

UPure FFPE DNA Kit (M2015)

石蜡组织 DNA 自动化提取操作流程

适配奥胜 Auto-Pure 32A

版本号: V15.01

实验前准备工作:

1. 自动化提取仪: 使用前可进行紫外消毒。
2. Buffer 检查: **Buffer LWA** 需避光保存。使用前请确定 **Buffer LWA** 或 **Buffer LS** 没有晶体析出, 若有晶体析出可 37°C 温浴使析出的晶体复溶。
3. **Buffer SPW** 制备: 首次开封使用时, 按照瓶身标签所示, 向 **Buffer SPW** 中加入无水乙醇并混匀。
4. 自备异丙醇: 实验过程中需使用异丙醇。
5. 提前打开金属浴或水浴锅, 设置 98°C 或 56°C。
6. 材料准备
 - A. 石蜡切片: 取 5-8 片石蜡组织切片, 每块切片的厚度在 5-10 μm 之间, 且表面积为 $1\times 1\text{ cm}^2$ 。
 - B. 石蜡块: 取约 30mg 的石蜡组织, 用无菌手术刀去除所选样本区外的多余石蜡块。
 - C. 固定在甲醛中的样本: 取约 30mg 的样本, 用手术刀将其切为数块, 然后将所取样本装入 1.5-2ml 的离心管中, 加入 400 μl PBS (10 mM, pH7.4), 12000rpm 离心 1min, 重复 3 次。

一、样本预处理

1. 裂解样本

Proteinase 法:

- (1) 将样本放入 1.5-2ml 的离心管中, 加入 300 μl **Buffer LS** 和 10 μl Proteinase K (20mg/ml, 货号: R1001, 用户自备), 然后涡旋使其完全混匀。
 - (2) 在 56°C 条件下孵育 2h (也可过夜孵育), 直到样品完全溶解为止。
 - (3) 在 90°C 条件下孵育 1h。
2. 立即将离心管在 12000rpm 转速下离心 10min。可观察到离心管中清晰地分为三层, 中间层包含目标 DNA, 上层含有石蜡和蛋白质, 下层则含有少量的组织沉淀。若没有观察到明显的分层现象可以增加离心时间。
- 小心地将中间层的液体转移至 96 孔深孔板内进行自动化处理。

二、自动化处理

1. 取 96 孔深孔板，按照下表加入样本和试剂至孔中，若为盒装试剂盒，以下试剂都需自行加入。
注意：每一孔的总体积不能超过 900μl，否则可能溢出。

表 1. 96 孔板设置

孔位	样本/试剂	体积 (μl)	预分装版试剂盒说明	说明
1/7 列	<i>Buffer LWA</i>	400	已分装, 无需用户自行加入	若有结晶, 需温浴使析出的晶体复溶后再使用。
	样本预处理液	300	需用户自行加入	—
	异丙醇	200	需用户自行加入	—
2/8 列	<i>Buffer WDT</i>	800	已分装, 无需用户自行加入	—
3/9 列	<i>Buffer SPW</i> (已加乙醇)	800	已分装, 无需用户自行加入	—
	<i>FFPE Beads</i>	20	若未分装, 需用户自行加入	注意: <i>FFPE Beads</i> 在使用前需涡旋混匀 1 min, 充分混匀磁珠, 以确保加入各实验管时无差异。
4/10 列	<i>Buffer SPW</i> (已加乙醇)	800	已分装, 无需用户自行加入	—
6/12 列	<i>Buffer TE</i>	65	已分装, 无需用户自行加入	洗脱体积可根据具体要求调整。 至少加入 35μl 的 <i>Buffer TE</i> 进行洗脱。

2. 启动仪器，在仪器中放置好新的洁净磁棒套（**切记更换新的磁棒套，否则会造成样本交叉污染**），并将装有样品和试剂的 96 孔板放到仪器中，与磁棒套相对应。
注意：切记放置磁棒套，否则溶液会腐蚀磁棒，影响仪器性能和后续实验。
3. 执行程序（表 2）。
4. 收集产物：取出 96 孔板和磁套，吸取第 6/12 列中的提取产物至干净的 EP 管中，检测后于-20℃或-80℃保存。

表 2. 提取程序（吸磁选项设置为“往复吸磁”）

孔位	步骤名称	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 (℃)	混合位置 (1-100%)	混合幅度 (1-100%)	吸磁位置 (1-100%)	吸磁速度 (1-10)
3	Collect	1	60	0	800	8	OFF	0	80	0	1
1	Binding	10	60	0	900	8	OFF	0	80	0	1
2	Wash 1	3	90	0	800	8	OFF	0	80	0	1
3	Wash 2	2	60	0	800	8	OFF	0	80	0	1
4	Wash 3	2	60	5	800	8	OFF	0	80	0	1
6	Elution	10	90	0	60-100	6	65	0	80	0	1
5	Release	1	0	0	800	8	OFF	0	80	0	1