

Code No. 9782

研究用

TaKaRa

TaKaRa MiniBEST
FFPE DNA Extraction Kit

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 保存与运输	1
● 实验前的准备	1
● 操作方法	2
● 实验例	3
● 注意事项	3
● Q&A	3

● 制品说明

本试剂盒是用于福尔马林固定后石蜡包埋组织 (FFPE) 样品的基因组 DNA 小量纯化试剂盒。试剂盒采用了特别的除蜡试剂, 可以有效去除石蜡、释放组织, 利用试剂盒中的特异裂解试剂以及 Silica 膜技术, 可以快速有效地提取 DNA。试剂盒避免了二甲苯等有毒脱蜡试剂的使用。利用该试剂盒提取的 DNA 收量大, 时间短 (只需要 2 小时), 避免过夜裂解。使用本试剂盒提取得到的 FFPE 基因组 DNA 纯度好, 适用于多种下游应用, 如 PCR 和 Real-Time PCR; SNP 基因分析等。

● 制品内容 (50 次量)

本试剂盒分试剂 Part I 与 Part II 两部分。

■ Part I -20°C保存

Proteinase K (20 mg/ml)	1 ml
RNase A (10 mg/ml)	0.5 ml

Part II 室温 (15-25°C) 保存

Buffer DP	28 ml
Buffer GL ^{*1}	12 ml
Buffer GB ^{*1}	12 ml
Buffer WA ^{*1}	28 ml
Buffer WB ^{*2}	24 ml
Elution Buffer	14 ml
Spin Columns	50 支
Collection tubes	50 支

*1 含有强变性剂, 应避免与皮肤、衣物等接触。若不小心接触到眼睛或皮肤时, 请立即到医院进行处理。

*2 首次使用前, 请添加 56 ml 的 100%乙醇, 混合均匀。

【试剂盒之外所需准备试剂】

- ◆ 无水乙醇
- ◆ 灭菌水

● 保存与运输

1. 本试剂盒分两部分保存, Part I 请保存在-20°C; Part II 于室温下 (15-25°C) 保存。
2. 本试剂盒分两部分运输, Part I 请在-20°C条件下运输; Part II 于室温下 (15-25°C) 运输。

● 实验前的准备

1. 准备 80°C和 56°C水浴或加热块。
2. Buffer GL 若出现沉淀, 请于 65°C加热溶解, 待恢复至室温后使用。
3. Buffer WB 在首次使用前, 请添加 56 ml 的 100%乙醇, 混合均匀。
4. 洗脱结合于 DNA 制备膜上的基因组 DNA 时, 将 Elution Buffer 或灭菌水加热至 65°C使用将会提高基因组 DNA 的洗脱效率。

● 操作方法

操作流程见图 1，全部流程分为脱蜡、组织或细胞裂解、DNA 与膜结合、DNA 纯化等步骤，详细说明如下：

- 样品处理：
 - ◆ 石蜡块样品：用灭菌手术刀刮取约 30 mg 的组织样品，尽量去除多余的石蜡。
 - ◆ FFPE 切片：取不多于 7 张 FFPE 切片样品（厚 5–10 μm ，面积 100–250 mm^2 ）
 - ◆ 如果从固定于载玻片上的样品提取 DNA，请用灭菌手术刀从载玻片上刮取样品，同时刮掉多余的石蜡。
- 将处理好的样品装于 1.5 ml 或 2.0 ml 无菌离心管中，加入 500 μl Buffer DP，混匀后于 80°C 水浴 1 分钟，趁热涡旋振荡 10 秒，加入 180 μl Buffer GL，涡旋振荡。
- 12,000 rpm 室温离心 1 分钟，溶液形成两层（上层油相，下层水相），于下层水相加入 20 μl Proteinase K（20 mg/ml）和 10 μl RNase A（10 mg/ml），吸打混匀，注意不要破坏分层，于 56°C 水浴 1 小时。
注)请提前将水浴或加热块温度调整至 90°C 以备下一步使用。
- 将步骤 3 处理后的样品于 90°C 水浴 30 分钟，冷却至室温。
- 向步骤 4 处理后的样品中加入 200 μl Buffer GB 和 200 μl 100%乙醇，涡旋振荡 10 秒。
- 12,000 rpm 室温离心 1 分钟，溶液形成两层（上层油相，下层水相）。
- 将 Spin Column 安置于 Collection Tube 上，将步骤 6 样品的下层水相溶液移至 Spin Column 中，注意不要取到上层油相溶液，12,000 rpm 室温离心 2 分钟，弃滤液。
- 将 500 μl 的 Buffer WA 加入至 Spin Column 中，12,000 rpm 室温离心 1 分钟，弃滤液。
- 将 500 μl 的 Buffer WB 加入至 Spin Column 中，12,000 rpm 室温离心 1 分钟，弃滤液。
注)请确认 Buffer WB 中已经加入了指定体积的 100%乙醇。请沿 Spin Column 管壁四周加入 Buffer WB，这样有助于完全冲洗沾附于管壁上的盐份。
- 重复操作步骤 9。
- 将 Spin Column 安置于 Collection Tube 上，12,000 rpm 室温离心 2 分钟。
- 将 Spin Column 安置于新的 1.5 ml 的离心管上，在 Spin Column 膜的中央处加入 50–100 μl 的灭菌水或 Elution Buffer，室温静置 5 分钟。
注)将灭菌水或 Elution Buffer 加热至 65°C 使用时有利于提高洗脱效率。
- 12,000 rpm 室温离心 2 分钟洗脱 DNA。
如需获得更大收量，可将离下液重新加入到 Spin Column 膜的中央处再加入 50–100 μl 的灭菌水或 Elution Buffer，室温静置 5 分钟后，12,000 rpm 室温离心 2 分钟洗脱 DNA。
- 基因组 DNA 定量。提取得到的基因组 DNA 可通过电泳或吸光度测定以定量。

实验材料



加入 Buffer DP, 80°C 温浴
Vortex
加入 Buffer GL, Vortex



12,000 rpm, 室温, 1 min



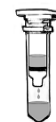
下层水相加入 Proteinase K 和
RNase A
56°C 温浴 1 hr
90°C 温浴 30 min, 冷却至室温



向裂解液中加入 Buffer GB 和无水
乙醇



12,000 rpm, 室温, 1 min



下层水相转移至 Spin Column



弃滤液



Buffer WA } 清洗 Spin Column
Buffer WB }



弃滤液



Spin Column 移至 1.5 ml Tube 上



加 Elution Buffer



基因组 DNA 溶液

图 1 操作流程

● 实验例

从人扁桃体石蜡切片中提取基因组 DNA 并进行 PCR 检测的实验例

使用本试剂盒从 2 枚人扁桃体石蜡切片（厚 10 μm ，面积 200 mm^2 ，固定于载玻片上）中提取得到基因组 DNA，按照 100 ng/rxn 添加模板，并使用 MightyAmp™ DNA Polymerase Ver.3（Takara Bio, Code No. R076A）进行 PCR 检测，扩增人类 ACTB 基因 191 bp、411 bp、606 bp 和 p53 基因 1,000 bp 片段，电泳结果见图 2。

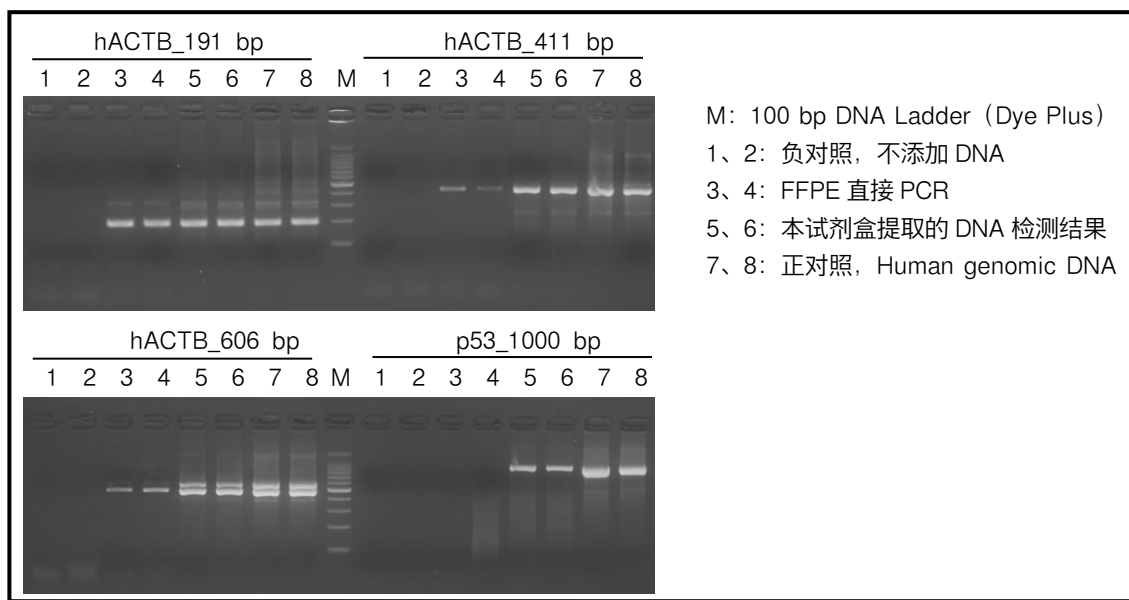


图 2 从人扁桃体石蜡切片中提取基因组 DNA 并进行 PCR 检测

● 注意事项

1. 本试剂所提取 DNA 的收量及完整性依赖于样本类型、储存时间以及固定条件。提取前请确认您的样本保存于适当的条件下。
2. 刮取样品时应尽量除去多余的石蜡，以确保不影响后续提取。
3. 部分试剂中含刺激性化合物，操作时请戴上乳胶手套和眼镜，避免沾染皮肤和眼睛等，并应尽量在通风橱中进行操作。若沾染皮肤、眼睛，要立即用大量清水冲洗，必要时寻求医疗咨询。
4. 基因组 DNA 需长期保存时，建议用 Elution Buffer 溶出。
5. 组织材料切勿超过最大起始量，且要充分裂解，否则可能影响收量，甚至会堵塞 Column。
6. 如果发生 Column 堵塞现象，可提高离心力至 15,000 rpm，并适当延长离心时间。
7. 如果组织裂解后过于粘稠，可再添加一次相同体积的 Buffer GL、Proteinase K 和 RNase A，继续裂解。

● Q&A

Q1. 基因组 DNA 的收率较低或无基因组 DNA，为什么？

A1. 基因组 DNA 收量较低时，可以从以下几个方面考虑：

- ① 实验材料量太少，适当增加材料起始量；
- ② 裂解不充分，DNA 未充分释放，建议要延长裂解时间（过夜裂解）或增加裂解液量；
- ③ 样品质量不理想，提取的组织材料中基因组 DNA 含量较少，适当增加起始组织量；
- ④ 起始组织量过大，裂解困难，按比例适当增加裂解液的加量或分成多份进行提取；

- ⑤ 洗脱时将灭菌水或 Elution Buffer 加热至 65°C 后使用将有利于提高洗脱效率；
- ⑥ 请严格按照操作方法进行操作。

Q2. 提取的基因组 DNA 无法 PCR 扩增长片段，为什么？

A2. 本试剂所提取 DNA 的完整性依赖于样本类型、储存时间以及固定条件。如果甲醛固定时间过长或样本保存时间过久 (>1 年)，可能会导致 DNA 完整性受损，如果目的片段较长时 PCR 扩增困难。

Q3. 提取的基因组 DNA 中有 RNA 污染，为什么？

- A3. ① 实验过程中没有使用 RNase A。应严格按照实验操作要求使用 RNase A。
② RNase A 可能失活。RNase A 尽可能在 -20°C 下保存，RNase A 活性比较稳定，一般不易失活。

Q4. 提取的基因组 DNA 反应性能差，为什么？

- A4. ① 提取的基因组 DNA 中盐份浓度过高。在使用 Buffer WA 和 Buffer WB 进行 DNA 制备膜的清洗时，请沿 Spin Column 的管壁四周加入，且加入 Buffer WB 后室温静置 5 分钟，有助于彻底清洗掉 Column 上残留的盐离子，这样有利于提高清洗效果。
② 洗脱液中残留乙醇，在向 Column 中加入洗脱液之前，将 Column 在室温下静置 2 分钟有助于使 Column 上残留的乙醇彻底挥发，然后再加入洗脱液洗脱。
③ 进行 DNA 洗脱时请一定在膜的中央加入洗脱液，尽量不要沾染 Spin Column 的管壁四周。

Q5. 实验材料量若超出说明书规定用量时怎么办？

A5. 本试剂盒主要用于小量基因组 DNA 的制备，当实验材料量超出说明书的要求用量时，可以加大 Buffer GL 或 Buffer GB 的用量，裂解后分到两个 Collection Tube 中进行实验操作。起始组织量最好控制在规定范围内，可以分几份进行，否则起始量过大会影响裂解和收量，如果裂解不充分会堵塞柱子，造成实验失败。

MightyAmp is a trademark of Takara Bio Inc.

注意

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

未经 Takara Bio Inc. 书面许可授权或批准，不得制造、许诺销售、销售、进口 Takara 产品，或者使用 Takara 产品所有的相关专利及相关商标。

如果您需要其他用途的许可授权，请联络我们，或访问我们网站 www.takarabio.com。

您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。

所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

技术咨询热线：

0411-87641685, 87641686

4006518761, 4006518769

TAKARA BIO INC.

URL: <https://www.takarabiomed.com.cn>

v202305Da