

**FFPE sample Total Genomic DNA Extraction Kit****石蜡标本基因组快速提取试剂盒****说明书****【产品简介】**

福尔马林固定，石蜡包被（FFPE）组织样品是人们诊断和预测疾病的主要组织来源，也同时用作分子及遗传研究。但是和新鲜组织样品不同，石蜡包埋样品中大多数 DNA 和 RNA 分子在固定时以及长期储存的过程中，降解为小片段，更进一步的是福尔马林诱导的核酸和蛋白交联限制了 DNA 或者 RNA 从被固定的细胞中释放，然而随着技术的发展，现在已经能够从石蜡包埋样品中提取到高质量的 DNA 和 RNA。

石蜡包埋样品基因组抽提试剂采用独特的配方，能高效的进行石蜡样品脱蜡前处理，裂解组织及其细胞，甚至是用于富含脂肪的组织，同时结合特制的纯化柱，能最大限度的保持 DNA 的完整性、高得率以及纯度。

【试剂盒组成】

试剂盒组成	LG-0111A (50 次)	LG-0111B (100 次)
RNA 酶 A	250 μ l	500 μ l
蛋白酶 K	10mg	20mg
裂解液 SE	18ml	36ml
裂解液 PDB	18ml	36ml
漂洗液 WB1	20ml	40ml
漂洗液 WB2	12ml	24ml
洗脱液 EB	2 \times 2ml	4 \times 2ml
离心纯化柱	50 个	100 个
说明书	1 份	1 份

注意：使用前请在蛋白酶 K 管中加入适量灭菌双蒸水至 20mg/ml，漂洗液 WB1 和 WB2 中加入适量无水乙醇。

【试剂运输及储存条件】

试剂运输可在常温环境下进行。储存时，蛋白酶K干粉于4℃保存，RNA酶A和稀释后的蛋白酶K溶液于-20℃保存，试剂盒其余组分室温保存。

【操作步骤】

- 切下 5 片厚度约为 10 μ m（重约 10mg）的组织块，尽量切去石蜡部分，置于 1.5ml 的离心管中。
注意：该实验流程只适用于在 10mg 左右的组织样品中抽提总 RNA，样品不宜过多，否则消化组织是非常困难的。加入 1ml 二甲苯，并振荡 30s，然后室温放置 5 分钟。振荡离心管 20s，然后室温，14000 x g 离心 3min。用移液器移去上清，室温干燥组织沉淀 15min。之后操作见第 2 步。
- 往裂解物中依次加入 280 μ l 裂解液 PDB, 5 μ l RNA 酶 A 和 10 μ l 蛋白酶 K (20mg/ml) 溶液, 用移液器吸打混匀, 于 55℃ 温水浴消化 30min。
注意：请不要漩涡震荡
- 往裂解物中加入 200 μ l 三氯甲烷，颠倒或摇动混匀，室温静置 1min，11,000xg 室温离心 10min。
注意：请不要漩涡震荡
- 小心吸取上清至一新的 1.5ml 离心管中，往裂解物中加入 0.6 倍上清体积的预冷异丙醇，轻柔颠倒混匀。
- 立即吸取 700 μ l 样品以及有可能形成的沉淀，加入带有 2ml 收集管的离心纯化柱。轻盖盖子，11,000xg，室温离心 1min，收集流穿液在另一新的 1.5ml 离心管中。



7. 将剩余的样品转移至离心柱, 重复第6步。
8. 往离心柱中加入700 μ l漂洗液WB1, 轻盖盖子, 室温静置1min, 11,000xg, 室温离心1min, 弃尽废液。
注意: 第一次使用前请确认是否已经往漂洗液WB1中加入适量无水乙醇。
9. 往离心柱中加入500 μ l漂洗液WB2, 11,000xg, 室温离心1min, 弃尽废液。
注意: 第一次使用前请确认是否已经往漂洗液WB2中加入适量无水乙醇。
10. 往离心柱中加入500 μ l漂洗液WB2, 11,000xg, 室温离心1min, 弃尽废液。
11. 11,000xg离心空柱1min干燥硅胶膜。
12. 将离心柱转移至新的无核酸酶的1.5ml离心管中, 往硅胶膜中央滴加50 μ l洗脱液EB, 轻盖管盖, 室温静置2-3min, 11,000xg离心1min洗脱基因组DNA。
13. 把洗脱液滴加回硅胶膜重复第12步洗脱。
14. 如需后续操作, 请始终将溶解的DNA至于冰上, 保存请置于-80 $^{\circ}$ C。

【DNA定量】

实例: 用常规比色皿测量RNA浓度。

DNA样品总体积: 50 μ l

稀释因子, 1:100 (10 μ l DNA样品+990 μ l无核酸酶高压灭菌水)

A260读值: 0.20 (在1ml比色皿中测量)

因此, DNA样品浓度= $50 \times A260 \times \text{稀释因子} = 50 \times 0.20 \times 100 = 1000 \mu\text{g/ml}$

DNA样品的得率= $1000 \times 0.05 = 50 \mu\text{g}$

实例: 用超微量比色皿测量DNA浓度。

DNA样品总体积: 50 μ l

稀释因子, 1:100 (1 μ l DNA样品+99 μ l无核酸酶高压灭菌水)

A260读值: 0.20 (在超微量比色皿中测量)

因此, DNA样品浓度= $50 \times A260 \times \text{稀释因子} = 50 \times 0.20 \times 100 = 1000 \mu\text{g/ml}$

DNA样品的得率= $1000 \times 0.05 = 50 \mu\text{g}$

【注意事项】

1. 操作时请使用一次性手套和口罩。
2. 第一次使用前请确认是否已经往漂洗液WB1和WB2中加入适量乙醇。
3. 第一次使用前请确认是否已经往蛋白酶K管中加入适量灭菌双蒸水。
4. 洗脱液EB如预先在65 $^{\circ}$ C温水浴, 会提高基因组DNA的回收率。

注: 本产品仅供科研使用。请勿用于医药、临床治疗、食品及化妆品等用途。