

## HiPure FFPE DNA Kit

### 石蜡包埋组织 DNA 小提试剂盒

本产品为石蜡包埋组织和石蜡组织切片的总 DNA 提取提供了一个简单快速的解决方案。试剂盒基于硅胶柱纯化技术，提取过程中无需使用有毒的酚氯仿抽提，也无需进行耗时的醇类沉淀，整个提取过程只需 20 分钟(除消化时间)。得到的 DNA 可直接用于 PCR、Southern Blot、病毒 DNA 检测等实验。

### 产品组份

产品编号	D3126-01	D3126-02	D3126-03	D3126-04
纯化次数	20 次	50 次	250 次	1000 次
HiPure DNA Mini Columns I	20	50	250	4 x 250
2ml Collection Tubes	20	50	250	1000
Buffer DPS	20 ml	40 ml	200 ml	4 x 200ml
Buffer ATL	6 ml	15 ml	60 ml	250 ml
Buffer AL	6 ml	15 ml	60 ml	250 ml
Buffer GW1 *	6.6 ml	13 ml	66 ml	3 x 220 ml
Buffer GW2*	6 ml	20 ml	2 x 50 ml	3 x 100 ml
Proteinase K	12 mg	24 mg	120 mg	480 mg
Protease Dissolve Buffer	1.8 ml	1.8 ml	15 ml	30 ml
Buffer AE	5 ml	15 ml	60 ml	120 ml
说明书	1	1	1	1

### 保存条件

本产品室温(15~25℃)可保存 18 个月。Proteinase K 粉室温运输和保存，长期保存(>6 个月)建议放置于-20~8℃。溶解后的 Proteinase K 需保存于-20~8℃。低温下，Buffer ATL 可能会有沉淀形成，需 55℃ 水浴让沉淀完全溶解。

## 准备事项

- 55℃和90℃水浴锅
- 二甲苯或无毒脱蜡液(Deparaffinization Buffer)
- 无水乙醇
- 溶解 Proteinase K (20mg/ml): 加入适量的 Protease Dissolve Buffer 溶解 Proteinase K 至终浓度为 20mg/ml, 轻轻颠倒让蛋白酶 K 充分溶解。Proteinase K 干粉可在室温下保存一年, 但溶解的 Proteinase K 须分装保存于-20~8℃。
- Buffer GW1 使用前, 须按瓶子标签所示, 加入无水乙醇进行稀释。
- Buffer GW2 使用前, 须按瓶子标签所示, 加入无水乙醇进行稀释。

## 实验步骤

1. 用干净刀片去除多余石蜡, 把样品(<20mg)剪切成尽量小的碎片或切片, 并转移至 1.5ml 离心管中。

把石蜡样品切成 10~20 $\mu$ m 薄片, 有利于消化。若受条件限制无法切成薄片, 也可以用剪刀或刀片把样品剪切成尽量小的碎片。

2. 按以下方案 A 或方案 B 去除石蜡。

### 方案 A: 二甲苯去除石蜡(经典方案)

- A1. 加入 1ml 二甲苯至样品中, 高速涡旋 10~30 秒。
- A2. 14,000  $\times$  g 离心 2 分钟, 小心吸弃上清液, 不要吸到沉淀。
- A3. 加入 1ml 无水乙醇, 涡旋 10~30 秒, 14,000  $\times$  g 离心 2 分钟。
- A4. 彻底吸弃上清液, 不要吸到沉淀。
- A5. 打开管盖, 室温或 37℃干燥 15 分钟以彻底去除乙醇。
- A6. 按第 3 步进行操作。

### 方案 B: 无毒脱蜡液 Buffer DPS (Deparaffinization Buffer)去除石蜡

- B1. 加入 0.6ml Buffer DPS (Deparaffinization Buffer)至样品中, 剧烈涡旋 5 秒。
- B2. 短暂离心让样品浸泡到脱蜡液中, 56℃水浴 5 分钟, 剧烈涡旋 15 秒。
- B3. 14,000  $\times$  g 离心 2 分钟。
- B4. 彻底吸弃上清液, 不要吸到沉淀, 按第 3 步进行操作。

3. 加入 200 $\mu$ l Buffer ATL 和 20 $\mu$ l Proteinase K 至样品中，涡旋混匀。56 $^{\circ}$ C 温浴 1~2 小时或直到样品完全消化，其间需颠倒混匀数次。样品也可以消化过夜，过夜消化对提取结果无负面影响。
4. 90 $^{\circ}$ C 水浴 60 分钟。90 $^{\circ}$ C 处理可以去除 DNA 与蛋白质的交联，明显提高 DNA 的产量。
5. (可选)若消化液仍存在明显不消化的杂质，10,000  $\times$  g 离心 3 分钟去除杂质。转移上清液至新的离心管。若需去除 RNA，加入 5 $\mu$ l RNase A 至上清中，静置 5 分钟。
6. 加入 200 $\mu$ l Buffer AL 和 200 $\mu$ l 无水乙醇至样品中，涡旋混匀 15 秒。  
处理多个样品时，Buffer AL 和无水乙醇可按 1:1 比例预先混合。
7. 把 DNA 柱装在收集管中，转移混合液至柱子。10,000  $\times$  g 离心 30~60 秒。
8. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中，加入 500 $\mu$ l Buffer GW1(已用乙醇稀释)至柱子上，10,000  $\times$  g 离心 30~60 秒。
9. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中，加入 650 $\mu$ l Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中，10,000  $\times$  g 离心 30~60 秒。
10. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中，10,000  $\times$  g 离心空柱 3 分钟。
11. 将柱子转移至新的 1.5ml 离心管中，加入 15~50 $\mu$ l Buffer AE 至柱子的膜中央。放置 1 分钟，10,000  $\times$  g 离心 1 分钟。
12. 丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存于 2~8 $^{\circ}$ C，长期保存需放置于-20 $^{\circ}$ C或-80 $^{\circ}$ C。

## 简易方案

1. 把石蜡组织切片(1~3 片)转移至 1.5ml 离心管。加入 0.6ml Deparaffinization Buffer 至样品中，剧烈涡旋 5 秒。短暂离心让样品浸泡到脱蜡液中，56 $^{\circ}$ C 水浴 5 分钟，剧烈涡旋 15 秒。
2. 13,000  $\times$  g 离心 2 分钟让组织块沉淀到管底。
3. 加入 200 $\mu$ l Buffer ATL 和 20 $\mu$ l Proteinase K 至管底，轻轻吸打混匀 3~5 次，短暂离心让样品浸泡 ATL 中。
4. 55 $^{\circ}$ C 温浴 60 分钟，90 $^{\circ}$ C 温浴 60 分钟。
5. 13,000  $\times$  g 离心 1 分钟。转移下层裂解液至新的离心管中，按常规方案的第 6~12 进行操作。(上层为石蜡和脱蜡液形成有机相)

## 常见问题

### 1. 柱子堵塞

- **样品用量太多：**减少样品用量，石蜡组织切片不要超过 8~10 片。
- **样品消化不充分：**把组织块尽量切成小碎片或切片。延长 56℃ 温浴时间至 3~6 小时。
- **消化液存在不溶解的物质：**若样品消化后仍存在明显的颗粒，于 10,000 × g 离心 3 分钟去除未消化的物质。
- **脱蜡不充分：**重复用二甲苯或脱蜡液脱蜡，以彻底去除石蜡。

### 2. DNA 产量低

- 参考柱子堵塞部分。
- **样品消化不充分：**把组织块尽量切成小碎片或切片。延长 56℃ 温浴时间至 3~6 小时。
- **脱蜡不充分：**重复用二甲苯或脱蜡液脱蜡，以彻底去除石蜡。
- **去交联不充分：**延长 90℃ 温浴时间至 90~120 分钟。
- Buffer GW1/GW2 没有加入乙醇稀释。
- **洗脱不充分：**洗脱液需加到膜中央，增加洗脱体积或次数。
- **Proteinase K 活性下降：**重新制备 Proteinase K。分装保存 Proteinase K，避免反复冻融。

### 3. DNA 纯度不达标

- 参考柱子堵塞部分。
- **样品用量太多：**减少样品用量。

### 4. RNA 污染

- **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。