

核酸提取或纯化试剂说明书

【产品名称】

通用名称：核酸提取或纯化试剂

英文名称：RNA&DNA Extraction Kit

【包装规格】

50 人份/盒/100 人份/盒

【预期用途】

本试剂盒用于从福尔马林固定、石蜡包埋组织中的核酸提取、富集和纯化。处理后的产物可用于临床体外检测。

【实验原理】

本试剂盒经专门优化的裂解条件，无需过夜孵育即可从福尔马林固定、石蜡包埋组织中高效纯化基因组 DNA。蛋白酶 K 消化后加入 Buffer DES 后在较高的温度下孵育，可以部分去除甲醛导致的 DNA-蛋白质交联，提高 DNA 产量和纯度，更适用于下游实验应用。

【主要组成成分】

Components	50 人份	100 人份
Buffer DTL	10mL	20mL
Buffer DTB	12mL	24mL
Buffer DES	1.5mL	1.5mL×2
结合液 (MBD)	30mL	60mL
磁珠	1mL	1mL×2
蛋白酶 K(20mg/mL)	1mL	1mL×2
洗液 1 (wash1)	24mL	48mL
洗液 2 (wash2)	12ml	24mL
Elution Buffer	10mL	20mL

另需要准备的试剂、仪器及注意事项

- 无水乙醇 (96%-100%)、二甲苯、异丙醇
- (可选) RNase A (100mg/mL)
- 恒温混匀仪或水浴锅或其他可达到 70℃ 的加热仪器、带 2mL 转子的微型离心机、高速离心机和涡旋振荡器
- 建议使用二甲苯进行脱蜡时在通风橱或生物安全柜操作。

【储存条件及有效期】

本试剂盒除蛋白酶 K 外，可在室温 (15-25℃) 保存 12 个月，长期保存时需置于 2-8℃。低温下，Buffer DTL 和 Buffer DTB 可能会有沉淀形成，需 56℃ 水浴让沉淀完全溶解。蛋白酶 K 溶液低温运输，收到产品后应立即保存于 -20℃ 冰箱中。

【样品要求】

标准的福尔马林固定和石蜡包埋通常会导致 DNA 的片段化，为减少 DNA 的片段化，请确保：

1. 组织离体后尽可能快的在 4-10% 的福尔马林中固定。
2. 固定时间控制在 14-24h (固定时间越长 DNA 的片段化会越严重，从而影响下游实验)。
3. 包埋前应彻底脱水 (残留的福尔马林溶液会抑制蛋白酶 K 的活性)。
4. 用于 DNA 纯化的原材料应该用新切好的石蜡切片，每片厚度为 10μm。每个样本量不超过 4 片，每片厚度不超过 10μm，每片的表面积不超过 250mm²。

5.如果没有原材料的信息,建议预处理时每个样本量不超过2片,后续的实验样本量不超过4片/样本量。

【实验准备】

- 将所有的试剂平衡到室温 (15-25°C).
- 使用前按照下表的用量,使用**无水乙醇**稀释洗液1和洗液2。

洗液 1	
50 人份	加入 16mL 无水乙醇
100 人份	加入 32mL 无水乙醇

洗液 2	
50 人份	加入 28mL 无水乙醇
100 人份	加入 56mL 无水乙醇

- 将恒温混匀仪或水浴锅设置到 56°C,步骤 11 中将用于孵育。
- Buffer DTL 和 DTB 中如有白色沉淀产生,可在 56°C 加热并温和的混匀至溶解。
-

【实验步骤】

1. 用手术刀修剪多余的石蜡块

2. 切不超过 4 片 5-10 μ m 厚的样本。

注意: 如果样本的表面已暴露在空气中,丢弃前面的 2-3 片,推荐使用 2 片 10 μ m。

3. 立刻将切好片的样本放在 1.5 或 2ml 的离心管中(自备),加入 1ml 二甲苯,盖上盖子,剧烈涡旋震荡 10s。

4. 室温下 (15-25°C), 14000rpm 离心 2min。

5. 小心的用移液器吸头移去上清,注意不要吸走沉淀。

6. 加入 1mL 乙醇 (96-100%) 到沉淀中,涡旋混匀。

注意: 乙醇可以置换出样本中残留的二甲苯。

7. 室温下 (15-25°C), 14000rpm 离心 2min。

8. 小心的用移液器吸头移去上清,注意不要吸走沉淀。尽可能的吸干残留的乙醇,打开盖子在室温或 37°C 下烘干或直至残留的乙醇挥发干。

9. 向离心管中加入 180 μ L Buffer DTL 重悬,加入 20 μ L 蛋白酶 K 涡旋混匀。

10. 56°C 孵育 1h(或直至样本裂解完全)。短暂离心,离心管盖上的液体甩下,加入 25 μ L Buffer DES。

11. 70°C 孵育 1h。

注意: 加入 Buffer DES 70°C 孵育可以部分逆转蛋白质与核酸的交联。更长时间或更高温度的孵育会导致 DNA 片段化更严重。

如果只有一个加热仪器,56°C 孵育后可将样本放在室温,直到加热仪器达到 70°C。

12. 短暂离心,将离心管盖上的液体甩下。

注意: 如果需要无 RNA 的核酸,可将样本冷却至室温,加入 2 μ L RNAase A(100mg/ml),室温孵育 2min,然后再进行步骤。

13. 加入 200 μ L Buffer DTB,剧烈涡旋混匀。然后加入 400 μ L 结合液 (MBD)、20 μ L 磁珠,剧烈涡旋混匀,静止放置 1min,磁吸 3min,移弃上清。

注意: 样本和 Buffer DTB 以及异丙醇必须迅速剧烈的涡旋或吹打混匀,形成均匀的混合液。当处理多个样本时可以预先将 Buffer DTB 和结合液 (MBD) 混合然后一次加入以节约时间。

14. 将离心管小心从磁力架上取下,加入 600 μ L 洗液 1 (wash1) 使用前请检查是否已加入指定量的无水乙醇,涡旋混匀 1min。放置磁力架上磁吸 60 sec,待磁珠完全吸附时小心移去液体。

15. 将离心管小心从磁力架上取下,加入 600 μ L 洗液 2 (wash2) 使用前请检查是否已加入指定量的无水乙醇,放置磁力架上磁吸 60 sec,待磁珠完全吸附时小心移去液体。

16. 离心管放置磁力架上,室温晾干 1-2 min。

17. 将离心管从磁力架上取下,加入 80 μ L Elution Buffer,涡旋混匀,65°C 孵育 2-3 min。

注意: 若将 Elution Buffer 65°C 预热或加入 Elution Buffer 后在室温孵育 5min 再进行离心可以提高 DNA 的产量。

18. 将离心管放置于磁力架上 90 sec,待磁珠完全吸附时小心转移核酸溶液至新的无 RNase、DNase 离心管

中，并保存-20℃或进入下一步实验。

【检验方法的局限性】

提取所得到的核酸不推荐使用琼脂糖凝胶电泳进行提取核酸片段大小的检测，甲醛固定后的样本，核酸与蛋白高度的交联，迫使核酸降解，得到的片段成为弥散的条带。

【注意事项】请务必在使用前阅读此注意事项

1. 洗液 1、2 中含有易挥发成份，保存时确保瓶盖旋紧。
2. 本试剂盒试剂含有胍盐成分，其具有腐蚀性和刺激性，如体表不慎接触到该试剂，立即用大量清水冲洗；若情况严重需就医。
3. 不同批号的试剂请勿混用，于有效期内使用试剂盒。
4. 实验严格按照核酸提取操作，使用 DNase-free、RNase-free 的物品，避免 DNase、RNase 污染。
5. 实验操作人员应接受过分子生物学方法检测的专业培训或具备相关的实验操作资格。实验室应具备合理的生物安全防护设施及防护程序。

【参考文献】

盖宝东等，提高石蜡包埋组织中提取 DNA 质量的实验研究[J].吉林大学学报（医学版），2003，1，115-118.

周敏等，石蜡组织 DNA 提取方法的比较[J]. 医学研究生学报 2003,(10),16:726-729.

马丽丽等，石蜡包埋组织提取 DNA 不同条件下的 PCR 扩增[J].中国组织工程研究 2012,16,11:1973-1976.

朱萌等，从福尔马林固定-石蜡包埋样本中抽提 RNA 的方法与可行性[J].临床与实验病理学杂志 2013,29（3）:301-304.

田子强等，普通甲醛固定石蜡包埋组织 DNA 提取方法的探讨[J].癌症，2004，23（3）：342-345.

Banerjee SK, Makdisi WF, Weston AP, et al. Microwave-based DNA extraction from paraffin-embedded tissue for PCR amplification [J]. Biotechniques. 1995, 18(5):768-770, 772-773.

李丹等，石蜡组织存放时间对提取 DNA 质量的影响[J].河南大学学报（医学版），2014，33（1）：9-13.

【基本信息】

企业名称：广州艾基生物技术有限公司

住所：广州市海珠区国际生物岛螺旋三路三期四栋 505

邮政编码：510530 电话号码：020-89115575 传真号码：020-82514208

电子邮箱：market@igebio.com 公司网址：www.igebio.com

售后服务单位名称：广州艾基生物技术有限公司

服务热线：020-89115575 传真号码：020-89115575

电子邮箱：market@igebio.com

生产地址：广州市海珠区国际生物岛螺旋三路三期四栋 505

【生产许可证编号/生产备案凭证编号】粤穗械备 20150193

【说明书核准日期及修改日期】2016 年 8 月 6 版