



蒋丽

2012-05-24

QIAamp DNA FFPE Tissue Kit
(从福尔马林固定、石蜡包埋组织中纯化DNA)

声明：本中文操作说明由**QIAGEN**上海员工内部翻译，仅供参考，以英文操作说明为准。鉴于个人理解差异，如有中英文不符合的地方，请即时联系我们。

QIAamp DNA FFPE Tissue Kit	(50)
Catalog no.	56404
Number of preps	50
QIAamp MinElute® Columns	50
Collection Tubes (2 ml)	3 x 50
Buffer ATL	10 ml
Buffer AL*	12 ml
Buffer AW1* (concentrate)	19 ml
Buffer AW2† (concentrate)	13 ml
Buffer ATE†	12 ml
Proteinase K	1.25 ml
Handbook	1

*包含磷酸盐，与含有漂白粉的消毒剂不相容

†包含叠氮化钠作为防腐剂

- ◆ QIAamp MinElute columns从收到之日起请置于2–8°C，在该环境中可稳定保存至少一年，在室温（15–25°C）条件下可保存4周。
- ◆ 所有的buffer都可置于室温（15–25°C）保存至少一年。
- ◆ QIAamp DNA FFPE Tissue Kit的储存buffer中含有即用的proteinase K，proteinase K在室温(15–25°C)条件下可稳定保存至少一年，如果想长期保存，而室温又常超过25°C的话，建议将proteinase K保存于冰箱2–8°C。

QIAamp DNA FFPE Tissue Kit采用成熟的QIAamp MinElute技术，从小体积样本中纯化基因组DNA和线粒体DNA。该试剂盒同时具备硅胶膜选择性结合DNA的特性，以及20µl到100 µl灵活的洗脱体积。

经专门优化的裂解条件，无需过夜孵育，即可从FFPE组织中有效纯化基因组DNA。蛋白酶K消化后在较高的温度孵育，去除福尔马林交联，提高DNA产量和纯度，使得到的DNA更适用于下游应用。需要注意的是，从FFPE样本中分离的DNA通常分子量低于新鲜或冷冻样本中的DNA。DNA片段化的程度依赖于样本类型、储存时间以及用于固定的条件。

样本裂解后，通过简单的QIAamp DNA FFPE Tissue步骤，在30分钟内即可得到高纯DNA，尤其适用于同时处理多个样本。

纯化的DNA用Buffer ATE或水洗脱，可即用于扩增反应或储存于-20°C。经纯化的核酸不含核酸酶和其他杂质。

QIAamp DNA FFPE Tissue的操作

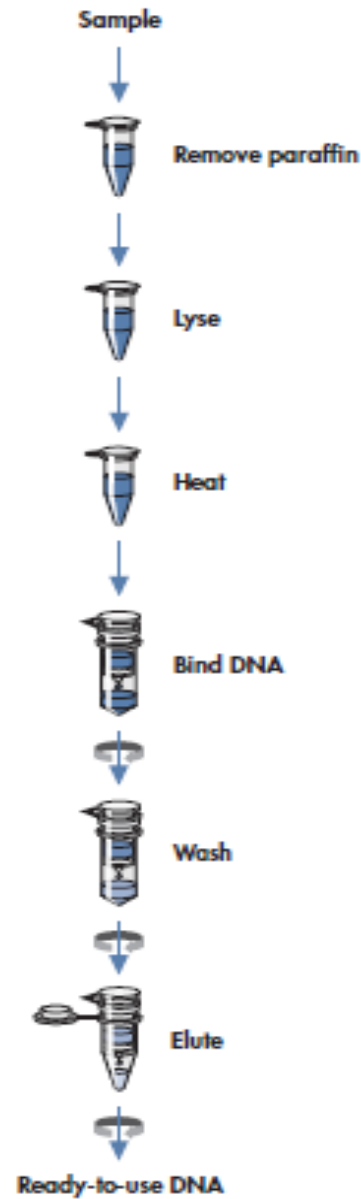
由6个步骤组成:

- ① 去除石蜡: 将石蜡溶于二甲苯中, 去除石蜡
- ② 裂解: 样本通过短时的蛋白酶 K消化, 在变性条件下裂解
- ③ 加热: 在90°C孵育, 逆转福尔马林交联
- ④ 结合: DNA 结合到硅胶膜上, 杂质流走
- ⑤ 洗涤: 将残留的污染物洗掉
- ⑥ 洗脱: 将高纯、浓缩 DNA从硅胶膜上洗脱

实验人员需具备:

- ◆ 二甲苯
- ◆ 96–100%乙醇
- ◆ 1.5 ml 或2 ml离心管 (裂解过程用)
- ◆ 1.5 ml 离心管 (洗脱过程用)
- ◆ 枪头
- ◆ 能升温到90°C的水浴锅
- ◆ 能放2ml离心管的离心机
- ◆ 振荡器
- ◆ RNase A (100 mg/ml; 货号: 19101)
(可选)

QIAamp DNA FFPE Tissue Procedure



准备工作:

- ✓ 所有离心步骤均应在室温下进行(15–25°C)
- ✓ 其他见“Important Notes”, 英文原版11–13页
- ✓ 所有buffer在室温下准备好
- ✓ 水浴设置于56°C
- ✓ Buffer AL或Buffer ATL有沉淀, 置于70°C温柔震荡溶解
- ✓ 确保Buffer AW1和Buffer AW2已按照13页的要求准备好

1. 用解剖刀将样本块多余的石蜡切除；
2. 切8片5–10 μm 厚的样本；（见起始样本）（如果样本外围暴露于空气，可以丢弃开始的2-3片）
3. 把切好的样本立刻置于1.5 或 2 ml离心管中，并加入1ml二甲苯。盖上管盖于振荡器上剧烈震荡10s；
4. 最大转速室温离心2分钟；
5. 去上清，切勿碰到沉淀；
6. 加入1ml 96–100%乙醇于沉淀，振荡混匀；（乙醇抽提样本中残余的二甲苯）
7. 最大转速室温离心2分钟；
8. 去上清，切勿碰到沉淀；（用小枪头小心去除残余乙醇）
9. 打开管盖室温(15–25°C)或37°C孵育10分钟，直到残留的酒精蒸发干净；
10. 用180 μl Buffer ATL重悬沉淀，加入20 μl proteinase K，振荡混匀；
11. 56°C孵育1小时，直到样本完全裂解；
12. 90°C孵育1小时；(在Buffer ATL中90°C孵育会部分逆转核酸的甲醛修饰，过长的孵育时间或过高的孵育温度都会导致更多的DNA断裂。如果只有一个水浴装置，在56°C孵育完后请置于室温，等到水浴升到90°C再开始孵育)

13. 短暂离心，去除1.5ml离心管管盖内壁的液滴；（如果基因组DNA需要RNA-free的，继续加入2 μ l RNase A (100 mg/ml)，室温孵育2分钟，在加RNase A前确保样本已冷却至室温）
14. 加200ul Buffer AL到样品中，振荡器上彻底混匀，然后加入2ml 96–100%乙醇，再次用振荡器彻底混匀；（此处的样本、Buffer AL、乙醇要确保即刻充分混匀，当有很多样本时，可以将Buffer AL和乙醇预混匀并一步一起加入，Buffer AL和乙醇加入后可能会有白色沉淀，不会影响后续的实验）
15. 短暂离心，去除1.5ml离心管管盖内壁的液滴；
16. 将QIAamp MinElute column放置在2ml收集管中，在不打湿边缘的情况下，将全部裂解液小心转移到QIAamp MinElute column，盖上管盖，6000 x g(8000 rpm)离心1分钟，将QIAamp MinElute column放置于另一个干净的2ml收集管中，弃除装有流液的收集管；（如果离心后裂解液并没有完全通过膜，更高速度再次离心，直到QIAamp MinElute column没有流液为止）
17. 小心打开QIAamp MinElute column，在不打湿边缘的情况下，加入500ul Buffer AW1，盖上管盖，6000 x g(8000 rpm)离心1分钟，将QIAamp MinElute column放置于另一个干净的2ml离心管中，弃除装有流液的收集管；

18. 小心打开QIAamp MinElute column，在不打湿边缘的情况下，加入500ul Buffer AW2。盖上管盖，6000 x g(8000 rpm)离心1分钟，将QIAamp MinElute column放置于另一个干净的2ml离心管中，弃除将装有流液的收集管；（避免QIAamp MinElute column和流液的接触，有些离心机转子在减速时会振动，导致含有乙醇的流液接触到QIAamp MinElute column，所以移动QIAamp MinElute column和收集管时请小心）
19. 全速(20,000 x g; 14,000 rpm)离心3分钟以彻底干燥QIAamp MinElute column中的膜；（该过程很有必要，因为乙醇若带入洗脱液中将会干扰后续的实验）
20. 将QIAamp MinElute column置于一干净的1.5ml离心管内，弃除将装有流液的收集管。小心打开QIAamp MinElute column的管盖，往膜中央加入20–100 µl Buffer ATE；（确保Buffer ATE在室温中准备好了，想要更小的洗脱体积(<50 µl)，将Buffer ATE滴入膜中央）
21. 盖上管盖，室温(15–25°C)放置1 分钟，全速(20,000 x g; 14,000 rpm)离心1分钟。（离心前，确保室温下Buffer ATE 加入QIAamp MinElute column已孵育5分钟，以提高DNA产量）