



# NuClean Magbead FFPE DNA Kit

## 新型磁珠法固定组织DNA提取试剂盒

目录号：CW2558S（32 preps）

CW2558M（96 preps）

保存条件：室温（15-30℃）

### 产品内容

Component	CW2558S 32 preps	CW2558M 96 preps
Buffer DS	10 mL	25 mL
Buffer GTL	10 mL	30 mL
Buffer GL	10 mL	30 mL
Buffer GW1 (concentrate)	30 mL	80 mL
Buffer GW2 (concentrate)	20 mL	50 mL
Buffer TE	10 mL	30 mL
Proteinase K	2×1 mL	4×1.25 mL
RNase A (100 mg/mL)	0.1mL	0.3 mL
Magbeads PN	1 mL	2×1 mL

### 产品简介

该试剂盒提供了一种简单、快速、高效的从石蜡包埋组织中提取DNA的方法。实验过程中可采取无毒的脱蜡剂去除石蜡，降低实验过程中对实验者的危害。组织裂解后，DNA结合于硅基包被磁珠表面。漂洗后，高纯度的DNA洗脱于TE或去离子水中。经过纯化的DNA可以直接用于PCR、Real-time PCR、SNP基因分型、STR基因分型、二代测序和药物基因组学研究等。DNA的得率、片段大小与样品类型、储存条件及储存时间有很大关系。

- 自备试剂：**
1. 康为全自动核酸提取仪（CWE2100）
  2. 96 DW PLate（CW2523）、8 channel Comb（CW2524）
  3. 无水乙醇、异丙醇

## 实验前准备及重要注意事项

1. 获得样品后，要尽快将样品在4%-10%的福尔马林中固定，固定时间以14-24小时为宜，时间过长易导致基因组断裂，影响下游实验。如果甲醛固定时间过长或样本存放时间过久（>1年）则易导致DNA完整性受损，无法扩出长片段。
2. 确保包埋前的样品彻底脱水，残留的福尔马林会抑制Proteinase K的作用。
3. 第一次使用前应按试剂瓶标签说明先在Buffer GW1和Buffer GW2中加入无水乙醇。
4. 使用前请检查Buffer GTL、Buffer GL和Buffer DS是否出现结晶或者沉淀，如有结晶或者沉淀，请将Buffer GTL、Buffer GL和Buffer DS于56℃水浴重新溶解。
5. 如果下游实验对RNA污染比较敏感，可以在加入Buffer GL前加入2 μL DNase-Free的RNase A（100 mg/mL），试剂盒中的RNase A如果长时间不用，建议-20℃保存。
6. 实验开始前将水浴锅或恒温混匀仪预热至56℃。
7. Magbeads PN严禁冰冻和高速离心，否则可能会对Magbeads PN造成不可逆的损害。Magbeads PN每次使用时请充分振荡混合均匀。

## 操作步骤

### 一、石蜡包埋样本：

1. 用手术刀将组织块中多余的石蜡修剪掉，露出组织后切成5-10 μm的薄片。
2. 取约1×1 cm<sup>2</sup>的切片（共约3-8片切片）置于离心管（自备）中，加入160 μL Buffer DS，涡旋震荡10秒，再加入180 μL Buffer GTL和20 μL Proteinase K，涡旋震荡10秒。12000 rpm，25℃ 离心1分钟。

**注意：1）**如果样品表面已经暴露在空气中，请将接触空气的2-3片弃掉不用。

**2）**DS低于18℃会凝固，如果凝固不影响下面的实验。

3. 56℃ 孵育1小时，直至样品完全溶解。90℃ 孵育1小时。样品室温静置30秒后25℃、12000 rpm离心1分钟，用移液器沿管壁小心吸取下层水相（约180μL）于新离心管中，尽量避免吸入蜡液和管底沉淀。

**注意：1）**56℃孵育后的样品可置于室温，直至水浴锅或干浴锅温度达到90℃后再把样品置于90℃孵育。

**2）**可选步骤：加入7 μL UNG（1 U/μL），50℃，5min，不震荡。此步骤的目的是降低低频发生的C>T|G>A转换（人为突变），同时有效保留真实发生的突变，从而使假阳性风险降至最低。UNG本试剂盒并未提供，如果需要可单独向本公司订购，货号：CW0951S。

4. 可选步骤，如果少量RNA的存在会对下游实验造成影响，建议向水相中加入2  $\mu\text{L}$  浓度为100 mg/mL的RNase A溶液，震荡混匀，室温放置2 min。
5. 加入20  $\mu\text{L}$  Proteinase K，65 $^{\circ}\text{C}$ ，450 rpm孵育15 min，形成Lysate。

## 二、福尔马林等固定液中的样本：

1. 取约20 mg的样本，切成小块，置于离心管中，加入500  $\mu\text{L}$  10mM PBS (PH 7.4)，涡旋振荡，12,000 rpm ( $\sim 13,400\times g$ ) 离心1分钟，弃上清，重复3次。
2. 上述管中加入180  $\mu\text{L}$  Buffer GTL，20  $\mu\text{L}$  Proteinase K，涡旋震荡混匀。
3. 56 $^{\circ}\text{C}$  孵育1小时，直至样品完全溶解。90 $^{\circ}\text{C}$  孵育1小时。样品室温静置30秒后25 $^{\circ}\text{C}$ 、12000 rpm离心1分钟，用移液器沿管壁小心吸取下层水相（约180 $\mu\text{L}$ ）于新离心管中，尽量避免吸入蜡液和管底沉淀。

**注意：1) 56 $^{\circ}\text{C}$ 孵育后的样品可置于室温，直至水浴锅或干浴锅温度达到90 $^{\circ}\text{C}$ 后再把样品置于90 $^{\circ}\text{C}$ 孵育。**

- 2) 可选步骤：加入7  $\mu\text{L}$  UNG (1U/ $\mu\text{L}$ )，50 $^{\circ}\text{C}$ ，5min，不震荡。此步骤的目的是降低低频发生的 C>T | G>A 转换（人为突变），同时有效保留真实发生的突变，从而使假阳性风险降至最低。UNG本试剂盒并未提供，如果需要可单独向本公司订购，货号：CW0951S。
4. 可选步骤，如果少量RNA的存在会对下游实验造成影响，建议向水相中加入2  $\mu\text{L}$  浓度为100 mg/mL的RNase A溶液，震荡混匀，室温放置2 min。
5. 加入20  $\mu\text{L}$  Proteinase K，65 $^{\circ}\text{C}$ ，450 rpm孵育15 min，形成Lysate。

## 手动操作步骤：

1. 向Lysate 中加入200  $\mu\text{L}$  Buffer GL并涡旋震荡混匀。
2. 向离心管中加入300  $\mu\text{L}$  异丙醇与20  $\mu\text{L}$  磁珠后涡旋震荡混匀5秒钟，之后将离心管固定于25 $^{\circ}\text{C}$ 、1600 rpm的恒温混匀仪上震荡结合10分钟。
3. 将离心管固定于磁力架上静置1分钟，之后弃去溶液。
4. 向离心管中加入750  $\mu\text{L}$  Buffer GW1（使用前请检查是否已加入无水乙醇），涡旋震荡5秒钟后放于25 $^{\circ}\text{C}$ 、1600 rpm的恒温混匀仪上震荡结合2分钟。
5. 将离心管固定于磁力架上静置1分钟，之后弃去溶液。
6. 重复步骤4-5。
7. 向离心管中加入750  $\mu\text{L}$  Buffer GW2（使用前请检查是否已加入无水乙醇），涡旋震荡5秒钟后放于25 $^{\circ}\text{C}$ 、1600 rpm的恒温混匀仪上震荡结合2分钟。
8. 将离心管固定于磁力架上静置1分钟，之后弃去溶液。
9. 重复步骤7-8。
10. 离心管短暂离心后，将其重新固定于磁力架上用移液器去除管底溶液，之后开盖室温放置5-10分钟使乙醇充分挥发。

- 向离心管中加入50-200  $\mu\text{L}$  Buffer TE后涡旋震荡使磁珠充分悬浮于洗脱液中，之后将离心管固定于56 $^{\circ}\text{C}$ 、1600 rpm的恒温混匀上震荡洗脱10分钟。
- 将离心管固定于磁力架上静置2分钟，之后将洗脱液转移至新的离心管中-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

## 与CWE2100全自动核酸提取仪匹配

- 按下表向96 DW深孔板中加入试剂：

位置	试剂及用量
1&7 Colume	Lysate: all Buffer GL: 200 $\mu\text{L}$ 异丙醇: 300 $\mu\text{L}$ Magbeads PN: 20 $\mu\text{L}$
2&8 Colume	Buffer GW1: 750 $\mu\text{L}$
3&9 Colume	Buffer GW1: 750 $\mu\text{L}$
4&10 Colume	Buffer GW2: 750 $\mu\text{L}$
5&11 Colume	Buffer GW2: 750 $\mu\text{L}$
6&12 Colume	Buffer TE: 70 $\mu\text{L}$

**注意：在1&7列中，可以先将Magbeads PN与异丙醇按表中比例混匀后再加入。**

- 将磁套与96 DW深孔板放入CWE2100中，运行“FFPE DNA程序”。
- 约30分钟后程序运行结束，将96DW深孔板和磁套从仪器中取出，把“6&12 Colume”中的洗脱产物转移至离心管中-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

附：FFPE DNA程序

孔位	释放磁珠	名称	等待时间	混合时间	混合速度	循环数	磁吸时间	体系	温度
1	是	混合	0	2 min	快	1	5s/次，3次	700 $\mu\text{L}$	室温
				3 min	中				
2	是	混合	0	2 min	快	1	1s/次，2次	750 $\mu\text{L}$	室温
3	是	混合	0	2 min	快	1	1s/次，2次	750 $\mu\text{L}$	室温
4	是	混合	0	2 min	快	1	1s/次，2次	750 $\mu\text{L}$	室温
5	是	混合	0	2 min	快	1	1s/次，2次	750 $\mu\text{L}$	室温
5	否	干燥	5 min	0	0	0	0	0	室温
6	是	洗脱	0	2 min	中	2	10s/次，5次	70 $\mu\text{L}$	60 $^{\circ}\text{C}$
				2 min	快				
4	是	释放	0	10 s	快	0	0	750 $\mu\text{L}$	室温