

# 操作手册

## FFPE 样品 DNA 提取试剂盒（磁珠法）

Catalog No. TD367-M (1X96 孔板)

### Highlights

- 可从 FFPE，固体组织，头发等复杂来源的样品中提取到高纯度的基因组 DNA。
- 获得的基因组 DNA 产量高、纯度好，可以直接用于酶切、PCR、高通量测序等敏感分子生物学实验。

Ver.1.1.7

## 产品组成:

试剂盒组成	保存	96 次
蛋白酶 K 及保存液	-20℃	20mg x2
脱蜡液	室温	20 ml
固体组织消化液（蓝色）	室温	6ml x2
磁珠结合液	室温	150 ml
基因组 DNA 洗涤液 1	室温	50 ml
基因组 DNA 洗涤液 2	室温	200 ml
基因组 DNA 洗脱液	室温	16 ml
磁珠	室温	6 ml

**Note** –售出后一年内产品质量是可以保证。试剂已经过大量的常规检测来保证其可操作性。此产品仅供研究并且需要由专业人员来使用。试剂盒中的部分试剂是有刺激性的。请带好手套和防护眼镜。

环境温度低时基因组固体组织消化液或者基因组 DNA 洗涤液 1 可能出现析出和沉淀，可以在 37℃水浴几分钟帮助重新溶解使用。

## 特性:

- **样品种类:** FFPE，固体组织，毛发，保存在保护剂里的样品等。获得的基因组 DNA 产量高、纯度好，可以直接应用 PCR，高通量测序等各种分子生物学实验。
- **基因组 DNA 大小:** 一般可回收到大于 50 kb 的基因组 DNA。如果样品中存在线粒体 DNA，病毒 DNA 等也会一起提取到。
- **DNA 纯度:** 获得的基因组 DNA 产量高、纯度好，可以直接用 PCR 等各种分子生物学实验。

一般情况  $Abs_{260/230} \geq 1.8$ 。

- **基因组 DNA 产量:** 每 50 $\mu$ l 磁珠最多可结合 10 $\mu$ g 基因组 DNA。

### 样品来源:

#### 固体样品:

可从 $\leq$ 25mg 尾巴, 耳朵, 器官活检(脑, 肝, 心脏, 肾, 肌肉, 胃, 膀胱, 肠)等样品里提取到总 DNA。

- 可采用 55 $^{\circ}$ C 过夜蛋白酶 K 消化步骤。
- 针对头发, 毛发等组织。参看附录。

#### FFPE 样品:

- 先尽可能多的从组织上去除石蜡, 然后将样品放置到一个 1.5ml 离心管内。
- 最多处理 25mg 石蜡块中的组织或者最多 4 个组织切片(总表面积 20mm<sup>2</sup>) 建议处理 1-2 个切片
- 添加 400 $\mu$ l 的脱蜡液到样品中。在 55 $^{\circ}$ C 下孵育 1 分钟, 短暂涡旋。
- 去除脱蜡液然后处理下一个切片。

### 试剂制备:

在操作之前, 需添加 1060 $\mu$ l 蛋白酶 K 保存液到每管蛋白酶 K (20mg) 中。蛋白酶 K 溶液的浓度为 20mg/ml, 混匀后, 需要放到 -20 $^{\circ}$ C 长期保存。

### 提取步骤:

## 固体组织

1. 添加 $\leq 25\text{mg}$ 的组织到一个2ml的96孔板里，并且添加：

95 $\mu\text{l}$  水

95 $\mu\text{l}$  固体组织消化液II（蓝色）

10 $\mu\text{l}$  蛋白酶K

2. 混匀或者涡旋振荡10-15秒然后在55 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育1-3个小时或者直到组织溶解，进行下一步之前混匀。

注意：如果消化后的样品中仍然有不溶解的组织，需要在 $\geq 3,000 \times g$ 的离心力下离心4分钟，然后将上清转移到一个干净的96孔板中进行下面的操作。

3. 添加600 $\mu\text{l}$ 的磁珠结合液到上清中。用枪头混匀混匀振荡10分钟。

4. 添加240 $\mu\text{l}$ 的异丙醇。

纯化环节：

以下步骤的混匀步骤即可以用移液器上下吹打也可以使用专业的震动摇床（rpm1200）。

5. 将混匀的磁珠添加 50 $\mu\text{l}$  到 96 孔的样品孔中。混匀 10 分钟。

6. 将 96 孔板转移到一个磁力架上，直到磁珠沉淀下来，吸弃上清液。将 96 孔板从磁力架上移走。

7. 添加 400 $\mu\text{l}$  的基因组 DNA 洗涤液 1 到 96 孔样品孔中混匀 5 分钟。

8. 将 96 孔板转移到一个磁力架上，直到磁珠沉淀下来，吸弃上清液。将 96 孔板从磁力架上移走。

9. 添加 900 $\mu\text{l}$  的基因组 DNA 洗涤液 2 到 96 孔样品孔中混匀 5 分钟。

10. 将 96 孔板转移到一个磁力架上，直到磁珠沉淀下来，吸弃上清液。将 96 孔板从磁力架上移走。

11. 添加 900 $\mu\text{l}$  的基因组 DNA 洗涤液 2 到 96 孔样品孔中混匀 5 分钟。

12. 将 96 孔板转移到一个磁力架上，直到磁珠沉淀下来，吸弃上清液。将 96 孔板从磁力架上移走。

13. 将 96 孔板移到一个加热模块上（55 $^{\circ}\text{C}$ ）直到磁珠变干（大概 10 分钟），如果没有加热模块，可以在室温下放置 20-30 分钟自然晾干。

14. 添加 100 $\mu\text{l}$  的基因组 DNA 洗脱液到每个孔中并且重悬磁珠，混匀磁珠 10 分钟，然后将 96 孔板移到一个磁力架上，放置 2-3 分钟直到磁珠完全沉淀下来。

15. 将上清（包含基因组 DNA）转到一个干净的 96 孔洗脱板内。

自动化设置：

1. 添加60ml磁珠结合液到一个96孔试剂槽内。
2. 添加50ml基因组DNA洗涤液1到一个96孔试剂槽内。
3. 添加200ml基因组DNA洗涤液2到一个96孔试剂槽内。
4. 添加16ml基因组DNA洗脱液到一个96孔试剂槽内。
5. 涡旋振荡磁珠30秒，然后添加6ml磁珠到一个96孔试剂槽内。

自动化操作步骤：

1. 在实验开始前先放置以下组件到自动化仪器合适的区域
  - a. 放置6板300 $\mu$ l标准吸头到自动化仪器内
  - b. 放置5板1000 $\mu$ l大体积吸头到自动化仪器内
  - c. 放置1板50 $\mu$ l小体积吸头到自动化仪器内
  - d. 放置1个磁力架和1个96孔PCR板到自动化仪器内
  - e. 放置含有样品的96孔板（block）到自动化仪器内（裂解步骤参见前面的操作步骤）
  - f. 放置2个96孔空的试剂槽来装废弃物。
2. 根据前面裂解的操作步骤来消化样品。
3. 从对应的试剂槽中吸取 600 $\mu$ l 的磁珠结合液到 96 孔板（block）中含有消化的样品孔内。
4. 上下移液混匀（400 $\mu$ l 15 个循环）
5. 移液混匀磁珠（50 $\mu$ l 10 个循环），吸取 50 $\mu$ l 的磁珠。
6. 将 50 $\mu$ l 的磁珠移置 96 孔板（block）孔内。
7. 用 1000 $\mu$ l 的吸头移液混匀裂解物（600 $\mu$ l 25 个循环）
8. 将 96 孔板（block）移到一个震荡设备上，RPM1200 下震荡 3 分钟。

9. 将 96 孔板 (block) 移到 96 孔磁力架上, 放置 2 分钟。
10. 使用慢速移液模式 (流速 $\leq 50\mu\text{l/s}$ ) 移除 840 $\mu\text{l}$  的上清。
11. 将 96 孔板 (block) 从磁力架上移到一个普通的 96 孔板架子上。
12. 吸取 400 $\mu\text{l}$  基因组 DNA 洗涤液 1。
13. 将 400 $\mu\text{l}$  基因组 DNA 洗涤液 1 加到 96 孔板 (block) 孔内, 移液混匀 (200 $\mu\text{l}$  25 个循环)
14. 将 96 孔板 (block) 移到一个震荡设备上, RPM1200 下震荡 2 分钟。
15. 将 96 孔板 (block) 移到 96 孔磁力架上, 放置 2 分钟。
16. 使用慢速移液模式 (流速 $\leq 50\mu\text{l/s}$ ) 移除 400 $\mu\text{l}$  的上清。
17. 将 96 孔板 (block) 从磁力架上移到一个普通的 96 孔板架子上。
18. 吸取 900 $\mu\text{l}$  基因组 DNA 洗涤液 2。
19. 将 900 $\mu\text{l}$  基因组 DNA 洗涤液 2 加到 96 孔板 (block) 孔内, 移液混匀 (400 $\mu\text{l}$  25 个循环)
20. 将 96 孔板 (block) 移到一个震荡设备上, RPM1200 下震荡 2 分钟。
21. 将 96 孔板 (block) 移到 96 孔磁力架上, 放置 2 分钟。
22. 使用慢速移液模式 (流速 $\leq 50\mu\text{l/s}$ ) 移除 900 $\mu\text{l}$  的上清。
23. 将 96 孔板 (block) 从磁力架上移到一个普通的 96 孔板架子上。
24. 吸取 900 $\mu\text{l}$  基因组 DNA 洗涤液 2。
25. 将 900 $\mu\text{l}$  基因组 DNA 洗涤液 2 加到 96 孔板 (block) 孔内, 移液混匀 (400 $\mu\text{l}$  25 个循环)
26. 将 96 孔板 (block) 移到一个震荡设备上, RPM1200 下震荡 2 分钟。
27. 将 96 孔板 (block) 移到 96 孔磁力架上, 放置 2 分钟。
28. 使用慢速移液模式 (流速 $\leq 50\mu\text{l/s}$ ) 移除 900 $\mu\text{l}$  的上清。
29. 将 96 孔板移到一个加热模块上 (55 $^{\circ}\text{C}$ ) 直到磁珠变干 (大概 10 分钟), 如果没有加热模块, 可以在室温下放置 20-30 分钟自然晾干。
30. 吸取 100 $\mu\text{l}$  的基因组 DNA 洗脱液。
31. 添加 100 $\mu\text{l}$  的基因组 DNA 洗脱液到每个孔中并且重悬磁珠, 混匀磁珠 10 分钟, 然后将 96 孔板移到一个磁力架上, 放置 2-3 分钟直到磁珠完全沉淀下来。
32. 将 96 孔板 (block) 移到一个震荡设备上, RPM 800 下震荡 3 分钟。
33. 将 96 孔板 (block) 移到 96 孔磁力架上, 放置 2 分钟。
34. 从 96 孔板 (block) 的孔中吸取 90 $\mu\text{l}$  的基因组 DNA 洗脱液。

35. 将 90 $\mu$ l 的基因组 DNA 洗脱液（含有洗脱下来的基因组 DNA）移到 96 孔洗脱板中。

## 附录A：

### 头发，毛发等相关样品

1. 需要用到新鲜制备的 DTT(未提供)进行溶液的配制，提取 $\leq 5$ mg 的样品配置比例如下：

H <sub>2</sub> O	40 $\mu$ l
固体组织消化液（蓝色）	45 $\mu$ l
DTT(1M)	5 $\mu$ l
蛋白酶K	10 $\mu$ l

2. 混匀或者涡旋 10-15 秒并在 55 $^{\circ}$ C 下孵育 1-3 小时。

注意：55 $^{\circ}$ C 下过夜操作也是可以的，并且可以增强消化的效果和 DNA 的回收量。

3. 添加300 $\mu$ l的基因组DNA结合液到消化的样品中，混匀或者涡旋振荡10-15秒。在 $\geq 12,000 \times g$ 离心力下离心1分钟沉淀不溶的物质。

4. 从纯化操作步骤的第4步开始进行接下来的操作。

## 附录B：

### 保存在保存卡（纸）上的样品

将保存在 Guthrie, FTA 或其他类似的样品保存卡（纸）上的样品通过合适的穿孔器打孔，将裁切的介质添加到公司的裂解管中（需额外购买），并且添加裂解液（需额外购买），简单涡旋匀浆后进行下述操作。

1. 添加保存卡（纸）到裂解管中，添加 400 $\mu$ l 裂解液。

2. 拧紧盖子放到合适的振荡器中最大速度下震荡。

3. 在 $\geq 12,000 \times g$ 离心力下离心裂解管 1 分钟。

4. 针对裂解管里的裂解物添加以下混合物：

固体组织消化液（蓝色）	360 $\mu$ l
蛋白酶K	40 $\mu$ l

5. 混匀并在 55 $^{\circ}$ C 下孵育 10-15 分钟。

6. 在 $\geq 10,000 \times g$ 离心力下离心裂解管 1 分钟。将 400 $\mu$ l 上清移至一个干净的离心管里。

7. 添加1200 $\mu$ l的磁珠结合液到离心管内混匀。
8. 从纯化操作步骤的第4步开始进行接下来的操作。