

## FFPE DNA Extraction Mini Kit

### 石蜡 DNA 小提试剂盒

本产品适合于从石蜡切片或包埋组织样品中提取总 DNA。试剂盒基于硅胶柱纯化技术，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，得到的 DNA 可直接用于 PCR, Southern Blot, 病毒 DNA 检测等实验。

### 产品组份

| 产品编号                          | DNF323-01   | DNF323-02 | DNF323-03 |
|-------------------------------|-------------|-----------|-----------|
| 纯化次数                          | 10 次        | 50 次      | 250 次     |
| DNA Extraction Mini Columns I | 10          | 50        | 250       |
| 2ml Collection Tubes          | 10          | 50        | 250       |
| Buffer DF                     | 6 ml        | 30 ml     | 150 ml    |
| Buffer TL                     | 3 ml        | 15 ml     | 70 ml     |
| Buffer MBL                    | 3 ml        | 15 ml     | 70 ml     |
| Buffer W1A                    | 4.4 ml      | 13 ml     | 66 ml     |
| Buffer W2A                    | 5 ml        | 20 ml     | 2 x 30 ml |
| Proteinase K                  | 220 $\mu$ l | 1.1 ml    | 5.5 ml    |
| Buffer EB                     | 3 ml        | 10 ml     | 60 ml     |

### 保存条件

本产品可在室温(15~25℃)保存 12 个月，长期保存时需置于 2-8℃。低温下，Buffer TL 可能会有沉淀形成，需 55℃ 水浴让沉淀完全溶解。

## 准备事项

- 水浴锅
- Buffer W1A 使用前，须按瓶子标签所示，加入无水乙醇进行稀释。
- Buffer W2A 使用前，须按瓶子标签所示，加入无水乙醇进行稀释。

## 实验步骤

1. 用手术剪刀和镊子去除石埋包埋组织中的多余的石蜡。
2. 用切片机制出 1~3 片 10 $\mu$ m 的切片，并转移至 1.5ml 离心管中。加入 500 $\mu$ l Buffer DF 至样品中，涡旋混匀 15 秒。
3. 短暂离心收集管壁上的液滴。56 $^{\circ}$ C 水浴 3 分钟。
4. 加入 20 $\mu$ l Proteinase K 和 200 $\mu$ l Buffer TL 至样品中。涡旋混匀 15 秒。
5. 短暂离心收集管壁上的液滴。56 $^{\circ}$ C 温育 1~2 小时。90 $^{\circ}$ C 温育 30 分钟。  
若需要获得更为完整的 DNA，可在 56 $^{\circ}$ C 消化过夜，无需 90 $^{\circ}$ C 处理。
6. 10,000 x g 离心 3 分钟，转移 200 $\mu$ l 下层消化液至新的离心管，避免吸入未消化的沉淀。

上层液体为脱蜡液，该步骤须转移下层消化液至新的离心管中

7. 加入 200 $\mu$ l Buffer MBL 至消化液中，涡旋混匀 15 秒，55 $^{\circ}$ C 温育 5 分钟。

## 过柱纯化

1. 加入 200 $\mu$ l 无水乙醇至消化液中，涡旋混匀 15 秒。
2. 把 DNA Extraction Mini Columns I 装在 2ml 收集管中。转移获得的混合液至柱子中。13,000 x g 离心 1 分钟。  
若柱子出现堵塞，14,000 x g 离心 3~5 分钟。若混合液超过 750 $\mu$ l，分次过柱。
3. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 500 $\mu$ l Buffer W1A 至柱子中。13,000 x g 离心 10 秒。
4. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 600 $\mu$ l Buffer W2A 至柱子中。13,000 x g 离心 10 秒。
5. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 600 $\mu$ l Buffer W2A 至柱子中。13,000 x g 离心 10 秒。

6. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。13,000 × g 离心 2 分钟。

该步骤去除 DNA 柱中残留的乙醇，乙醇残留会影响后续的酶促反应。当洗脱体积低于 50μl 时，该步骤结束后应打开 DNA 柱盖子于室温空气干燥 10 分钟后再进行洗脱，避免乙醇残留对酶促反应的影响。

7. 将柱子装在新的 1.5ml 离心管中。加入 30~100μl 预热至 65°C 的 Buffer EB 至柱子的膜中央。放置 3 分钟。13,000 × g 离心 1 分钟。

柱子最小的洗脱体积是 30μl，若对产量要求较高，推荐进行第二次洗脱，将洗脱液重新加至柱子膜中央，室温静置 3 分钟，13,000 × g 离心 1 分钟。

8. 丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存 2-8°C，长期保存需放置于-20°C。

## 常见问题

### 1. 柱子堵塞

- **样品用量太多：**减少样品量，切片量不要超过 5 片。
- **样品裂解不充分：**样品与 Buffer MBL 混匀不充分。重新提取，加入 Buffer MBL 后先颠倒混匀 3~5 次，然后以最高速度涡旋让样品与 Buffer MBL 充分混匀。
- **消化液存在不溶解的物质：**若样品消化后仍存在明显的颗粒，于 13,000 x g 离心 3 分钟去除未消化的物质。

### 2. DNA 产量低

- 参考柱子堵塞部分。
- **样品消化不充分：**延长消化时间让样品充分消化。
- Buffer W1A/W2A 没有加入乙醇稀释。
- 加入乙醇后有沉淀析出时，用移液枪吸打几次打散沉淀有利于提高产量。
- **洗脱不充分：**洗脱液需加到膜中央，增加洗脱体积或次数。