

Just-a-Tube™ FFPE 组织标本 DNA 提纯试剂盒

室温保存, 蛋白酶 K 保存在 4 °C

试剂盒组成及保存

Just-a-Tube™ FFPE 组织标本 DNA 提纯试剂盒组成如下表所示。所有的组分除了蛋白酶 K 需要保存在 4 °C 之外, 其余组分室温保存即可。可进行 50 或者 250 次 FFPE 组织标本 DNA 的提纯。

Product Cat. #	FD-175-M	FD-175-L
Purification Scale	50 次	250 次
Binding Tube (BT3)	50 个	250 个
DNA Heating Buffer (DH1)	16.5 ml	82.5 ml
Binding Buffer (KB5)	5.5 ml	27.5 ml
Washing Buffer I (WB1)	5.5 ml	27.5 ml
Washing Buffer II (WB2)	18.0 ml	90.0 ml
Elution Buffer (EB2)	5.5 ml	27.5 ml
Proteinase K (PK2) (20 mg/ml)	0.85 ml	1.42 ml × 3

产品介绍

Just-a-Tube™ FFPE 组织标本 DNA 提纯试剂盒可简单, 迅速地从保存多年的福尔马林固定石蜡包埋 (Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded, FFPE) 组织标本中分离高质量的 gDNA 和病毒 DNA。DNA 样品的纯化仅在一个小管中进行。此过程不需要离心柱、二氧化硅膜、过滤板或磁珠来结合 DNA, 也不需要化学试剂来脱石蜡。昌美生物科技有限公司将固体表面可逆结合技术 (SSRB) 应用到 Just-a-Tube 系统中, 离心管底侧涂有可与 FFPE 组织标本中 DNA 选择性高效结合的结合剂。在结合缓冲液作用下, 结合剂可特异性结合 DNA, 而蛋白和其它的成分保留在溶液中。未结合的物质经洗涤后予以去除, 纯化的 DNA 很容易用洗脱液或去离子水洗脱。更重要的是, 在福尔马林固定组织样品时, 能造成 DNA 的化学修饰, 影响 DNA 的模板功能, 而我们的独特的方法, 在提纯过程中能将 DNA 的化学修饰大部分逆转, 从而获得更高质量的 DNA 模板。因此, 利用 Just-a-Tube FFPE 组织标本 DNA 提纯试剂盒提纯的 DNA 为下游反应如限制性酶切反应、引物延伸、PCR、全基因组扩增 (WGA)、DNA 甲基化分析及其它 DNA 应用提供了很好的模板。

亮点

操作简单和快速: 这种不使用有机溶剂的新型的脱蜡方法使得整个操作简单, 安全和快速, 避免有机溶剂对身体的可能伤害。并且, 新型的脱蜡方法大大缩短了提纯 FFPE DNA 的时间。

质量可靠: 始终在管中操作, 采取可靠措施避免交叉污染。并能使福尔马林固定时 DNA 化学修饰得到大幅逆转, 因此可获得足量和高质量的 DNA。

回收率高: 固体表面可逆结合技术 (SSRB) 将有限样品的 DNA 进行了最大量结合和释放, 与小柱膜回收和磁珠回收技术相比没有死角, 产量更高。

环境友好型操作: 在脱蜡过程中不使用有机试剂。不使用蛋白结构变性剂, 如在二氧化硅膜方法结合步骤中使用的胍盐。

所需的额外材料

无水乙醇, 异丙醇;

显微镜用薄片切片机;

可离 1.5 ml 或 2 ml 离心管的离心机;

涡旋振荡器, 水浴锅或恒温金属浴。

常规防范

1. 该试剂盒仅用于研究, 使用试剂盒时应有一定的防范措施。
2. 实验操作时需穿实验服, 戴一次性手套和护目镜。避免摄取和吸入试剂, 避免皮肤直接接触试剂盒中试剂, 一旦接触, 用水彻底冲洗。
3. 提纯 DNA 时, 适当的无菌操作来避免核酸酶的污染, 使用无菌的新吸头避免交叉污染。

实验开始之前的准备工作

1. 从 FFPE 组织标本提纯 gDNA 之前, 根据需要提纯的样品数目制备新鲜的工作结合缓冲液。工作结合缓冲液由结合缓冲液 (KB5) 与异丙醇以 1:4 体积比混合均匀得到, 如配制 500 μ l 工作结合缓冲液: 将 100 μ l 结合缓冲液 (KB5) 与 400 μ l 异丙醇混合均匀。需制备的工作结合缓冲液的体积根据: (1) 待提纯的样品数目; (2) 预期的损失, 在分装的过程中, 一般会损失 10%。向每 100 μ l 细胞裂解液中加入 150 μ l 含异丙醇的工作结合缓冲液 (1.5: 1 比例)。剩余的结合缓冲液当天予以丢弃。
2. FD-175-M 试剂盒, 加 22 ml 无水乙醇到 Washing Buffer I (WB1) 中, 充分混匀。FD-175-L 试剂盒, 加 110 ml 无水乙醇到 Washing Buffer I (WB1) 中, 充分混匀。在瓶上做好标记表示已加乙醇! 室温保存, 已加乙醇的 WB1 在六个月之内使用。
3. FD-175-M 试剂盒, 加 72 ml 无水乙醇到 Washing Buffer II (WB2) 中, 充分混匀。FD-175-L 试剂盒, 加 360 ml 无水乙醇到 Washing Buffer II (WB2) 中, 充分混匀。在瓶上做好标记表示已加乙醇! 室温保存, 已加乙醇的 WB2 在六个月之内使用。
4. 每个样品需用干净的显微镜用薄片切片机刀片和镊子, 避免核酸酶污染和样品的交叉污染。不同组织样本的刀片和镊子可用 75% 乙醇进行清洁。
5. 尽可能切去组织块多余的石蜡, 然后将其切成 10 μ m 厚的组织切片。为了进行足量的 DNA 提纯, 建议组织切片表面积为 0.5 x 0.5 cm^2 。

操作步骤

加热 FFPE 切片

1. 用镊子夹 3-8 片 10 μm FFPE 组织切片到一个无菌的, 1.5 ml 离心管中。
2. 向管中加 300 μl DNA 加热缓冲液 (Heating Buffer, DH1)。
3. 以最大转速将离心管离心 20 秒, 使所有的切片旋转到处每个管子的底部, 确保组织切片被加热缓冲液 (Heating Buffer) 覆盖。
4. 将离心管置于 94 $^{\circ}\text{C}$ 温育 10 分钟来溶解石蜡。
5. 室温短暂离心离心管 10- 15 秒, 使所有的液体集中在管子的底部。

消化 FFPE 切片

1. 加 15 μl 蛋白酶 K 到每管中, 用吸头来回吹打 10 - 12 次, 以确保组织碎片很好地悬浮在溶液中。(注意: 在混合的过程中组织切片不要堵塞吸头。)
2. 将管子置于 62 $^{\circ}\text{C}$ 温育 3 - 4 小时, 偶尔轻敲管壁混匀 (保证组织浸没在消化液中)。若在温育结束时, 仍有组织碎片, 可将温育时间延长 30 - 60 分钟, 或选择 52 $^{\circ}\text{C}$ 消化过夜。
3. 温育结束后, 在小管还是热的时候, 立即将管子从温育器转移至离心机中以最大转速 ($\geq 13000\text{ g}$) 室温离心 1 分钟, 将石蜡和组织溶液分离, 石蜡在溶液表面会形成一薄层。

结合步骤

1. 吸取管中所有的溶液 (约 315 μl) 到一个新的结合管 (Binding Tube, BT3) (试剂盒提供) 中。(注意: 管中石蜡也许在溶液的上层形成薄层。当从管中吸取液体时, 用一个干净的 1 ml 吸头穿过石蜡层, 吸取管中所有的溶液到到一个新的结合管 (BT3) 中。如果吸头穿过石蜡层被堵塞, 更换新的吸头, 并将新的吸头在之前穿膜的位置来吸取管中所有的溶液。
2. 加之前制备的 500 μl 含异丙醇的工作结合缓冲液 (KB5) 到结合管 (BT3) 中。用吸头来回吹打溶液 10 次来获得均一的溶液 (注意: 将工作的结合缓冲液与裂解液彻底混匀这一步非常关键)。
3. 盖上结合管 (BT3) 盖子。室温下以最大转速 (约 13000 rpm 或 16000 g) 将结合管 (BT3) 离心 5 分钟来结合 DNA (注意: 在离心过程中, 离心管盖朝向转子方向放置, 离心后大部分 DNA 将聚集在背对管盖的管底一侧。)
4. 打开盖子, 去除结合管中的液体。可选用下列方法来移除液体: (1) 在废液缸的上方, 直接将结合管中的液体倾倒入废液收集杯中。(2) 用吸头吸走离心管底部的溶液。在吸的过程之中, 吸头一定不要碰到管壁, 因为产物都结合在管壁上。

清洗步骤

1. 向每管中加 500 μl 含乙醇的 Washing Buffer I (WB1)。摇动管子 4 - 5 次来混合, 室温温育 1 分钟。
2. 室温下以最大转速 ($\geq 13000\text{ rpm}$ 或 16000 g) 离心结合管 1 分钟。在离心过程中, 离心管盖朝向转子方向放置。
3. 根据结合步骤第 4 步介绍的方法移除结合管 (BT3) 中的 Washing Buffer I (WB1)。
4. 加 800 μl 含乙醇的 Washing Buffer II (WB2) 到结合管 (BT3) 中。盖上结合管管盖后将其震荡 4 - 5 次或颠倒 7 - 8 次混匀。

5. 室温下以最大转速(≥ 13000 rpm 或 16000 g) 离心结合管 1 分钟。在离心过程中, 离心管盖朝向转子方向放置。
6. 根据结合步骤第 4 步介绍的方法移除结合管 (BT3) 中的 Washing Buffer II (WB2)
7. 重复步骤 4 到 6, 即用 Washing Buffer II (WB2) 洗两次。
8. 洗完最后一次后, 倒掉管中的液体, 为确保完全去除 Washing Buffer II, 将结合管 (BT3) 短暂离心, 用 $200 \mu\text{l}$ 吸头吸走离心管中间的最后一滴液体, 在实验室通风橱中干燥结合管 (BT3) 8 - 10 分钟来去除残余的液体, 也可以将管子盖子打开后置于 62°C 培养箱或金属浴干燥 3 - 5 分钟。

洗脱 DNA

吸附在结合管壁的 gDNA 至少可以保存六个月。如果 gDNA 需要洗脱, 可进行下面的程序。

1. 加 $30 - 100 \mu\text{l}$ 洗脱缓冲液 (EB2) 到每个结合管中 (如果需要高浓度的 DNA, 每管加 $20 \mu\text{l}$ 洗脱缓冲液 (EB2), 选择方法 1, 2 或 3 来洗脱 gDNA。)
2. 方法 1 (涡旋洗脱): 盖上结合管的盖子, 涡旋 30 秒, 以最大转速短暂离心将所有的液体收集到结合管底部; 方法 2 (震荡洗脱): 盖上结合管的盖子, 震荡 2 分钟; 方法 3 (移液枪洗脱): 上下吹打溶液 8 - 10 次, 盖上结合管的盖子, 将管子室温放置 2 分钟。
3. 洗脱的 gDNA 可直接应用于下游反应。或在 4°C 短期储存或者 -20°C 长期储存。

电泳及下游的应用

提纯的 gDNA 的大小分布可用琼脂糖凝胶电泳进行检测。用分光光度计或荧光标记法测量产量。A260/A280 值在 1.6 - 1.9 之间 (比常规的值偏低, 但不影响任何下游分子生物学实验)。结合管中纯化的 gDNA 可直接用于下游反应, 如限制性酶切反应, 引物延伸, SNP 分析, PCR, STR 分析, DNA 序列分析, 全基因组扩增 (WGA) 及其它分子实验。更重要的是, 我们的实验方法可以明显地逆转 DNA 化学修饰 (如石蜡包埋过程中福尔马林固定的副作用引起的基团单羟甲基化), 使 DNA 恢复到正常的分子结构, 作为 DNA 合成很好的模板。这样, 当以等量的 DNA 作为模板用作 DNA 合成时, 与其它化学脱蜡过程相比, 本方法可以获得更多的可供扩增的 DNA 模板。

常见问题及解决方案

问题	原因	解决方案
DNA 产量低	用与提纯的组织的量少于推荐的量或是太小。	增加一片 FFPE 切片。
没有分离到 DNA	用于提取 DNA 的切片不含有组织。	核对 FFPE 块, 确保用于 gDNA 分离的切片中含有组织。
没有 PCR 产物	PCR 反应液中漏加组分。	确保 PCR 反应液加了所有的组分。检查 PCR 反应的阳性对照和阴性对照。