 25℃, 12000rpm 离心 2 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 μ L Buffer GW1 (使用前检查是否已加入无水乙醇), 12000rpm 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), 12000rpm 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. 12000rpm 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 1.5mL 收集管中, 向吸附柱的中间部位悬空加入 20-100 μ L Buffer TE 或灭菌水, 室温放置 2-5 分钟, 12000rpm 离心 1 分钟, 收集 DNA 溶液, -20℃ 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, 12000rpm 离心 1 分钟。