

Extiquick™ 石蜡包埋组织 DNA 提取试剂盒

操作说明书

(Cat#EX003, Version 1.3)

欣基（杭州）生物科技有限公司
WisGen BioSciences Co., Ltd

For Research Use Only.

Not For Use in Diagnostic Procedures.

仅供科研使用

产品组成

主货号：EX003 规格：100 preps / 250 preps

组 分	100 preps (EX003-100)	250 preps (EX003-250)	保存条件
DPS Buffer	60 mL	150 mL	室温
Proteinase K	50 mg	120 mg	2 ~ 8 °C
Protease Dissolve Buffer	2.5 mL	6 mL	2 ~ 8 °C
FFPE Lysis Buffer	40 mL	100 mL	室温
FFPE Wash Buffer I	60 mL	150 mL	室温
FFPE Wash Buffer II	30 mL	75 mL	室温
Elution Buffer	5 mL	12.5 mL	室温
Silic Beads B	2 mL	5 mL	2 ~ 8 °C

保存与运输条件

请严格按照表格所示的温度进行保存，2 ~ 8 °C运输。

- 注意：**1) Proteinase K 干粉状态可在 2 ~ 8 °C保存两年，在 -30 ~ -15 °C保存三年，溶解后的 Proteinase K 需置于 -30 ~ -15 °C保存；
- 2) Silic Beads B 严禁冷冻或离心。

产品概述

Extiquick™石蜡包埋组织 DNA 提取试剂盒基于超顺磁性的磁性粒子纯化技术，高效吸附样本中的 DNA，结合配套的无毒脱蜡及清洗试剂，最大程度地将样本进行脱蜡、解除甲醛交联、去除蛋白质及其他杂质，达到快速分离、纯化核酸的目的。本产品适用于石蜡包埋及福尔马林溶液固定的组织，操作过程简单快速，分离出的 DNA 纯度高、完整性好且质量稳定，可直接用于定量 PCR 及二代测序文库构建等下游分子实验，并可适配全自动化核酸提取仪。

适用范围

本产品适用于石蜡包埋组织、石蜡切片组织及福尔马林固定的新鲜组织。

注意事项

! 请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项：

1. 请根据试剂标签的指示量加入 Protease Dissolve Buffer，轻轻颠倒混匀数次，置于室温下 10 min，使 Proteinase K 充分溶解，溶液终浓度为 20 mg/mL。建议 Proteinase K 溶液分装保存于 -30 ~ -15 °C，避免反复冻融影响活性。
2. FFPE Lysis Buffer 在保存环境温度较低时可能会出现晶体析出或分层现象，使用前需要加热溶解（建议温度为 56 °C），待晶体溶解混匀后方可使用。
3. FFPE Wash Buffer I 和 FFPE Wash Buffer II 使用前，请按瓶身标签所示加入对应量的无水乙醇后方可使用。
4. Silic Beads B 在使用前请务必置于室温下平衡 30 min，并充分振荡混匀，使磁珠均匀分散后方可使用。此组分严禁冷冻或者离心，此操作将导致试剂失效而无法使用。
5. 不可过度干燥磁珠，以免造成 DNA 洗脱效率下降。
6. 石蜡切片请使用白片进行 DNA 提取，不可使用染色片。
7. 如果使用 DPS Buffer 首次脱蜡效果不佳，可重复进行一次脱蜡操作。

实验前准备

1. 自备试剂

生产商#货号	产品/试剂名称	备注
*	无水乙醇	/
*	异丙醇	/
*	Nuclease-Free Water	/

^ * 常规实验室供应商品牌即可

2. 自备材料

实验仪器及耗材

生产商#货号	仪器/耗材名称	描述
*	台式离心机	/
*	微型离心机	/
*	涡旋振荡混匀仪	/
*	恒温振荡金属浴	/
*	移液器	/
Thermo Fisher# HM 340E	石蜡切片机	可选择其它同类产品
AlIsheng# AS-17030-00	全自动核酸提取仪 Auto-Pure 32A	自动法匹配的仪器； 可选择其它同类产品
Thermo Fisher#Q33216	Qubit® 3.0 Fluorometer	可选择基于荧光染料法的 DNA 定量系统的其 它同类产品
Agilent#G2939AA	Agilent 2100 Electrophoresis Bioanalyzer® system	或其它同类产品
*	1.5 mL 无色灭菌离心管	建议选择无核酸酶 的产品

生产商#货号	仪器/耗材名称	描述
*	1000 μ L 吸头	建议选择无核酸酶带滤芯的产品
*	200 μ L 吸头	建议选择无核酸酶带滤芯的产品
*	0.5 - 10 μ L 吸头	建议选择无核酸酶带滤芯的产品
*	石蜡切片机刀片	可选择与切片机匹配产品
WisGen#QC001-R	xQuant™ 管 (适配 Qubit 平台)	可选择适配 Qubit® 荧光计的其它同类产品
WisGen#QC002-R	xQuant™ 检测联管 (适配 Qubit 平台)	可选择适配 Qubit® Flex 荧光计的其它同类产品
WisGen#MR-B-16	xMag™ 磁力架 (1.5 mL*16 孔)	手动法匹配的耗材； 可选择其它同类产品
AllSheng#AS-17031-01	96 孔 2 mL 深孔板	可选择适配全自动核酸提取仪 Auto-Pure 32A 的其它同类产品
AllSheng#AS-17031-02	2 mL 磁套棒	可选择适配全自动核酸提取仪 Auto-Pure 32A 的其它同类产品

⬆ * 常规实验室供应商品牌即可

实验流程 1：手动法操作步骤

1. 样本处理

1.1 石蜡包埋组织

1.1.1 将石蜡包埋组织进行切片，厚度为 5 ~ 6 μm 。

1.1.2 组织横截面积 $\leq 0.5 \times 0.5 \text{ mm}^2$ (绿豆大小)，切取 10 ~ 15 片；

$0.5 \times 0.5 \text{ mm}^2 < \text{组织横截面积} \leq 1 \times 1 \text{ mm}^2$ ，切取 7 ~ 10 片；

组织横截面积 $> 1 \times 1 \text{ mm}^2$ ，切取 5 ~ 7 片。

1.1.3 将切好的样本置于 1.5 mL 离心管中，执行步骤 2 的实验流程。

1.2 石蜡切片组织

1.2.1 使用未染色的石蜡切片（白片），厚度为 5 ~ 6 μm 。

1.2.2 组织横截面积 $\leq 0.5 \times 0.5 \text{ mm}^2$ (绿豆大小)，取 10 ~ 15 片；

$0.5 \times 0.5 \text{ mm}^2 < \text{组织横截面积} \leq 1 \times 1 \text{ mm}^2$ ，取 7 ~ 10 片；

组织横截面积 $> 1 \times 1 \text{ mm}^2$ ，取 5 ~ 7 片。

1.2.3 用刀片刮下石蜡组织后转移至 1.5 mL 离心管中，执行步骤 2 的实验流程。

1.3 福尔马林固定组织

1.3.1 用镊子将组织从保存管中取出，手术组织剪切下 $0.5 \times 0.5 \text{ mm}^2$ 大小的组织 (绿豆大小)，穿刺组织取 1 条转移至 1.5 mL 离心管中。

1.3.2 加入 500 μL 1 \times PBS 缓冲液，震荡 30 sec，12000 rpm 离心 2 min，去除上清。

1.3.3 重复步骤 1.3.2 共计三次。

1.3.4 将组织充分进行匀浆处理、液氮研磨或剪碎。

1.3.5 执行步骤 2.2 的实验流程。

2. 样本裂解与消化

2.1 在步骤 1 处理好的样本中加入 0.6 mL DPS Buffer 涡旋 30 sec, 56 °C 温育 5 min, 12000 rpm 离心 2 min 后, 去除全部上清, 保留沉淀。

! 注意: 福尔马林固定的新鲜组织无需执行此操作步骤。

2.2 向离心管中加入 20 μ L Proteinase K (20 mg/mL) 和 400 μ L FFPE Lysis Buffer, 振荡混匀 10 sec。

! 注意: 若 FFPE Lysis Buffer 存在晶体析出或分层, 使用前请置于 56 °C 下水浴加热, 完全溶解混匀后使用。

2.3 将样本管置于 56 °C 振荡金属浴中消化反应 1 h。

! 注意: 若消化不完全, 可延长消化时间 1 ~ 2 h。

2.4 消化结束后, 将样本管转至 90 °C 水浴锅中进行解交联反应 1 h。

! 注意: 消化完成后, 若消化液中存在明显未消化沉淀物, 12000 rpm 离心 3 min, 将上清溶液转移至新的 1.5 mL 离心管中, 若有油状物尽量避免吸取, 再执行步骤 2.5。

2.5 在样本管中加入 200 μ L 异丙醇, 振荡混匀 10 sec。

! 注意: 如加入异丙醇后, 出现分层现象, 可以补加 50 ~ 100 μ L Nuclease-Free Water 后混匀。

3. 磁珠纯化

3.1 在步骤 2 消化完成的样本中，加入 20 μ L Silic Beads B，振荡混匀 30 sec，室温静置 10 min，期间每隔 3 min 振荡混匀一次，每次 10 sec。

！ 注意：Silic Beads B 需提前室温放置 30 min，涡旋混匀后再使用。

3.2 瞬时离心后，将离心管置于磁力架上静置 2 min，待溶液完全澄清后，小心去除上清。

3.3 加入 800 μ L FFPE Wash Buffer I，振荡混匀 10 sec。

！ 注意：FFPE Wash Buffer I 确认加入相应体积无水乙醇后，方可使用。

3.4 瞬时离心后，将离心管置于磁力架上静置 2 min，待溶液完全澄清后，小心去除上清液。

3.5 加入 800 μ L FFPE Wash Buffer II，振荡混匀 10 sec。

！ 注意：FFPE Wash Buffer II 确认加入相应体积无水乙醇后，方可使用。

3.6 瞬时离心后，将离心管置于磁力架上静置 2 min，待溶液完全澄清，吸弃上清，将离心管从磁力架上取下，打开管盖，室温干燥 1 ~ 2 min。

！ 注意：乙醇残留会影响洗脱效果，所以干燥时要确保乙醇挥发完全，也需要避免过度干燥磁珠，造成 DNA 洗脱效率降低。

3.7 待磁珠干燥至磨砂面，加入 50 μ L Elution Buffer，涡旋混匀 10 sec，室温孵育 5 min。

3.8 将离心管瞬时离心后置于磁力架上静置 2 min，小心将上清转移至新的 1.5 mL 离心管中。

3.9 洗脱后的 DNA 可直接用于后续实验，或置于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

实验流程 2：仪器自动法操作步骤

本操作以奥盛 Auto-Pure 32A 全自动核酸提取仪提取为例，可同步完成 32 份样本的提取操作。

！ 注意：如使用其它品牌的全自动核酸提取仪，请结合本说明书操作步骤并咨询服务厂商。

1. 样本处理

请参考（实验流程 1）：手动法操作步骤中的“样本处理”方式进行实验。

2. 样本裂解与消化

请参考（实验流程 1）：手动法操作步骤中的“样本裂解与消化”方式进行实验。

3. 96 孔板加液准备

请参照下表，向 96 孔深孔板各孔位中加入相应试液：

样本孔位	1/7	2/8	3/9	4/10	5/11	6/12
试剂	异丙醇	FFPE Wash Buffer I	FFPE Wash Buffer II	/	Silic Beads B +Nuclease-Free Water	Elution Buffer
体积	200 μ L	800 μ L	800 μ L	/	20 μ L + 80 μ L	50 μ L

！ 注意：

- 每次吸取磁珠前请务必涡旋混匀；
- 为提高工作效率，建议使用多通道移液器；
- 试剂加板完毕请尽快上机，防止试剂挥发导致实验结果不稳定。

4. 上机提取

4.1 将消化完成的样本，12000 rpm 离心 3 min，吸取上清至 96 孔板第 1/7 列孔位中。

! 注意：请勿吸取离心管上层浑浊的蜡层，避免蜡层影响 DNA 的提取纯度。

4.2 将上样完毕的 96 孔深孔板置于奥盛 Auto-Pure 32A 型全自动核酸提取仪中，插入磁套棒，打开仪器操作软件，运行“石蜡样本 DNA 提取程序”。

“石蜡样本 DNA 提取程序”各参数设置如下，如果原程序不慎丢失，可自行设定程序。

步骤	孔位	名称	混合时间 (min)	吸磁时间 (sec)	等待时间 (min)	容 积 (μL)	混合速度 (1~10)	温 度 (°C)
1	5/11	磁珠转移	1.0	60	0.0	100	5	OFF
2	1/7	DNA 结合	10.0	60	0.0	650	5	OFF
3	2/8	清洗液 I	2.0	60	0.0	800	5	OFF
4	3/9	清洗液 II	2.0	60	2.0	800	5	OFF
5	6/12	洗脱	7.0	60	0.0	50	5	OFF
6	3/9	弃磁珠	1.0	0	0.0	800	5	OFF

5. 核酸转移

5.1 程序运行完毕，将 6/12 孔的 DNA 洗脱液转移至新的 1.5 mL 离心管中，丢弃 96 孔深孔板和磁套，提取完成。

5.2 洗脱后的 DNA 可直接用于后续实验，或置于 -20 °C 保存。

欣基（杭州）生物科技有限公司

WisGen BioSciences Co., Ltd

Add：浙江省杭州市钱塘区福城路 400 号 6 幢 8 层

Service：order@wisgen.cn Web：www.wisgen.cn

