

目 录

简 介-----	2
原 理-----	2
试剂盒组成-----	3
保质期-----	3
准备工作-----	4
方案 1：石蜡包埋组织 DNA 手工单管式操作方案-----	5
方案 2：石蜡包埋组织 DNA 手工 96 孔板操作方案-----	7
方案 3：石蜡包埋组织 DNA 的移液工作站方案-----	9
常见问题回答-----	12

版本: 2020-12

简介

MagPure FFPE DNA LQ Kit B 为石蜡包埋组织样品 DNA 提取提供了一个简单快速的解决方案。试剂盒基于超顺磁性的磁性粒子纯化技术，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 60 分钟。该方法纯化的 DNA 包括基因组 DNA，线粒体 DNA，病毒 DNA(如乙肝)，或其它寄生微生物的 DNA。得到的 DNA 可直接用于 PCR，病毒 DNA 检测等实验。

原理

MagPure 纯化系统采用高结合力的超顺磁性的磁性粒子为基质，在高浓度离子化剂(如盐酸胍或异硫氰酸胍)条件下，纳米磁性粒子可通过氢键和静电吸附核酸，而蛋白质或其它杂质不被吸附而去除。吸附了核酸的纳米粒子经洗涤去除蛋白质和盐，最后可以用低盐缓冲液(如 Buffer TE)或水，洗脱出粒子上的核酸。得到的核酸纯度高，可直接用于各种下游实验。MagPure LQ 系统采用的溶液体系和纯化方式是专门为移液工作站和手工提取而设计的。

MagPure FFPE DNA LQ Kit 基于高结合力的纳米磁性粒子的纯化方式。样品在裂解液和蛋白酶的作用下裂解消化，DNA 释放到裂解液中。加入结合液和磁性粒子吸附 DNA，而蛋白质则不被吸附而去除。吸附了 DNA 的粒子经洗涤液洗涤去除蛋白质和其它杂质，再经含乙醇洗涤去除盐分，最后 DNA 被低盐缓冲液(Buffer TE)洗脱。洗脱的 DNA 可直接用于 PCR、病毒检测等实验。

该版本说明书将原来有 Buffer BXW1 的配方进行升级，以减少洗涤液对乙醇浓度敏感度。原来的 Buffer BXW1 在乙醇浓度低于 56%时，对短片段核酸有损失的风险。升级后的 Buffer BXW1 可减少短片段核酸的损失。

组 成

MagPure FFPE DNA LQ Kit B

产品编号	D6323-00B	D6323-01B	D6323-02B
纯化次数	24 次	48 次	96 次
MagBind Particles	0.6 ml	1.1 ml	2.5 ml
Deparaffinization Solution	40 ml	60 ml	100 ml
Buffer ATL	10 ml	15 ml	30 ml
Buffer AL	10 ml	15 ml	30 ml
Buffer BD*	6 ml	6 ml	15 ml
Proteinase K	12 mg	22 mg	48 mg
Protease Dissolve Buffer	1.8 ml	1.8 ml	5 ml
Buffer BXW1 *	6.6 ml	13 ml	44 ml
Buffer GW2*	10 ml	20 ml	50 ml
Elution Buffer	10 ml	15 ml	30 ml
说明书	1	1	1

保 质 期

MagPure FFPE DNA LQ Kit 除 MagBind Particles 和 Proteinase K 外,可在室温下(15-25℃)干燥保存 18 个月。长期保存时需置于 2-8℃。低温下, Buffer ATL/Buffer BL 可能会有沉淀形成,需 55℃ 水浴让沉淀完全溶解。MagBind Particles 和 Proteinase K 干粉在室温下运输。收到试剂盒后,把 Proteinase K 保存于-20℃。MagBind Particles 保存于 2-8℃。

准备工作

- 无水乙醇
- 溶解 Proteinase K (20mg/ml): 加入适量的 Protease Dissolve Buffer 至 Proteinase K 干粉中至终浓度为 20mg/ml, 轻轻颠倒让蛋白酶 K 充分溶解。Proteinase K 干粉在 2-8℃ 保存一年, 但溶解的 Proteinase K 须分装保存于-20℃。反复冻溶 Proteinase K 会影响其活性。
- Buffer BXW1 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。
- Buffer BD 使用前, 须按瓶子标签所示, 加入无水乙醇进行稀释。
- MagBind Particles 初次使用时, 必须剧烈摇晃 1 分钟让磁珠充分分散。
- Nunc U96 DeepWell Plate(Cat.No. 260251) [高通量]
- 96 孔振荡仪, 如 IKA MS3 Vortex, Eppendorf MixMate [手工高通量]
- 单管磁力架[手工单管]或 96 孔磁力架, MG96-1 [手工高通量]
- 封口膜 [高通量]

方案 1. 石蜡包埋组织 DNA 手工单管式操作

1. 用手术剪刀和镊子去除石蜡包埋组织中的多余的石蜡。用切片机切出 1~3 片 10 μ m 的切片，并转移至 1.5ml 离心管中。
2. 加入 800 μ l Deparaffinization Solution 至样品中，短暂离心让样品完全浸泡到脱蜡液中。56 $^{\circ}$ C 水浴 5 分钟，立即涡旋混匀 15~30 秒让石蜡充分溶解。
3. 13,000 \times g 离心 1~3 分钟让组织块沉淀到管底。【注：若切片用量较多或切片中石蜡较多时，这一步最好把脱蜡液吸弃，然后再按第 4 步进行操作。】
4. 加入 20 μ l Proteinase K 和 150 μ l Buffer ATL 至样品中，吸打混匀几次。若组织完全沉淀在管壁，用枪头轻轻挑动样品使之重悬。
5. 56 $^{\circ}$ C 温育 60~120 分钟（或过夜消化），90 $^{\circ}$ C 温育 60 分钟。
6. 短暂离心收集管壁上的液滴。转移下层消化液到新的离心管中。
【注：若样品不能完全消化或消化液不澄清，于 13,000 \times g 离心 3 分钟去除未消化的物质。】
7. 加入 150 μ l Buffer AL 至样品中，涡旋混匀 10 秒。
8. 加入 20 μ l MagBind Particles 和 300~400 μ l Buffer BD 至样品中。颠倒混匀 20~30 次。室温静置 5 分钟，其间颠倒混匀数次。
【调整 Buffer BD 加入量，可以去掉不同的片段。300 μ l Buffer BD 可去除 500bp 以下的片段；400 μ l Buffer BD 可去除 200bp 片段。用无水乙醇代替 Buffer BD 有利于提高短片段的回收率，加入 300~350 μ l 无水乙醇可以回收大于 100bp 的片段。】
9. 转移至磁力架上吸附 3~5 分钟。倒弃或吸弃溶液。
10. 加入 500 μ l Buffer BXW1，涡旋 15 秒重悬磁珠。转移至磁力架上吸附 1~2 分钟。倒弃或吸弃溶液。
11. 加入 500 μ l Buffer GW2，涡旋 15 秒重悬磁珠。转移至磁力架上吸附 1 分钟。倒弃或吸弃溶液。
12. 重复第 11 步一次。
13. 短暂离心，吸弃所有溶液。打开管盖，空气干燥~5 分钟。
14. 加入 15~30 μ l Elution Buffer，涡旋打散磁珠。56 $^{\circ}$ C 振荡温育 5~10 分钟。
15. 转移至磁力架上吸附 5 分钟，把 DNA 转移至新的离心管中。

方案 2. 石蜡包埋组织 DNA 手工高通量提取

该方案适合于从 96 个石蜡切片组织样品中提取 DNA。

1. 用手术剪刀和镊子去除石蜡包埋组织中的多余的石蜡。用切片机切出 1~3 片 10 μ m 的切片，转移至 96 孔板。
2. 每孔加入 600 μ l Deparaffinization Solution 至样品中，1200rpm 振荡混匀 30 秒。56 $^{\circ}$ C 水浴 6 分钟，1200rpm 振荡混匀 30 秒。
3. 静置 3 分钟，每孔加入 20 μ l Proteinase K 和 150 μ l Buffer ATL 至样品中。1200rpm 振荡混匀 30 秒。56 $^{\circ}$ C 温育 60 分钟。90 $^{\circ}$ C 温育 60 分钟。
4. 用 8 通移液枪缓慢插到 96 孔板底部，转移 150 μ l 消化液至 Nunc 96 孔深孔板中。
5. 加入 150 μ l Buffer AL 至样品中，1200rpm 振荡混匀 10 秒。
6. 加入 20 μ l MagBind Particles 和 350 μ l Buffer BD 至样品中。1,000~1,200rpm 振荡混匀 8 分钟。

【调整 Buffer BD 加入量，可以去除不同的片段。300 μ l Buffer BD 可去除 500bp 以下的片段；400 μ l Buffer BD 可去除 200bp 片段。用无水乙醇代替 Buffer BD 有利于提高短片段的回收率，加入 300~350 μ l 无水醇可以回收大于 100bp 的片段。】

7. 转移至 96 孔磁力架上吸附 10 分钟。将磁力架和 96 孔板扣在一起，反转 180 度倒弃废液，然后反扣于一叠吸水纸 1 分钟吸尽残液。【在反转倒废液时，让磁力架和 96 孔板紧扣一起不要松动，以防止磁珠的丢失，废液倒完后，反扣于吸水纸上吸尽孔口的残液，不要让溶液回流到孔中】
8. 加入 600 μ l Buffer BXW1 至孔中。1,000~1,200rpm 振荡混匀 2 分钟。
9. 转移至磁力架上吸附 5 分钟。将磁力架和 96 孔板扣在一起，反转 180 度倒弃废液，然后反扣于一叠吸水纸 1 分钟吸尽残液。
10. 加入 600 μ l Buffer GW2 至孔中。1,000~1,200rpm 振荡混匀 2 分钟。
11. 转移至磁力架上吸附 5 分钟。将磁力架和 96 孔板扣在一起，反转 180 度倒弃废液，然后反扣于一叠吸水纸 1 分钟吸尽残液。
12. 重复第 11~12 步一次。让磁力架和 96 孔板反扣于吸水纸 5 分钟彻底吸弃残液。
13. 37 $^{\circ}$ C 干燥 10 分钟。
14. 加入 30~100 μ l 预热至 70 $^{\circ}$ C 的 Elution Buffer，1,000rpm 振荡混匀 10 分钟。转移至磁力架上吸附 3 分钟，把 DNA 转移至新的 96 孔板中。

方案 3. 移液工作站流程设计

该方案适合于从石蜡切片样品中提取 DNA。由于不同的移液工作站的设置和配件都有所不同，请根据平台进行调整，以下流程是根据 Haminton 移液工作站而设计的。

1. [手工]用手术剪刀和镊子去除石埋包埋组织中的多余的石蜡。用切片机切出 1~3 片 10 μ m 的切片，转移至 96 孔板。
2. **每孔加入 600 μ l Deparaffinization Solution 至样品中，1200rpm 振荡混匀 30 秒。**
3. [手工]短暂离心收集管壁上的液滴。56 $^{\circ}$ C 水浴 5 分钟。
4. [手工]静置 3 分钟，每孔加入 20 μ l Proteinase K 和 150 μ l Buffer ATL 至样品中。1200rpm 振荡混匀 30 秒。
5. [手工]短暂离心收集管壁上的液滴。56 $^{\circ}$ C 温育 60 分钟。90 $^{\circ}$ C 温育 60 分钟。
6. 短暂离心收集管壁上的液滴。转移 96 孔板至仪器中。
7. 让移液枪缓慢插到 96 孔板底部，转移 150 μ l 消化液至 Nunc 96 孔深孔板中。
8. **加入 150 μ l Buffer AL 至样品中，1200rpm 振荡混匀 30 秒。**
9. **加入 20 μ l MagBind Particles 和 350 μ l Buffer BD 至样品中。1,000~1,200rpm 振荡混匀 5 分钟。**

【调整 Buffer BD 加入量，可以去除不同的片段。300 μ l Buffer BD 可去除 500bp 以下的片段；400 μ l Buffer BD 可去除 200bp 片段。用无水乙醇代替 Buffer BD 有利于提高短片段的回收率，加入 300~350 μ l 无水醇可以回收大于 100bp 的片段。】
10. 转移至 96 孔磁力架上吸附 10 分钟。吸弃溶液。
7. **加入 600 μ l Buffer BXW1，1,000~1,400rpm 振荡混匀 2 分钟打散磁珠。**
8. 转移至磁力架上吸附 3 分钟。吸弃溶液。
9. **加入 600 μ l Buffer GW2，1,000~1,400rpm 振荡混匀 2 分钟打散磁珠。**
10. 转移至磁力架上吸附 3 分钟。吸弃溶液。
11. **再加入 600 μ l Buffer GW2，1,000~1,400rpm 振荡混匀 2 分钟打散磁珠。**
12. 转移至磁力架上吸附 3 分钟。缓慢吸弃溶液，确保彻底吸弃残液。
13. 50 $^{\circ}$ C 干燥 10 分钟去除乙醇。
14. **加入 50 μ l Elution Buffer，60 $^{\circ}$ C 振荡（1,000rpm,）温育 3~10 分钟。**
15. 转移至磁力架上吸附 3 分钟，把 DNA 转移至新的 96 孔板中。

常见问题解答

该列表可能有利于解决提取过程所碰到的问题。Magen 的技术人员也可以随时为您提供服务，若您对试剂盒存在问题或建议，或您在分子生物学碰到问题，都请您联系我们。我们将竭尽所能为您排忧解难。

现象	原因及解决方法
DNA 纯化度	
样品消化不充分	延长 Proteinase K 消化时间，提高样品的消化效果。
样品起始用量太多	减少样品用量。正确的用量是获得理想结果的必要条件。
Proteinase K 活性下降	重新制备 Proteinase K。使用后 Proteinase K 必须立即保存于-20℃。分装保存 Proteinase K，避免反复冻融。
DNA 产量低	
洗脱效率不够	洗脱时 Buffer AE 加到膜中央。增加 Buffer AE 的洗脱体积。增加 Buffer AE 洗脱体积的次数。
Buffer BXW1 和 Buffer GW2 中乙醇没有加入或加入量不够	按说明书或瓶子标签所示，加入正确量的乙醇。
柱子没有空甩	柱子必须空甩 3 分钟以去除膜上残留的乙醇。
样品消化不充分	延长 Proteinase K 消化时间，采用液氮或玻璃匀浆器对样品进行研磨和匀浆，提高样品的消化效果。
RNA 污染	
加入 RNASE 消化	若需去除 RNA，蛋白酶消化后，可加入 2 μ l RNase A (50mg/ml)至样品中，室温静置 15 分钟消化 RNA。
下游实验结果不理想	
盐分污染	加入 Buffer GW2 后，静置 5 分钟后，再离心。