

Code No. 9104

研究用

TaKaRa

TaKaRa DEXPAT™ Easy

(DNA Extraction from Paraffin-embedded Tissue Easy)

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 保存	1
● Kit 以外必备试剂和仪器	1
● 用途	1
● 操作方法	1
● 使用注意	4
● Q&A	4
● 实验例	5
● 参考文献	8
● 关联产品	8

● 制品说明

TaKaRa DEXPAT Easy是从福尔马林固定的石蜡包埋组织切片中提取PCR扩增用DNA模板的专用试剂。使用本试剂可以从石蜡包埋组织中简便、快速提取PCR扩增用DNA。本试剂是特别的表面活性剂与吸附PCR有害物质树脂的混合制剂。DEXPAT已分装至1.5 ml Microtube中，直接加入福尔马林固定的石蜡包埋组织切片后，100℃加热处理、4℃离心，冰上冷却5分钟后即可获得PCR扩增用DNA，整体操作仅需30分钟。经过热处理后冷却离心，在吸附树脂层上部形成一层胶状物，使水层和吸附树脂层完全分开，避免由于DNA回收液中混入吸附树脂而影响PCR的扩增。

利用TaKaRa DEXPAT Easy从福尔马林固定的石蜡包埋组织切片中提取DNA时，本试剂具有以下特点：

1. 无需脱蜡处理。
2. 操作简便快速，整体操作只需30分钟。
3. 可以获得PCR扩增用DNA，适合于400 bp以下DNA片段的扩增。
4. 使用安全，无需使用有害溶剂。
5. 可以对限定的部位进行提取，提高样品解析准确度。
6. DNA溶液和吸附树脂层完全分离，有利于DNA水溶液的回收。

本试剂在保持原有的TaKaRa DEXPAT (Code No. 9091) 性能基础上进行了以下改良：

- ① 已分装到Microtube中。
- ② DNA水溶液与吸附树脂层完全分离，有利于DNA水溶液的回收。

Note: 组织切片经固定、包埋等处理后很可能造成DNA的分解，因此提取的DNA不太可能进行400 bp以上DNA片段的PCR扩增。使用本试剂提取的DNA质量与石蜡包埋组织的状况有关。

本产品适用于哺乳动物包埋切片DNA提取，不适用于细菌或真菌的DNA提取。

● 制品内容

TaKaRa DEXPAT Easy

500 μ l \times 50

● Kit 以外必备试剂和仪器

- 微量移液枪
- 微量（冷冻）离心机（17,000 g）
17,000 g^* 1 最佳，以 $\geq 15,000g^*2$ 的转速离心也可，但此时DNA产量低于17,000 g 离心时的DNA产量。
请参考手册选择合适转速。
 $*1$ 17,000 g : 大约13,500 rpm，转子半径9 cm
 $*2$ 15,000 g : 大约12,500 rpm，转子半径9 cm
- Block heater (100℃)
- Microtube (DNA溶液回收用)
- 塑料手套

● 保存： 4℃。

● 用途： 从福尔马林固定石蜡包埋（FFPE）组织提取DNA作为PCR模板

● 操作方法

I. 从石蜡包埋组织中提取DNA的方法

1. 将石蜡包埋组织切成5 μ m (4~10 μ m) 厚后，用灭菌小镊子将1~3枚切片放入装有TaKaRa DEXPAT Easy的1.5 ml Microtube中。
 - 包埋组织至少需要6 mm \times 6 mm大小，厚度4~10 μ m。

- 为防止 DNA 的污染，请在操作过程中佩戴手套。
 - 请将切片机用过氧化氢消毒剂消毒，再用酒精擦洗。
 - 切刀和小镊子等也要进行同样操作，然后使用 UV 照射 10 分钟以上，避免交叉污染残留 DNA。
- 盖上 Microtube 盖，100°C 加热 10 分钟，加热约 5 分钟后，将 Microtube 轻轻上下颠倒 2~3 次，充分混匀。
 - 使用 Block heater 非常方便。
 - 1.5 ml Microtube 很热，注意不要烫伤。
 - 加热后立即进行 17,000 g、4°C 离心 10 分钟，离心后的 Microtube 中将呈图 1 状态。
 - 离心后的 Microtube 立即转移到冰上静置 5 分钟。
 - 用移液枪吸取水层，避免吸到石蜡膜（见图 2）。吸取水层时，能看到吸附树脂上面的胶状物，吸取胶状物上面的水层。
 - 吸取的水层可以直接用作 PCR 反应的模板。
 - 使用 *TaKaRa Ex Taq*[®] 等普通 PCR 酶时，DNA 溶液加入量不能超过 PCR 反应总体积的 1/10（50 μl PCR 反应体系中一般加入 5 μl）。
 - PrimeSTAR[®] GXL DNA Polymerase 具有很好的抗阻害物能力，可提高 PCR 反应性能。在这种情况下，DNA 溶液体积不应超过 PCR 反应体系的 1/10。
 - 使用对阻碍剂有很强耐性的 MightyAmp[™] DNA Polymerase 进行 PCR 反应时 DNA 的加入量为 PCR 反应总体积的 4/10（50 μl PCR 反应体系中加入 20 μl）也可得到良好的扩增。

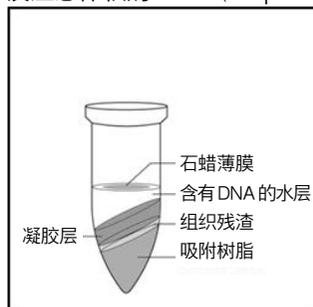


图 1

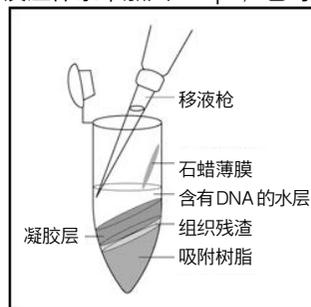
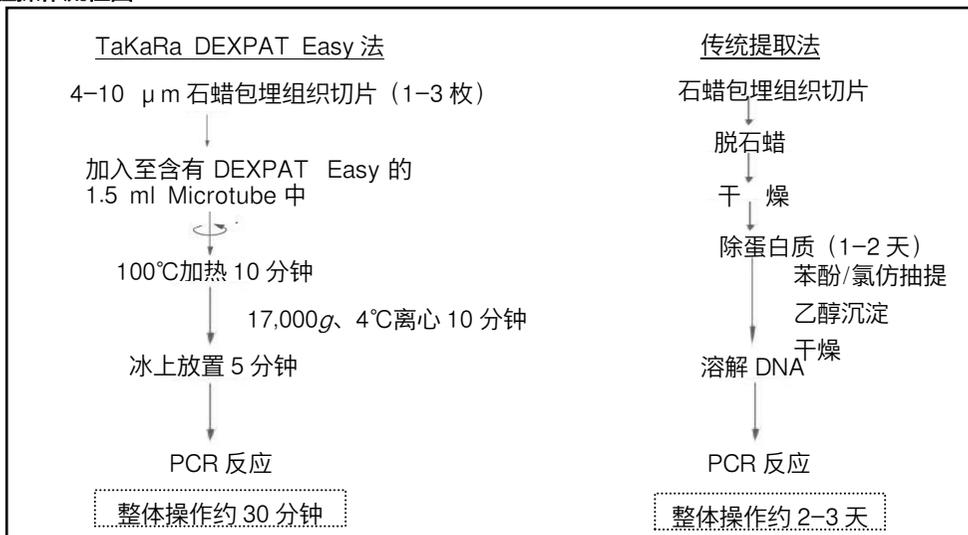


图 2

实验操作流程

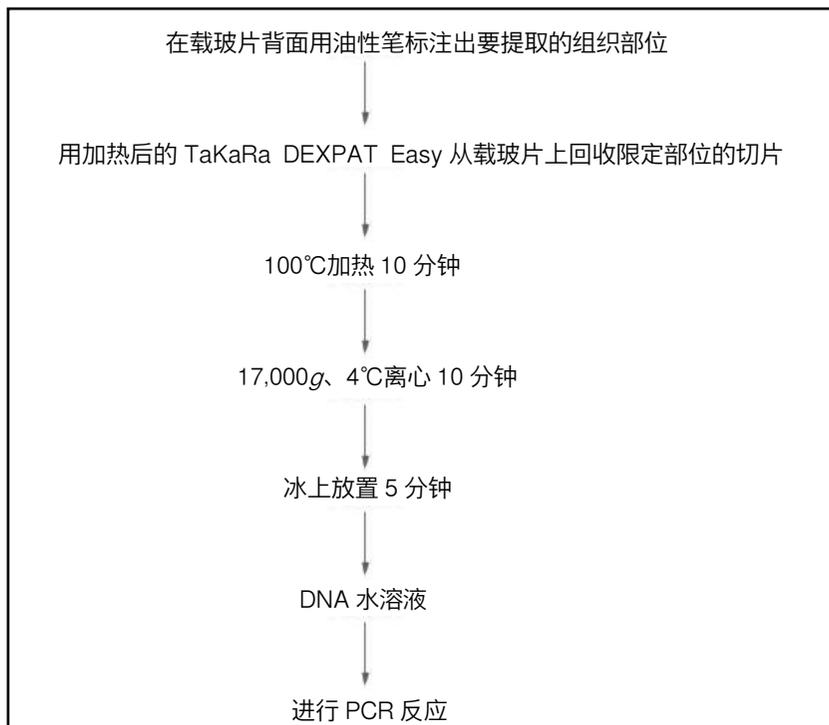


II. 限定部位的 DNA 提取法

限定部位 DNA 提取法是指从固定在载玻片上的石蜡包埋组织切片的某一特定部位来提取 DNA。

1. 在石蜡包埋组织切片待取部位的载玻片背面用油性笔做标记。
2. 将装有 TaKaRa DEXPAT Easy 的 1.5 ml Microtube 在 100°C 加热 1 分钟。
 - 使用 Block heater 非常方便。
 - 1.5 ml Microtube 很热，注意不要烫伤。
3. 用 1 ml 微量移液枪吸取少量 TaKaRa DEXPAT Easy 水层加在标记好组织部位的载玻片上，用枪头将切片和 TaKaRa DEXPAT Easy 全部回收到 1.5 ml Microtube 中。
NOTE: 不要刮取标记以外的组织，在同一载玻片上取病变部位和正常部位时，先取病变部位，再取正常部位。
4. 盖上 Microtube 盖，100°C 加热 10 分钟，加热约 5 分钟后，把 Microtube 轻轻上下颠倒 2~3 次，充分混匀。
 - Microtube 很热，注意不要烫伤。
5. 加热后立即放入预冷的离心机中进行 17,000 g、4°C 离心 10 分钟。
6. 将 1.5 ml Microtube 转移到冰上静置 5 分钟。
7. 用移液枪吸取水层，避免吸到石蜡膜（见 P2 图 2）。吸取水层时，能看到吸附树脂上面的胶状物，吸取胶状物上面的水层。
 - 吸取的水层可以直接用作 PCR 反应的模板。
 - 使用 *TaKaRa Ex Taq* 等普通 PCR 酶时，DNA 溶液加入量不能超过 PCR 反应总体积的 1/10（50 μ l PCR 反应体系中一般加入 5 μ l）。
 - PrimeSTAR[®] GXL DNA Polymerase 具有很好的抗阻害物能力，可提高 PCR 反应性能。在这种情况下，DNA 溶液体积不应超过 PCR 反应体系的 1/10 体积。
 - 使用对阻害剂有很强耐性的 MightyAmp DNA Polymerase 进行 PCR 反应时，DNA 的加入量为 PCR 反应总体积的 4/10（50 μ l PCR 反应体系中加入 20 μ l）也可得到良好的扩增。

实验操作流程图



● 使用注意

以下为使用本试剂时的注意事项，使用前请一定认真阅读。

固定、包埋组织的状况对提取 DNA 的质量有直接关系，将影响 PCR 扩增。对组织样品进行固定、包埋时应注意以下几点：

- ① 10%的福尔马林固定液的浸透性能较好，对组织材料的浸透率为 1 mm/h。对于小的组织材料可以直接浸透；对于大的组织材料需要切割后放入固定液中，以提高固定液的浸透效果，固定时间尽量控制在 3 天以内。另外，使用 AMeX 固定法可以提高保存组织的分子量。
- ② 使用常规方法：经过乙醇脱水，氯仿置换后，用熔点在 56~58℃的石蜡进行包埋。以病毒等外源基因为研究对象时，试剂要现配现用。

● Q&A

Q1：能否进行 RNA 回收？

A1：本制品是 DNA 回收专用试剂，不能进行 RNA 回收。

Q2：能否用于非石蜡包埋切片 DNA 的回收？

A2：能用于冷冻切片的回收，但脱完蜡的切片的 DNA 提取尚未进行实验确认。

Q3：能否从固定于载玻片上的组织中提取 DNA？

A3：把固定于载玻片上的组织从载玻片上刮离、或者用二甲苯进行剥离后，将无法回收 DNA。此时可以使用限定部位法（参考“操作方法”II）进行 DNA 回收。但是经染色后的组织材料，其染色剂对 PCR 反应有阻碍作用，应十分注意。

Q4：回收的 DNA 能否用分光光度计进行定量？

A4：DEXPAT 不是核酸纯化试剂，是 DNA 的回收试剂，因此不建议用 UV 分光光度计进行 DNA 定量。

Q5：回收的 DNA 是否可以通过电泳进行确认？

A5：因回收 DNA 量少，往往不能用电泳进行确认。

Q6：提取的 DNA 可以保存多长时间？

A6：我们曾经在 4℃中保存过 3 个月，在 -20℃中保存过一年。

Q7：一般可以回收多少量的水层溶液？

A7：通常可以回收 200 μl 以上的水层溶液。

Q8：按照说明书操作，加热后离心不能形成水层，此时应注意什么？

A8：可能是使用的切片过大，请从以下几方面加以考虑。

- ① 减少切片量。
- ② 提高离心转速。（使用离心机的最大转速进行离心。）
- ③ 加热时进行搅拌，使 TaKaRa DEXPAT Easy 很好混合。
- ④ 离心时如不十分冷却，10 分钟离心将无法得到固化的石蜡薄膜，此时请延长离心时间或减少样品加量。

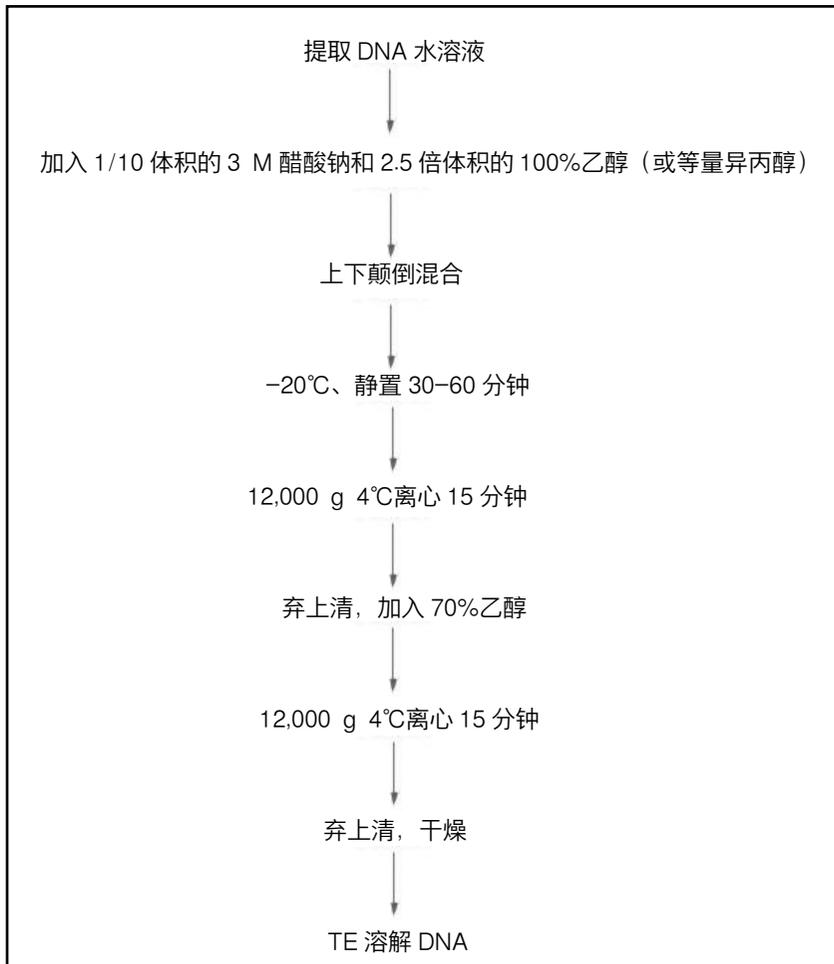
Q9：回收的 DNA 用 *TaKaRa Ex Taq* 进行 PCR 反应，不能扩增目的 DNA 片段，此时应注意什么？

A9：① 可能混有 PCR 扩增的抑制剂。请尝试使用抗阻害性强的 MightyAmp DNA Polymerase Ver.2 (Code No. R071A/B)、MightyAmp DNA Polymerase Ver.3 (Code No. R076A/B) 或 PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (Code No. R050A/B) 进行 PCR 反应。使用 PrimeSTAR GXL 时，DNA 溶液加入量不要超过 PCR 反应体积的 1/10 (V/V) 量。使用 MightyAmp DNA Polymerase 时，DNA 溶液加入量不要超过 PCR 反应体积的 4/10 (V/V) 量。

- ② 目的基因表达量低或者由于包埋、固定的处理使 DNA 损伤比较严重。这种情况推荐增加 DNA 溶液加入量，使用 MightyAmp DNA Polymerase 进行扩增。

NOTE: 使用 *TaKaRa Ex Taq* 等普通 PCR 聚合酶时, DNA 溶液加入量不能超过 PCR 反应总体积的 1/10。通过乙醇沉淀进行纯化的 DNA 可除去抑制剂, 提高 DNA 有效模板量。使用 *MightyAmp DNA Polymerase* 进行 PCR 反应时, DNA 的加入量为 PCR 反应总体积的 4/10, 也可得到良好的扩增。

一般情况下, 使用普通 PCR 聚合酶进行扩增时, 请对 DNA 溶液进行乙醇沉淀后再进行 PCR 反应。

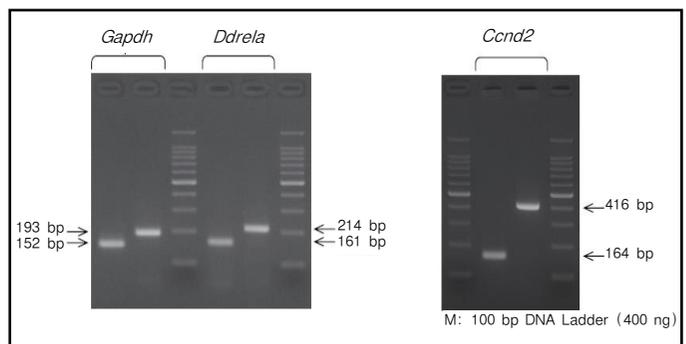


● 实验例

A. 使用本试剂从大鼠睾丸石蜡包埋组织切片中提取的 DNA 进行 *Gapdh*、*Dclre1a* 和 *Ccnd2* 基因的 PCR 扩增

Template : DNA 提取液 2.5 μ l
 PCR 反应体系: 25 μ l
 DNA Polymerase: *TaKaRa Ex Taq*

PCR 反应条件:
 94°C 30 sec
 54°C 60 sec
 72°C 60 sec
 72°C 5 min
 } 35 Cycles



结果：提取 DNA 扩增后，获得了目的片段。

B. 使用本试剂从小鼠足组织提取的 DNA 进行 *Dclre1a* 和 *Tfrc* 基因的扩增

Template: DNA 提取液 2.5 μ l

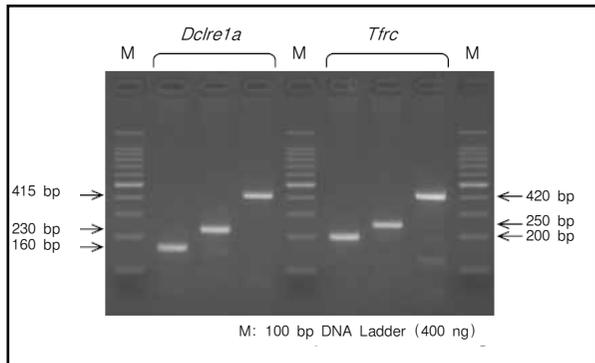
PCR 反应体系: 25 μ l

DNA Polymerase: *TaKaRa Ex Taq*

PCR 反应条件:

94°C 30 sec
54°C 60 sec
72°C 60 sec
72°C 5 min

35 Cycles



结果：提取 DNA 扩增后，获得了目的片段。

C. 对冷冻切片来源的 DNA 进行 PCR 扩增（一日龄小鼠冷冻切片）

样品：小鼠冷冻切片（一日龄，全身）

DNA 提取:



PCR 扩增:

Template: DNA 提取液 2.5 μ l

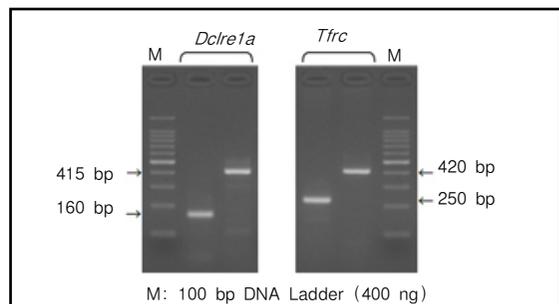
PCR 反应体系: 25 μ l

DNA Polymerase: *TaKaRa Ex Taq*

PCR 反应条件:

94°C 30 sec
54°C 60 sec
72°C 60 sec
72°C 5 min

35 Cycles



结果：每个目的基因均可扩增。

D. 从载玻片上大鼠和小鼠的石蜡包埋组织切片中提取的DNA进行Real Time PCR实验

Template : DNA 提取原液 10 倍稀释 5 个梯度各 2.5 μ l

Target: 大鼠 *Gapdh* 和小鼠 *Tfrc* 基因

PCR 反应体系: 25 μ l

使用试剂: TB Green[®] Premix Ex Taq[™] (Tli RNaseH Plus) (Code No. RR420A)

使用仪器: Thermal Cycler Dice[™] Real Time System // (Code No. TP900: 终卖)

PCR 反应条件:

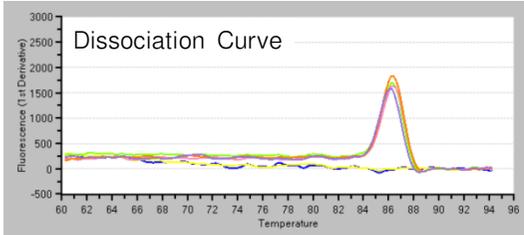
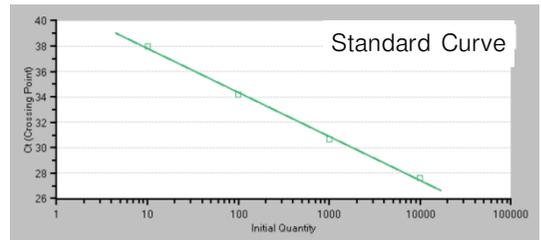
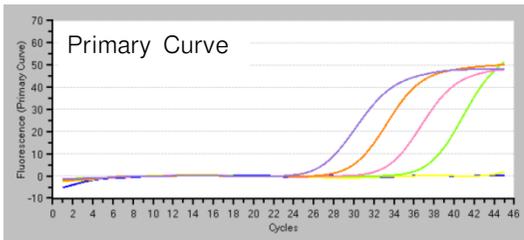
95 $^{\circ}$ C 30 sec

95 $^{\circ}$ C 5 sec

60 $^{\circ}$ C 30 sec } 35 cycles

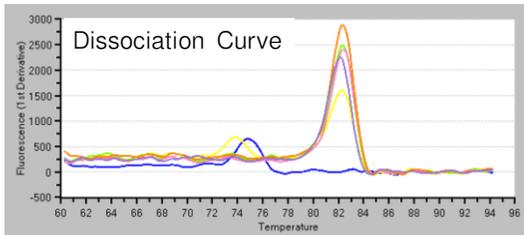
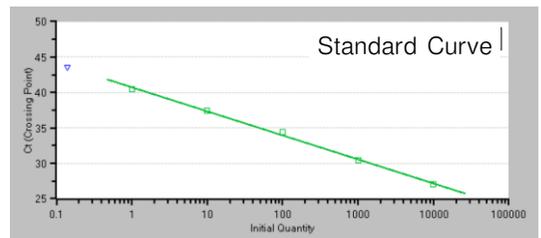
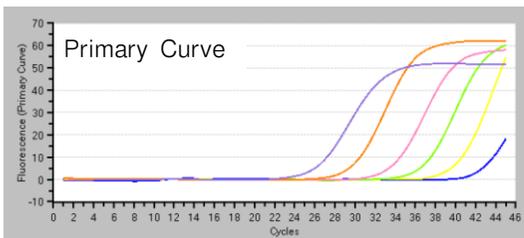
Dissociation

D-1 对载玻片上大鼠石蜡包埋组织切片提取的DNA进行Real Time PCR扩增 (*Gapdh* 基因)



Real Time PCR 扩增结果显示, 可以检测到从原液到 1,000 倍稀释的DNA。

D-2 对载玻片上小鼠石蜡包埋组织提取的DNA进行Real Time PCR扩增 (*Tfrc* 基因)



Real Time PCR 扩增结果显示, 可以检测到从原液到 10,000 倍稀释的DNA。

● 参考文献

- 1) Goelz, S.E. *et al. BBRC* . (1985) **130**: No. 1, 118–126.
- 2) Sato, Y. *et al Byori to Rinsho [Japanese] (supplementary volume)*,(1990) **8**: 432–453.

● 关联产品

TaKaRa DEXPAT™ (Code No. 9091)
MightyAmp™ DNA Polymerase Ver.2 (Code No. R071A/B)
MightyAmp™ DNA Polymerase Ver.3 (Code No. R076A/B)
TaKaRa Ex Taq® (Code No. RR001A/B/C)
PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase (Code No. RR050A/B)
TB Green® *Premix Ex Taq*™ (Tli RNaseH Plus) (Code No. RR420A)

TB Green, *TaKaRa Ex Taq*, and PrimeSTAR are registered trademarks of Takara Bio Inc.
DEXPAT, MightyAmp, *Premix Ex Taq*, and Thermal Cycler Dice are trademarks of Takara Bio Inc.

注意

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

未经Takara Bio Inc.书面许可授权或批准，不得制造、许诺销售、销售、进口Takara产品，或者使用Takara产品所有的相关专利及相关商标。

如果您需要其他用途的许可授权，请联络我们，或访问我们网站www.takarabio.com。

您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。

所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

本文件由宝日医生物技术（北京）有限公司翻译制作，最新版本文件请参考 Takara Bio Inc.网站。为正确使用 Takara 产品，您应当掌握本产品的相关知识和使用说明。

技术咨询热线：

0411-87641685, 87641686

4006518761, 4006518769

TAKARA BIO INC.

URL: <https://www.takarabiomed.com.cn>

v202206Da