

Code No. 9091

研究用

TaKaRa

TaKaRa DEXPAT™

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 实验必备仪器	1
● 保存	1
● 使用注意	1
● 操作方法	1
● 实验例	3
● Q&A	7
● 参考文献	8
● 关联产品	8

● 制品说明

TaKaRa DEXPAT 是一步法从 10%福尔马林(3.5%甲醛)固定的石蜡包埋组织切片中提取 DNA 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,操作时间从 2~3 天缩至 25 分钟。

本试剂具有以下特点:

1. 无需脱蜡处理。
2. 提取只需 10 分钟 (整体操作只需 25 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, 提高样品解析精度。

TaKaRa DEXPAT 是特别的表面活性剂与吸附 PCR 阻害物质树脂的混合制剂, 向石蜡包埋组织中加入 TaKaRa DEXPAT 后, 进行简单操作, 就可以得到 PCR 扩增用 DNA。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 (100 次量)

DEXPAT

10 ml×5 瓶

● 实验必备仪器

- 微量移液枪和枪头
- 微量 (冷冻) 离心机 (12,000 rpm)
- Heating Block (100°C)
- 1.5 ml Microtube
- 塑料手套

● 保 存:

4°C

● 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。

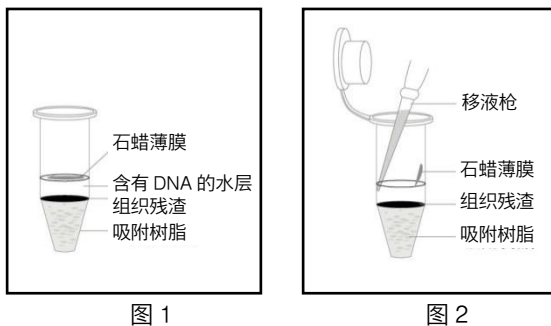
1. 固定、包埋组织的状况对提取 DNA 的质量有直接关系, 将影响 PCR 扩增。通常, 10%的福尔马林(3.5% 甲醛)固定时间建议控制在 3 天以内。另外, 基于丙酮的 AMeX 固定法也可用于 DNA 分析。
2. 为防止核酸污染, 实验操作时请戴实验用手套, 镊子、枪头等使用前应高温高压灭菌。
3. 当对石蜡包埋组织进行切片后, 刀片和镊子要清洗干净, 避免 DNA 交叉污染。可以使用消毒剂 (例如: 双氧水) 和酒精清洗刀片和镊子, 并用紫外光照射 10 分钟。
4. 因树脂非常易沉淀, 在使用前, 请将 DEXPAT 试剂轻轻旋转混匀, 不要产生气泡。

● 操作方法

操作流程见图 3, 详细操作如下。操作时请戴实验用手套。

1. 将石蜡包埋组织切成 5 μm (4~10 μm) 厚后, 用灭菌小镊子将 1~3 枚切片放入 1.5 ml Microtube 中, 包埋组织至少需要 6 mm×6 mm 大小。
2. 颠倒混合 DEXPAT 试剂, 向装有实验材料的 Microtube 中加入 0.5 ml (约 20 滴)。每次分取 DEXPAT 之前都要将其颠倒混匀, 防止树脂沉淀。

3. 盖上 Microtube 盖，100°C加热处理 10 分钟。
4. 加热后立即进行 12,000 rpm，4°C离心 10 分钟，离心后的 Microtube 中将呈图 1 状态。
5. 用移液枪吸取水层。避免吸取石蜡膜、树脂以及组织残渣（见图 2）。
6. 吸取的水层可直接作为 PCR 反应的模板，进行 PCR 反应。加入量为 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。用量过多，会抑制 PCR 反应。



实验操作流程：

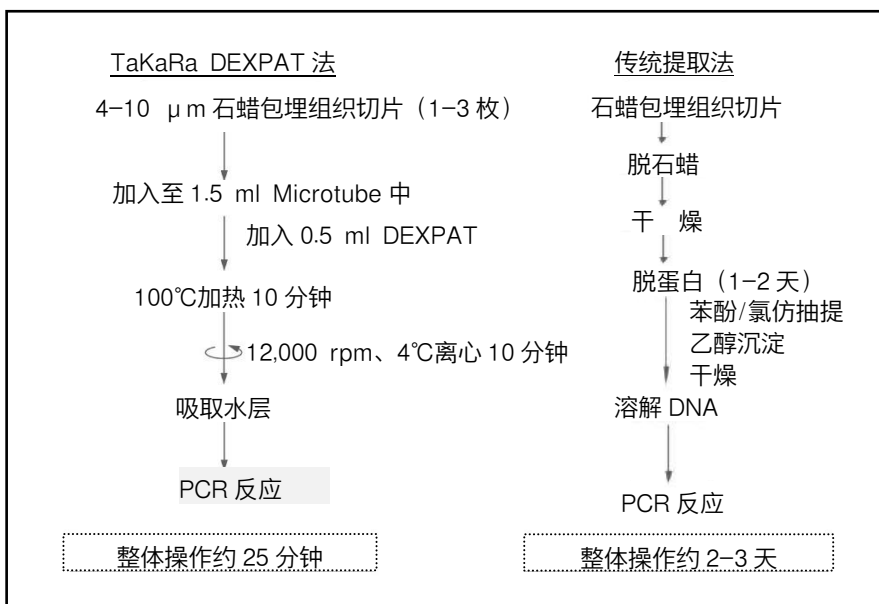


图 3 实验操作流程比较图

● 实验例

TaKaRa DEXPAT 与 *TaKaRa Ex Taq* 组合使用可获得更好的 PCR 扩增。

A. β -globin 基因的扩增

用 DEXPAT 提取六种石蜡包埋组织切片 (各 10 μ m, 2 枚) 中的 DNA, 然后进行 β -globin 基因的 PCR 扩增。本实验提取的 DNA 溶液在 4°C 保存一个月后, 仍具有相同的扩增效率。

Template: DNA 提取液 5 μ l

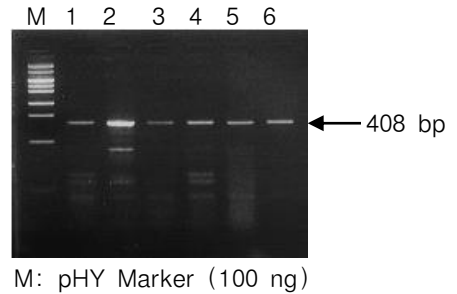
PCR 反应体积: 50 μ l

Polymerase: *TaKaRa Ex Taq*

PCR 反应条件:

94°C	30 sec	} 35 Cycles
54°C	60 sec	
72°C	60 sec	
72°C	5 min	

【 β -globin 基因的扩增结果】



B. 对保存 10 年切片来源的 β -globin, K-ras 12, p53(exon 5, exon 6) 基因进行扩增

用 DEXPAT 提取保存 10 年的大肠癌组织福尔马林固定石蜡包埋组织切片 (10 μ m, 2 枚) 中的 DNA 作为 PCR 扩增模板。

B-1) β -globin 基因 (110 bp、262 bp、408 bp) 的扩增。

Template:

Lane1-3: 传统方法提取的 5 μ l DNA

Lane4-6: 使用 DEXPAT 提取的 5 μ l DNA

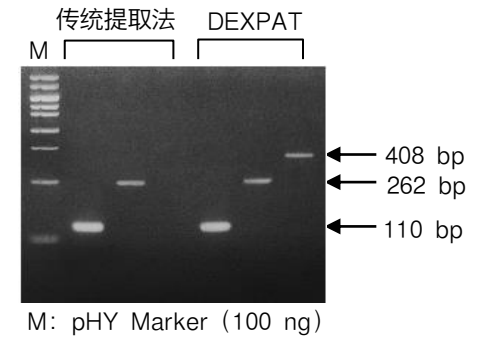
PCR 反应体积: 50 μ l

Polymerase: *TaKaRa Ex Taq*[®]

PCR 反应条件:

94°C	30 sec	} 35 Cycles
54°C	60 sec	
72°C	60 sec	
72°C	5 min	

【 β -globin 基因的扩增结果】



B-2) K-ras 12 基因 (107 bp) 的扩增。

Template:

Lane1: 传统方法提取的 5 μ l DNA

Lane2: 使用 DEXPAT 提取的 5 μ l DNA

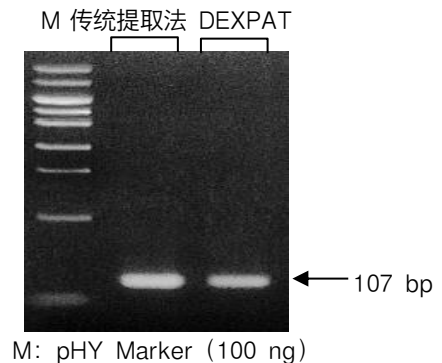
PCR 反应体积: 50 μ l

Polymerase: *TaKaRa Ex Taq*

PCR 反应条件:

94°C	30 sec	} 35 Cycles
54°C	60 sec	
72°C	60 sec	
72°C	5 min	

【K-ras 12 基因的扩增结果】



B-3) p53 exon 5 (273 bp), exon 6 (207 bp) 基因的扩增。

【1st PCR】

Template:

Lane1,2: 传统方法提取的 5 μ l DNA

Lane3,4: 使用 DEXPAT 提取的 5 μ l DNA

PCR 反应体积: 50 μ l

Polymerase: *TaKaRa Ex Taq*

PCR 反应条件:

94°C 1 min
60°C 1 min
72°C 2 min
72°C 5 min

30 Cycles

【2nd PCR】

Template: 1st PCR 反应液 5 μ l

PCR 反应体积: 50 μ l

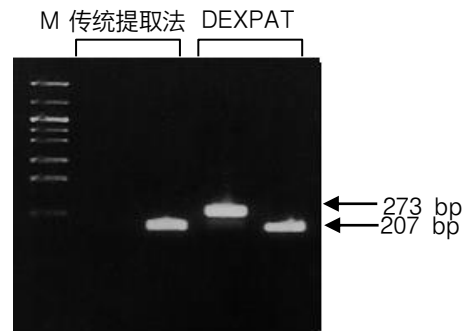
Polymerase: *TaKaRa Ex Taq*

PCR 反应条件:

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

25 Cycles

【p53 exon 5, exon 6 基因的扩增结果】



M: pHY Marker (100 ng)

C. 对冷冻切片来源的 DNA 进行 PCR 扩增

1. 实验材料: 人扁桃体石蜡包埋切片, 载玻片 1 枚 (25 mm \times 12 mm, 厚度 5 μ m);
人扁桃体冷冻切片, 载玻片 1 枚 (9 mm \times 12 mm, 厚度 5 μ m)。

2. DNA 提取:

- ① 将 500 μ l 100°C预热的 DEXPAT 加在载玻片上, 将溶液全部移到 1.5 ml Microtube 中。
- ② 100°C加热 10 分钟。
- ③ 12,000 rpm, 4°C离心 10 分钟。
- ④ 取上清液用于 PCR 扩增。

3. PCR 扩增:

Template: DEXPAT 提取液 1 μ l、2.5 μ l

Target : *K-ras* 12 (107 bp)、 β -globin (408 bp, 262 bp)

PCR 反应体积: 25 μ l

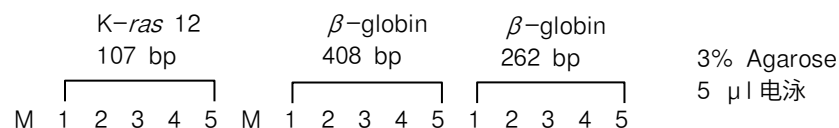
Polymerase : *TaKaRa Ex Taq*

PCR 反应条件:

94°C 60 sec
94°C 30 sec
55°C 60 sec
72°C 60 sec
72°C 5 min

35 Cycles

【冷冻切片来源 DNA 的 *K-ras* 12 基因、 β -globin 基因的扩增结果】



M: pHY Marker

- 3% Agarose
5 μ l 电泳
- 1: 包埋组织切片提取液 1 μ l 的扩增结果
 - 2: 包埋组织切片提取液 2.5 μ l 的扩增结果
 - 3: 冷冻切片提取液 1 μ l 的扩增结果
 - 4: 冷冻切片提取液 2.5 μ l 的扩增结果
 - 5: Negative Control

D. 对载玻片上石蜡包埋组织限定部位提取的 DNA 进行 PCR 扩增

使用 DEXPAT 对同一大肠癌石蜡包埋切片上正常部位和癌变部位分别进行 DNA 提取, 用微卫星解析法通过 PCR 扩增分析大肠癌中的 LOH(杂合性丢失)。

操作方法:

1. 将固定在载玻片上的大肠癌切片 (4.5 \times 1.5 cm), 在显微镜下与 HE 染色切片进行比较, 判断出癌变部位 (2.3 \times 0.9 cm), 然后在载玻片的背面用油性笔进行画圈标记。
2. 取 500 μ l DEXPAT 加入到 Microtube 中, 在 Heating Block 上 100 $^{\circ}$ C 加热。
NOTE: 使用 1 ml 的 Tip 吸取少量的 DEXPAT 滴到标记的癌变部位, 并用 Tip 尖来回刮切片, 将切片从载玻片上剥离, 然后完全回收 Microtube 中 (吸取切片时可以将 Tip 头剪掉一小段), 尽量不要将癌变部分的胶和切片残留于载玻片上。以同样的方法将残留的正常部位切片从载玻片上剥离。
3. 将装有实验材料的 Microtube 用 Heating Block 100 $^{\circ}$ C 加热 10 分钟后, 12,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C 离心 10 分钟。取上清液至新的 Microtube 中 (不要取到胶和界面的残渣), 用于 PCR 反应。

PCR 反应条件:

PCR 反应混合液

试剂	使用量
10 \times <i>Ex Taq</i> Buffer	2.5 μ l
dNTP Mixture (250 μ M each)	2.5 μ l
Each Primer (final 10 pmol)	0.25 μ l
<i>TaKaRa Ex Taq</i> (0.625 U/25 μ l)	0.125 μ l
Template DNA	2.5 μ l
灭菌水	up to 25 μ l

PCR 反应条件:

- | | | | |
|-----------------|--------|---|-----------|
| 94 $^{\circ}$ C | 90 sec | } | 35 Cycles |
| 94 $^{\circ}$ C | 30 sec | | |
| 54 $^{\circ}$ C | 60 sec | | |
| 72 $^{\circ}$ C | 60 sec | | |
| 72 $^{\circ}$ C | 5 min | | |

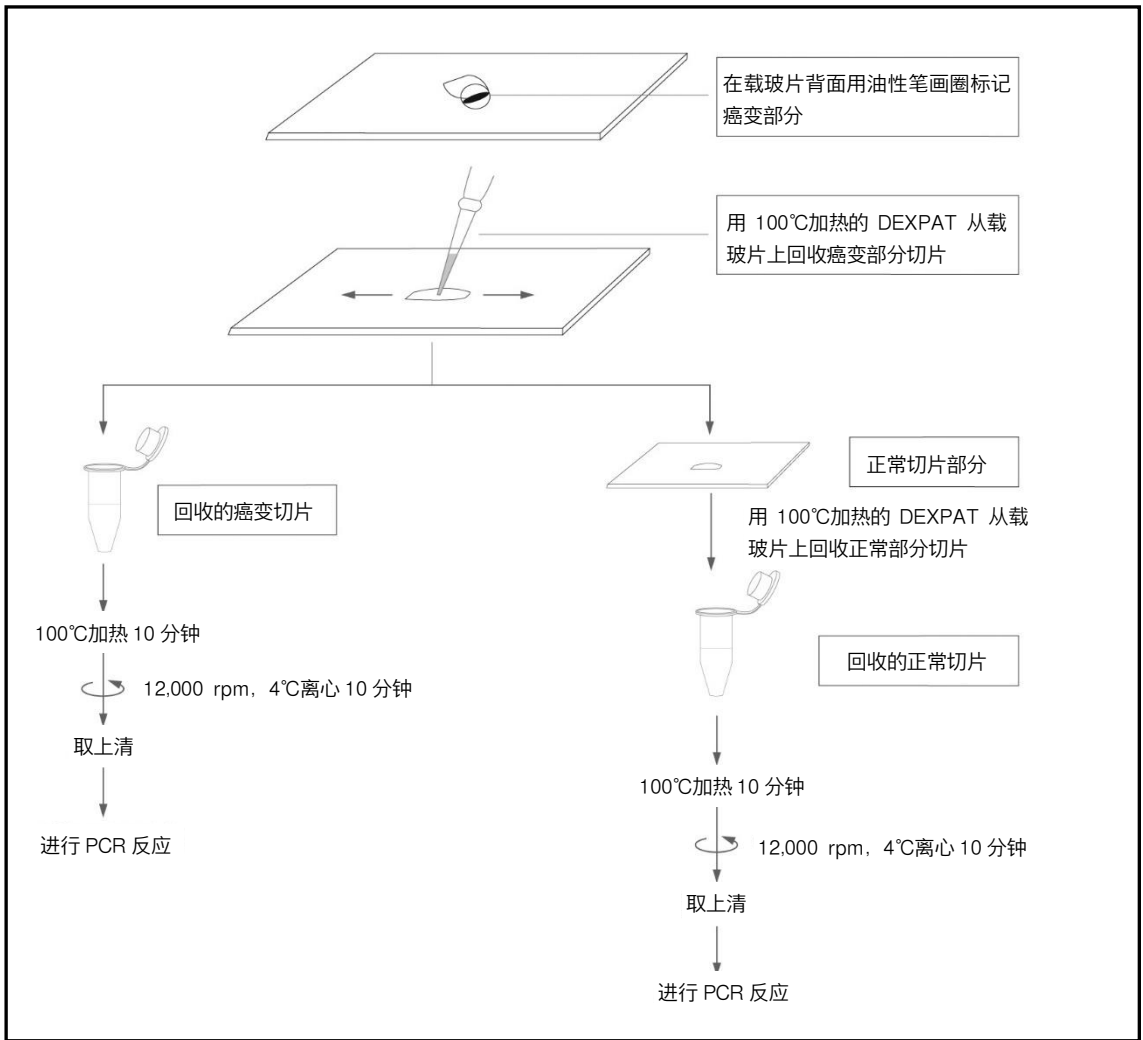


图 4 载玻片上石蜡包埋组织的限定部位提取操作流程

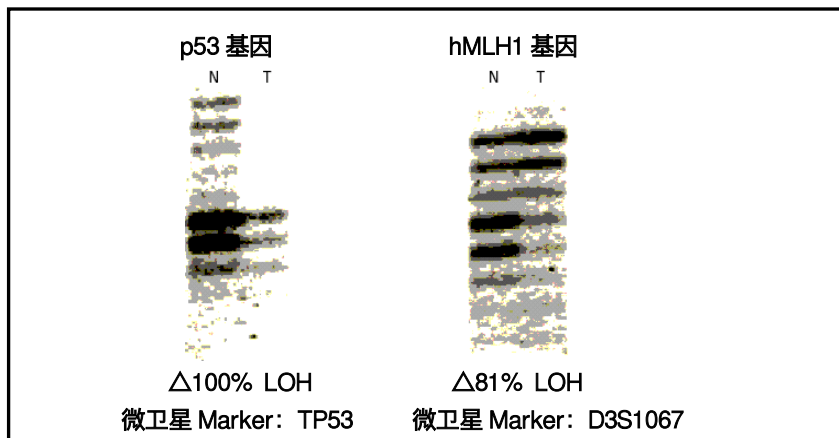


图 5 特定部位提取 DNA LOH 分析 (N: 正常细胞, T: 肿瘤细胞)

结果:

证实 LOH(杂合性丢失)。

● 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: 回收的 DNA 能否用分光光度计进行定量?

A3: 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。

Q4: 回收的 DNA 是否可以通过电泳进行确认?

A4: 因回收 DNA 量少, 往往不能用电泳进行确认。

Q5: 提取的 DNA 可以保存多长时间?

A5: 我们曾经在 4°C 中保存过 3 个月, 在 -20°C 中保存过一年。

Q6: 一般可以回收多少量的水层溶液?

A6: 通常可以回收 200 μ l~300 μ l 的水层溶液。

Q7: 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?

A7: 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, 增加 DEXPAT 量。
- ② 提高离心转速 (如 15,000 rpm)。
- ③ 加热时进行搅拌, 使 DEXPAT 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量。

Q8: 回收的 DNA 进行 PCR 反应, 不能扩增目的 DNA 片段, 此时应注意什么?

A8: ① DNA 加入量不要超过 PCR 反应体积的 1/10 (V/V) 量。若要增加 DNA 添加量, 需做乙醇沉淀, 然后再进行 PCR 反应。

② 固定、包埋的手法也会对 DNA 的提取质量有很大影响。

③ 可能混有 PCR 扩增的抑制剂。请对 DNA 溶液进行乙醇沉淀纯化*。

*: 乙醇沉淀纯化方法

- 1、预计提取的 DNA 量;
- 2、加入 1/10 体积的 3 M 醋酸钠;
- 3、加入 2.5 倍体积的无水乙醇 (或加入同体积的异丙醇);
- 4、颠倒混匀;
- 5、在 -20°C 放置 30 分钟至 1 小时;
- 6、4°C, 12,000 rpm 离心 10 分钟;
- 7、去除上清液, 加入 1 ml 70%乙醇;
- 8、4°C, 12,000 rpm 离心 10 分钟;
- 9、去除上清液, 干燥沉淀;
- 10、用 20-25 μ l 合适的 Buffer 溶解沉淀 (如 TE Buffer)。

● 参考文献

- 1) Sato Y, *et al. Am J Pathol.* (1990)**136**: 267.
- 2) Goelz S E, *et al. Biochem Biophys Res Commun.*, (1985) **130**: 118–126.

● 关联产品

TaKaRa Ex Taq[®] (Code No. RR006)

DEXPAT is a trademark of Takara Bio Inc.

TaKaRa Ex Taq is a registered trademark 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.takara-bio.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>

v201909Da