



# 核酸提取或纯化试剂 说明书

## 【产品名称】

核酸提取或纯化试剂

## 【包装规格】

型号一：24次/盒；50次/盒；200次/盒

型号二：50次/盒

型号三：24次/盒；50次/盒；200次/盒

## 【预期用途】

用于核酸提取、富集、纯化步骤，其处理后的产物用于临床体外检测使用。

## 【检验原理】

本试剂盒专门优化的脱蜡剂，裂解液和蛋白酶K释放福尔马林固定或组织切片样本中的核酸；消化后的样品在较高的温度孵育后，去除核酸的福尔马林交联，有效提高核酸的产量和纯度；优化的缓冲系统使裂解液中的核酸可特异结合到吸附膜上，抑制剂通过两步漂洗步骤有效去除，最后使用低盐缓冲液或水洗脱，即可获得高纯度核酸。经过纯化的核酸可以直接用于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。

## 【主要组成成分】

型号一：

试剂名称	24次/盒		50次/盒		200次/盒	
	规格	数量	规格	数量	规格	数量
裂解缓冲液1	5 mL/瓶	1瓶	15 mL/瓶	1瓶	50 mL/瓶	1瓶
裂解缓冲液2	6 mL/瓶	1瓶	15 mL/瓶	1瓶	50 mL/瓶	1瓶
脱蜡剂	5 mL/瓶	1瓶	10 mL/瓶	1瓶	36 mL/瓶	1瓶
漂洗缓冲液1 (浓缩液)	6.5 mL/瓶	1瓶	13 mL/瓶	1瓶	52 mL/瓶	1瓶
漂洗缓冲液2 (浓缩液)	4.5 mL/瓶	1瓶	15 mL/瓶	1瓶	50 mL/瓶	1瓶
洗脱缓冲液	5 mL/瓶	1瓶	10 mL/瓶	1瓶	30 mL/瓶	1瓶
蛋白酶K	25 mg/支	1支	25 mg/支	2支	100 mg/支	2瓶
蛋白酶K保存液	1.25 mL/支	1支	1.25 mL/支	2支	5 mL/支	2支
吸附柱	24个/包	1包	50个/包	1包	50个/包	4包
收集管	24个/包	1包	50个/包	1包	50个/包	4包
RNA酶A	0.1 mL	1支	0.3 mL	1支	0.3 mL	2支

型号二：

试剂名称	50次/盒	
	规格	数量
DNA酶	1000 U/支	1支
10×DNA酶反应液	1 mL/支	1支
RNA酶A	0.3 mL/支	1支
裂解缓冲液1	30 mL/瓶	1瓶
裂解缓冲液2	30 mL/瓶	1瓶
漂洗缓冲液1 (浓缩液)	13 mL/瓶	1瓶
漂洗缓冲液2 (浓缩液)	15 mL/瓶	1瓶
漂洗缓冲液3	40 mL/瓶	1瓶
漂洗缓冲液4 (浓缩液)	11 mL/瓶	1瓶
洗脱缓冲液	25 mL/瓶	1瓶
脱蜡剂	30 mL/瓶	1瓶
蛋白酶K	25 mg/支	2支
蛋白酶K保存液	1.25 mL/支	2支
吸附柱RS	50个/包	1包
吸附柱DF	50个/包	1包
收集管	50个/包	2包

型号三:

试剂名称	24次/盒		50次/盒		200次/盒	
	规格	数量	规格	数量	规格	数量
裂解缓冲液1	5 mL/瓶	1瓶	15 mL/瓶	1瓶	50 mL/瓶	1瓶
裂解缓冲液2	6 mL/瓶	1瓶	15 mL/瓶	1瓶	50 mL/瓶	1瓶
脱蜡剂	5 mL/瓶	1瓶	10 mL/瓶	1瓶	36 mL/瓶	1瓶
漂洗缓冲液1 (浓缩液)	6.5 mL/瓶	1瓶	13 mL/瓶	1瓶	52 mL/瓶	1瓶
漂洗缓冲液2 (浓缩液)	4.5 mL/瓶	1瓶	15 mL/瓶	1瓶	50 mL/瓶	1瓶
洗脱缓冲液	5 mL/瓶	1瓶	10 mL/瓶	1瓶	30 mL/瓶	1瓶
蛋白酶K	12.5 mg/支	1支	25 mg/支	1支	100 mg/支	1瓶
蛋白酶K保存液	1.25 mL/支	1支	1.25 mL/支	1支	5 mL/支	1支
吸附柱DS	24个/包	1包	50个/包	1包	50个/包	4包
收集管	24个/包	1包	50个/包	1包	50个/包	4包

需要实验者自行准备的试剂：无水乙醇（分析纯），10mM磷酸盐缓冲液（PH7.4），二甲苯（可选）。

### 【储存条件及有效期】

型号一：吸附柱2-8℃保存，其余组分0-35℃保存，有效期12个月。可在0-40℃运输，运输时间建议不超过7天。

型号二：DNA酶和10×DNA酶反应液-20℃保存，吸附柱2-8℃保存，其余组分0-35℃保存，有效期12个月。可在0-40℃运输，运输时间建议不超过7天。

型号三：0-35℃保存，有效期12个月。可在0-40℃运输，运输时间建议不超过7天。

### 【样本要求】

1. 适用样本类型：福尔马林固定、石蜡包埋组织。
2. 样本处理与保存：常温处理保存。
3. 样本运输：常温运输。

### 【检验方法】

#### 型号一

#### 实验前准备

向蛋白酶K中加入指定用量的蛋白酶K保存液使其溶解，-20℃保存。

	24次/盒	50次/盒	200次/盒
蛋白酶K保存液	加入1.25 mL	加入1.25 mL	加入5 mL

## 一、使用脱蜡剂处理样本

### 1. 石蜡包埋样本

1.1 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。

1.2 取约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 脱蜡剂，涡旋震荡10秒，再加入180 μL裂解缓冲液1和20 μL蛋白酶K，涡旋震荡10秒。12000 rpm，25°C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) 脱蜡剂低于18°C会凝固，如果凝固不影响下面的实验。

1.3 56°C孵育1小时，直至样品完全溶解。90°C孵育1小时。12,000 rpm，25°C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，尽量避免吸入管底沉淀和上层蜡液。

**注意：**1) 56°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°C后再把样品置于90°C孵育。

2) 可选步骤：加入7 μL UNG (1U/μL)，50°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试剂盒并未提供，如果需要可单独向本公司订购，货号：CW0951S。

1.4 可选步骤：如需除去RNA，可将样品温度降到室温后，加入2 μL 浓度为100 mg/mL的RNA酶A溶液，震荡混匀，室温放置2分钟。

1.5 加入20μL 蛋白酶 K，65°C，450 rpm孵育15 min。

1.6 加入200 μL裂解缓冲液2，涡旋震荡混匀后加入200 μL无水乙醇，涡旋震荡彻底混匀。短暂离心，使管壁上的溶液收集到管底。

**注意：**1) 加入裂解缓冲液2和无水乙醇后要立即充分混匀。

2) 加入裂解缓冲液2和无水乙醇后可能会产生白色沉淀，不会影响后续实验。

3) 如果需要对多个样本进行操作，可以将裂解缓冲液2和无水乙醇事先混匀后加样。

1.7 将步骤1.6所得溶液全部加入已装入收集管的吸附柱中，若一次不能加完溶液，可分多次转入。12,000 rpm离心2分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

1.8 向吸附柱中加入500 μL漂洗缓冲液1（使用前检查是否已加入无水乙醇），12000 rpm离心1分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

1.9 向吸附柱中加入500 μL漂洗缓冲液2（使用前检查是否已加入无水乙醇），12000 rpm离心1分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

**注意：**如需进一步提高DNA纯度，可重复步骤1.9。

1.10 12,000 rpm离心2分钟，倒掉收集管中废液。将吸附柱置于室温数分钟以彻底晾干。

**注意：**这一步目的是将吸附柱中残余乙醇去除，乙醇残留会影响后续酶促反应。

1.11 将吸附柱置于一个新的1.5 mL收集管中，向吸附柱的中间部位悬空加入20-100 μL洗脱缓冲液，室温放置2-5分钟，12,000 rpm离心1分钟，收集DNA溶液，-20°C保存DNA。

**注意：**如果要提高DNA的终浓度，可以将步骤1.10所得的DNA洗脱液重新加至吸附膜上，室温放置2分钟，12,000 rpm离心1分钟。

## 2. 福尔马林等固定液中的样本

- 2.1 取约20 mg的样本，切成小块，置于离心管（自备）中，加入500  $\mu\text{L}$  10 mM 磷酸盐缓冲液（PH7.4），涡旋振荡，12,000 rpm（ $\sim 13,400\times g$ ）离心1分钟，弃上清，重复3次。
- 2.2 向上述管中加入180  $\mu\text{L}$  裂解缓冲液1，20  $\mu\text{L}$  蛋白酶K，涡旋震荡混匀。
- 2.3 56 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1小时，直至样本完全溶解。90 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1小时。12,000 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，尽量避免吸入管底沉淀和上层蜡液。  
**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试剂盒并未提供，如果需要可单独向本公司订购，货号：CW0951S。
- 2.4 可选步骤：如需除去RNA，可将样品温度降到室温后，加入2  $\mu\text{L}$  浓度为100 mg/mL的RNA酶A溶液，震荡混匀，室温放置2分钟。
- 2.5 加入20  $\mu\text{L}$  蛋白酶K，65 $^{\circ}\text{C}$ ，450 rpm孵育15 min。
- 2.6 加入200  $\mu\text{L}$ 裂解缓冲液2，涡旋震荡混匀后加入200  $\mu\text{L}$ 无水乙醇，涡旋震荡彻底混匀。短暂离心，使管壁上的溶液收集到管底。  
**注意：**1) 加入裂解缓冲液2和无水乙醇后要立即充分混匀。  
2) 加入裂解缓冲液2和无水乙醇后可能会产生白色沉淀，不会影响后续实验。  
3) 如果需要对多个样本进行操作，可以将裂解缓冲液2和无水乙醇事先混匀后加样。
- 2.7 将步骤2.6所得溶液全部加入已装入收集管的吸附柱中，若一次不能加完溶液，可分多次转入。12,000 rpm离心2分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。
- 2.8 向吸附柱中加入500  $\mu\text{L}$ 漂洗缓冲液1（使用前检查是否已加入无水乙醇），12,000 rpm离心1分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。
- 2.9 向吸附柱中加入500  $\mu\text{L}$ 漂洗缓冲液2（使用前检查是否已加入无水乙醇），12,000 rpm离心1分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。  
**注意：**如需进一步提高DNA纯度，可重复步骤2.9。
- 2.10 12,000 rpm离心2分钟，倒掉收集管中废液。将吸附柱置于室温数分钟以彻底晾干。  
**注意：**这一步目的是将吸附柱中残余乙醇去除，乙醇残留会影响后续酶促反应。
- 2.11 将吸附柱置于一个新的1.5 mL收集管中，向吸附柱的中间部位悬空加入20-100  $\mu\text{L}$ 洗脱缓冲液，室温放置2-5分钟，12,000 rpm离心1分钟，收集DNA溶液，-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存DNA。  
**注意：**如果要提高DNA的终浓度，可以将步骤2.10所得的DNA洗脱液重新加至吸附膜上，室温放置2分钟，12,000 rpm离心1分钟。

## 二、使用二甲苯处理样本

### 1. 样本处理:

- 1.1 石蜡包埋样本: 用手术刀将组织块中多余的石蜡修剪掉, 露出组织。
- 1.2 福尔马林等固定液中的样本: 取约20 mg的样本, 切成小块, 置于离心管中, 加入500  $\mu$ L 10mM PBS (PH7.4), 涡旋振荡, 12,000 rpm ( $\sim$  13,400 $\times$ g) 离心1分钟, 重复3次, 可直接进行第7步操作。
2. 将组织块切成5-10  $\mu$ m的薄片。  
**注意: 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。**
3. 取约1 $\times$ 1 cm<sup>2</sup>的切片 (共约4-5片切片) 置于离心管 (自备) 中, 加入1 mL二甲苯, 盖紧管盖, 涡旋震荡10秒。
4. 12,000 rpm离心2分钟, 小心吸弃上清, 注意不要吸弃沉淀。
5. 加入1 mL无水乙醇, 涡旋震荡混匀。12,000 rpm离心2分钟, 弃上清, 注意不要吸弃沉淀。  
**注意: 乙醇可以除去样品中残余的二甲苯。**
6. 打开管盖, 室温或最高至37 $^{\circ}$ C孵育10分钟, 直至无乙醇残留。
7. 加入180  $\mu$ L裂解缓冲液1, 重悬沉淀; 加入20  $\mu$ L蛋白酶K溶液, 涡旋震荡混匀。
8. 56 $^{\circ}$ C孵育1小时, 直至样品完全溶解。90 $^{\circ}$ C孵育1小时。12,000 rpm离心1分钟, 用移液器沿管壁小心吸取下层水相 (约180 $\mu$ L) 于新离心管中, 尽量避免吸入管底沉淀和上层蜡液。  
**注意: 1) 56 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C后再把样品置于90 $^{\circ}$ C孵育。  
2) 可选步骤: 加入7  $\mu$ L UNG (1U/ $\mu$ L), 50 $^{\circ}$ 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。**
9. 可选步骤: 如需除去RNA, 可将样品温度降到室温后, 加入2  $\mu$ L 浓度为100 mg/mL的RNA酶 A 溶液, 震荡混匀, 室温放置2分钟。
10. 加入20  $\mu$ L 蛋白酶 K, 65 $^{\circ}$ C, 450rpm孵育15 min 。
11. 加入200  $\mu$ L 裂解缓冲液2, 涡旋震荡彻底混匀。加入200  $\mu$ L无水乙醇, 涡旋震荡彻底混匀。短暂离心, 使管壁上的溶液收集到管底。  
**注意: 1) 加入裂解缓冲液2和无水乙醇后要立即充分混匀。  
2) 如果需要多个样品进行操作, 可以将裂解缓冲液2和无水乙醇事先混匀后加样。**
12. 将步骤11所得溶液全部加入已装入收集管的吸附柱中, 若一次不能加完溶液, 可分多次转入。12,000 rpm离心2分钟, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。
13. 向吸附柱中加入500  $\mu$ L 漂洗缓冲液1 (使用前检查是否已加入无水乙醇), 12,000 rpm离心1分钟, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。
14. 向吸附柱中加入500  $\mu$ L 漂洗缓冲液2 (使用前检查是否已加入无水乙醇), 12,000 rpm离心1分钟, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。
15. 12,000 rpm离心2分钟, 倒掉收集管中废液。将吸附柱置于室温数分钟以彻底晾干。  
**注意: 这一步目的是将吸附柱中残余乙醇去除, 乙醇残留会影响后续酶促反应 (酶切、PCR等)。**

16. 将吸附柱置于一个新的离心管（自备）中，向吸附柱的中间部位悬空加入20-100  $\mu\text{L}$ 洗脱缓冲液或灭菌水，室温放置2-5分钟，12,000 rpm离心1分钟，收集DNA溶液， $-20^{\circ}\text{C}$ 保存DNA。

注意：1) 如果下游实验对pH值或EDTA敏感，可以用灭菌水洗脱。洗脱液的pH值对洗脱效率有很大影响，若用水做洗脱液应保证其pH值在7.0-8.5（可以用氢氧化钠将水的pH值调到此范围），pH值低于7.0时洗脱效率不高。

2) 离心之前室温孵育5分钟可以增加产量。

3) 用另外的20-100 $\mu\text{L}$ 洗脱缓冲液或灭菌水再次洗脱可以增加产量。

4) 如果要提高DNA的终浓度，可以将步骤14所得的DNA洗脱液重新加至吸附膜上，重复步骤14；若洗脱体积小于100  $\mu\text{L}$ ，可以增加DNA的终浓度，但可能会减少总产量。如果DNA的量小于1  $\mu\text{g}$ ，推荐用20  $\mu\text{L}$ 洗脱缓冲液或灭菌水洗脱。

5) 因为保存在水中的DNA会受到酸性水解作用的影响，如需长期保存，推荐用洗脱缓冲液洗脱并于 $-20^{\circ}\text{C}$ 保存。

## 型号二

### 实验前准备

向25 mg的蛋白酶K中加入加入1.25 mL的蛋白酶K保存液使其溶解， $-20^{\circ}\text{C}$ 保存。

1. 将组织块多余的石蜡修剪掉，露出组织后切成5-10  $\mu\text{m}$ 的薄片。

2. 取约 $1\times 1\text{ cm}^2$ 的切片（共约1-5片切片）置于离心管（自备）中，加入500  $\mu\text{L}$ 脱蜡液，涡旋震荡10秒。短暂离心将样本收集到管底。 $56^{\circ}\text{C}$ 孵育3分钟，水浴锅中取出后静置，降至室温后进行下一步操作。

注意：如果样品表面暴露在空气中，最初的2-3片弃掉不用。

3. 12,000 rpm离心2分钟，小心彻底吸弃上清液，不要吸到沉淀。可用小枪头（10  $\mu\text{L}$ ）小心去除残留的脱蜡液。

4. 上述管中加入180  $\mu\text{L}$ 裂解缓冲液1和20  $\mu\text{L}$ 蛋白酶K，涡旋震荡混匀。

5.  $56^{\circ}\text{C}$ 孵育15分钟，然后冰上放置3分钟。室温，12,000 rpm离心15分钟。

6. 转移上清液至新的1.5 mL离心管用于RNA提取，注意不要吸到未消化组织。将沉淀用于DNA提取。

### RNA提取

7. 把第6步得到的上清液， $80^{\circ}\text{C}$ 孵育15分钟。

8. 加入320  $\mu\text{L}$ 裂解缓冲液2，涡旋震荡混匀后加入720  $\mu\text{L}$ 无水乙醇，立即涡旋震荡混匀。

9. 所得的溶液全部加入到已装入收集管的吸附柱RS中，一次不能加完溶液，可分多次转入。12,000 rpm离心1分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

注意：若吸附柱堵塞，可能是样本量过多，应考虑将起始切片数量减少为1-2片。

可选步骤：若需去除基因组DNA，可按照以下步骤进行

- a. 向吸附柱中加入350  $\mu\text{L}$  漂洗缓冲液3，12,000 rpm离心1分钟，弃废液，将吸附柱重新放回收集管中。
  - b. 配制DNase I 混合液：取52  $\mu\text{L}$  灭菌水，向其中加入8  $\mu\text{L}$  10 $\times$ DNA酶反应液和20  $\mu\text{L}$  DNA酶（1 U/ $\mu\text{L}$ ），混匀，配制成终体积为80  $\mu\text{L}$  的反应液。
  - c. 向吸附柱中直接加入80  $\mu\text{L}$  DNA酶混合液，20–30 $^{\circ}\text{C}$ 孵育15分钟。
  - d. 向吸附柱中加入350  $\mu\text{L}$  漂洗缓冲液3，12,000 rpm离心1分钟，弃废液，将吸附柱重新放回收集管中。
10. 向吸附柱中加入500  $\mu\text{L}$  漂洗缓冲液4（使用前检查是否已加入无水乙醇），12,000 rpm离心1分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。
  11. 重复步骤10。再12,000 rpm离心2分钟，倒掉收集管中废液。将吸附柱置于室温5分钟以彻底晾干。
  12. 将吸附柱置于一个新的收集管中，向吸附柱的中间部位悬空加入20–50  $\mu\text{L}$  洗脱缓冲液，室温放置5分钟，12,000 rpm离心1分钟，收集RNA溶液，–80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

## DNA提取

7. 取第6步获得的沉淀，加入180  $\mu\text{L}$  裂解缓冲液1和20  $\mu\text{L}$  蛋白酶 K至沉淀中。涡旋15秒重悬沉淀。
8. 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。

可选步骤：

如需除去RNA，可将样品温度降到室温后，加入2  $\mu\text{L}$  浓度为100 mg/mL 的RNA酶 A溶液，震荡混匀，室温放置2分钟。

9. 加入200  $\mu\text{L}$  裂解缓冲液2，涡旋震荡混匀后加入200  $\mu\text{L}$  无水乙醇，涡旋震荡彻底混匀。短暂离心，使管壁上的溶液收集到管底。
10. 将步骤9所得溶液全部加入已装入收集管的吸附柱DF中，一次不能加完溶液，可分多次转入。12,000 rpm离心1分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。  
**注意：若吸附柱堵塞，可能是样本量过多，应考虑将起始切片数量减少为1–2片。**
11. 向吸附柱中加入500  $\mu\text{L}$  漂洗缓冲液1（使用前检查是否已加入无水乙醇），12,000 rpm离心1分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。
12. 向吸附柱中加入500  $\mu\text{L}$  漂洗缓冲液2（使用前检查是否已加入无水乙醇），12,000 rpm离心1分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。  
**注意：如需进一步提高纯度，可重复步骤12。**
13. 12,000 rpm离心2分钟，倒掉收集管中废液。将吸附柱置于室温5分钟以彻底晾干。  
**注意：这一步目的是将吸附柱中残余乙醇去除，乙醇残留会影响后续酶促反应。**
14. 将吸附柱置于一个新的1.5 mL离心管中，向吸附柱的中间部位悬空加入20–50  $\mu\text{L}$  洗脱缓冲液，室温放置5分钟，12,000 rpm离心1分钟，收集DNA溶液，–20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。



## 型号三

### 实验前准备

向蛋白酶K中加入指定用量的蛋白酶K保存液使其溶解，-20℃保存。

	24次/盒	50次/盒	200次/盒
蛋白酶K保存液	加入0.625 mL	加入1.25 mL	加入5 mL

### 一、使用脱蜡剂处理样本

#### 1. 石蜡包埋样本

1.1 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。

1.2 取约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 脱蜡剂，涡旋震荡10秒。短暂离心将样本收集到管底。56℃孵育3分钟，水浴锅中取出后静置，降至室温后进行下一步操作。

**注意：**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。

1.3 上述管中加入180 μL裂解缓冲液1，涡旋震荡混匀，12,000 rpm离心1分钟，溶液分为两层。取20 μL 蛋白酶K加入到下层溶液中，移液器小心吹吸混匀。

1.4 56℃孵育1小时，直至样品完全溶解。90℃孵育1小时。12,000 rpm离心1分钟，使用200 μL枪头沿管壁小心吸取下层的水相于新的离心管（自备）中。

**注意：**1) 此步骤的目的是修复由甲醛变性的核酸，孵育的温度过高或时间过长可能造成DNA断裂，产生DNA碎片。

2) 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。

3) 如需除去RNA，可将样品温度降到室温后，加入2 μl浓度为100 mg/mL 的RNA酶A溶液，震荡混匀，室温放置2分钟。

1.5 加入200 μL裂解缓冲液2，涡旋震荡混匀后加入200 μL无水乙醇，涡旋震荡彻底混匀。短暂离心，使管壁上的溶液收集到管底。

**注意：**1) 加入裂解缓冲液2和无水乙醇后要立即充分混匀。

2) 加入裂解缓冲液2和无水乙醇后可能会产生白色沉淀，不会影响后续实验。

3) 如果需要对多个样本进行操作，可以将裂解缓冲液2和无水乙醇事先混匀后加样。

1.6 将步骤1.5所得溶液全部加入已装入收集管的吸附柱中，若一次不能加完溶液，可分多次转入。12,000 rpm离心2分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

1.7 向吸附柱中加入500 μL 漂洗缓冲液1（使用前检查是否已加入无水乙醇），12000rpm 离心1分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

1.8 向吸附柱中加入500 μL 漂洗缓冲液2（使用前检查是否已加入无水乙醇），12000rpm 离心1分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

**注意：**如需进一步提高DNA纯度，可重复步骤1.8。

1.9 12,000 rpm离心2分钟，倒掉收集管中废液。将吸附柱置于室温数分钟以彻底晾干。

**注意：**这一步目的是将吸附柱中残余乙醇去除，乙醇残留会影响后续酶促反应。

1.10 将吸附柱置于一个新的1.5 mL收集管中，向吸附柱的中间部位悬空加入20-100  $\mu$ L洗脱缓冲液，室温放置2-5分钟，12,000 rpm离心1分钟，收集DNA溶液，-20 $^{\circ}$ C保存DNA。

**注意：如果要提高DNA的终浓度，可以将步骤1.10所得的DNA洗脱液重新加至吸附膜上，室温放置2分钟，12,000 rpm离心1分钟。**

## 2. 福尔马林等固定液中的样本

2.1 取约20 mg的样本，切成小块，置于离心管（自备）中，加入500  $\mu$ L 10 mM 磷酸盐缓冲液（PH7.4），涡旋振荡，12,000 rpm（ $\sim$ 13,400 $\times$ g）离心1分钟，弃上清，重复3次。

2.2 向上述管中加入180  $\mu$ L 裂解缓冲液1，20  $\mu$ L 蛋白酶K，涡旋震荡混匀。

2.3 56 $^{\circ}$ C孵育1小时，直至样本完全溶解。90 $^{\circ}$ C孵育1小时。

**注意：1）此步骤的目的是修复由甲醛变性的核酸，孵育的温度过高或时间过长可能造成DNA断裂，产生DNA碎片。**

**2）56 $^{\circ}$ C孵育后的样本可置于室温，直至水浴锅或干浴锅温度达到90 $^{\circ}$ C后再把样本置于90 $^{\circ}$ C孵育。**

2.4 12,000 rpm离心1分钟，使用200  $\mu$ L枪头沿管壁小心吸取上清到新的离心管（自备）中。

**注意：如需除去RNA，可将样品温度降到室温后，加入2  $\mu$ L浓度为100 mg/mL的RNA酶A溶液，震荡混匀，室温放置2分钟。**

2.5 加入200  $\mu$ L裂解缓冲液2，涡旋震荡混匀后加入200  $\mu$ L无水乙醇，涡旋震荡彻底混匀。短暂离心，使管壁上的溶液收集到管底。

**注意：1）加入裂解缓冲液2和无水乙醇后要立即充分混匀。**

**2）加入裂解缓冲液2和无水乙醇后可能会产生白色沉淀，不会影响后续实验。**

**3）如果需要多个样本进行操作，可以将裂解缓冲液2和无水乙醇事先混匀后加样。**

2.6 将步骤2.5所得溶液全部加入已装入收集管的吸附柱中，若一次不能加完溶液，可分多次转入。12,000 rpm离心2分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

2.7 向吸附柱中加入500  $\mu$ L 漂洗缓冲液1（使用前检查是否已加入无水乙醇），12,000rpm离心1分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

2.8 向吸附柱中加入500  $\mu$ L 漂洗缓冲液2（使用前检查是否已加入无水乙醇），12,000 rpm离心1分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

**注意：如需进一步提高DNA纯度，可重复步骤2.8。**

2.9 12,000 rpm离心2分钟，倒掉收集管中废液。将吸附柱置于室温数分钟以彻底晾干。

**注意：这一步目的是将吸附柱中残余乙醇去除，乙醇残留会影响后续酶促反应。**

2.10 将吸附柱置于一个新的1.5 mL收集管中，向吸附柱的中间部位悬空加入20-100  $\mu$ L 洗脱缓冲液，室温放置2-5分钟，12,000 rpm离心1分钟，收集DNA溶液，-20 $^{\circ}$ C保存DNA。

**注意：如果要提高DNA的终浓度，可以将步骤2.10所得的DNA洗脱液重新加至吸附膜上，室温放置2分钟，12,000 rpm离心1分钟。**

## 二、使用二甲苯处理样本

### 1. 样本处理：

1.1 石蜡包埋样本：用手术刀将组织块中多余的石蜡修剪掉，露出组织。

1.2 福尔马林等固定液中的样本：取约20 mg的样本，切成小块，置于离心管中，加入500  $\mu$ L 10mM PBS（PH7.4），涡旋振荡，12,000 rpm（ $\sim$ 13,400 $\times$ g）离心1分钟，重复3次，可直接进行第7步操作。

2. 将组织块切成5-10 μm的薄片。

**注意：**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。

3. 取约1×1 cm<sup>2</sup>的切片（共约4-5片切片）置于离心管（自备）中，加入1 mL二甲苯，盖紧管盖，涡旋震荡10秒。

4. 12,000 rpm离心2分钟，小心吸弃上清，注意不要吸弃沉淀。

5. 加入1 mL无水乙醇，涡旋震荡混匀。12,000 rpm离心2分钟，弃上清，注意不要吸弃沉淀。

**注意：**乙醇可以除去样品中残余的二甲苯。

6. 打开管盖，室温或最高至37°C孵育10分钟，直至无乙醇残留。

7. 加入180 μL裂解缓冲液1，重悬沉淀；加入20 μL蛋白酶K溶液，涡旋震荡混匀。

8. 56°C孵育1小时，直至样品完全溶解。90°C孵育1小时。短暂离心，使管壁上的溶液收集到管底。

**注意：**1) 此步骤的目的是修复由甲醛变性的核酸，孵育的温度过高或时间过长可能造成DNA断裂，产生DNA碎片。

2) 56°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°C后再把样品置于90°C孵育。

3) 如需除去RNA，可将样品温度降到室温后，加入2 μL浓度为100 mg/mL 的RNA酶A溶液，震荡混匀，室温放置2分钟。

9. 加入200 μL裂解缓冲液2，涡旋震荡彻底混匀。加入200 μL无水乙醇，涡旋震荡彻底混匀。短暂离心，使管壁上的溶液收集到管底。

**注意：**1) 加入裂解缓冲液2和无水乙醇后要立即充分混匀。

2) 如果需要对多个样品进行操作，可以将裂解缓冲液2和无水乙醇事先混匀后加样。

10. 将步骤9所得溶液全部加入已装入收集管的吸附柱中，若一次不能加完溶液，可分多次转入。12,000 rpm离心2分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

11. 向吸附柱中加入500 μL 漂洗缓冲液1（使用前检查是否已加入无水乙醇），12,000rpm离心1分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

12. 向吸附柱中加入500 μL漂洗缓冲液2（使用前检查是否已加入无水乙醇），12,000rpm离心1分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

13. 12,000 rpm离心2分钟，倒掉收集管中废液。将吸附柱置于室温数分钟以彻底晾干。

**注意：**这一步目的是将吸附柱中残余乙醇去除，乙醇残留会影响后续酶促反应（酶切、PCR等）。

14. 将吸附柱置于一个新的离心管（自备）中，向吸附柱的中间部位悬空加入20-100 μL 洗脱缓冲液或灭菌水，室温放置2-5分钟，12,000 rpm离心1分钟，收集DNA溶液，-20°C保存DNA。

**注意：**1) 如果下游实验对pH值或EDTA敏感，可以用灭菌水洗脱。洗脱液的pH值对洗脱效率有很大影响，若用水做洗脱液应保证其pH值在7.0-8.5（可以用氢氧化钠将水的pH值调到此范围），pH值低于7.0时洗脱效率不高。

2) 离心之前室温孵育5分钟可以增加产量。

3) 用另外的20-100 μL 洗脱缓冲液或灭菌水再次洗脱可以增加产量。

4) 如果要提高DNA的终浓度，可以将步骤14所得的DNA洗脱液重新加至吸附膜上，重复步骤14；若洗脱体积小于100 μL，可以增加DNA的终浓度，但可能会减少总产量。如果DNA的量小于1μg，推荐用20 μL洗脱缓冲液或灭菌水洗脱。

5) 因为保存在水中的DNA会受到酸性水解作用的影响，如需长期保存，推荐用洗脱缓冲液洗脱并于-20°C保存。

## 【注意事项】

1. 在试验前，应仔细阅读本说明书。
2. 配制好的蛋白酶K溶液勿长时间室温放置，避免反复冻融，以免影响其活性。
3. 第一次使用前应按试剂瓶标签的说明在漂洗缓冲液1（浓缩液）、漂洗缓冲液2（浓缩液）和漂洗缓冲液4（浓缩液）中加入无水乙醇。
4. 使用前请检查裂解缓冲液1、裂解缓冲液2和脱蜡剂是否出现结晶或者沉淀，如有结晶或者沉淀，请将裂解缓冲液1、裂解缓冲液2和脱蜡剂于56°C水浴重新溶解。