

货号: **B89232**

1/12



FormaPure DNA FFPE DNA 核酸提取试剂盒说明书

【产品名称】

通用名称: FormaPure DNA FFPE DNA 核酸提取试剂盒

英文名称: FormaPure DNA

FormaPure DNA FFPE DNA 核酸提取试剂盒:

从 FFPE 样品中分离 DNA 的扩展方案



PN B44690KG

2021 年 11 月

贝克曼库尔特 (美国) 股份有限公司

250 S. Kraemer Blvd.

Brea, CA 92821 U.S.A.



FormaPure DNA FFPE DNA 核酸提取试剂盒：

从 FFPE 样品中分离 DNA 的扩展方案

PN B44690KG (2021 年 11 月)

© 2021 贝克曼库尔特 (美国) 股份有限公司

保留所有权利。

Beckman Coulter、标志以及文中提及的贝克曼库尔特产品和服务标记均是贝克曼库尔特 (美国) 股份有限公司在美国和其他国家/地区的商标或注册商标。

所有其他商标、服务标记、产品或服务均为其各自持有者的商标或注册商标。

【联系我们】

- 有关此方案的问题，请致电贝克曼库尔特技术支持部 1-800-369-0333。
- 欲获得其他信息，或收到破损产品，请致电 400 821 8935 与贝克曼库尔特客户服务部联系，或联系当地贝克曼库尔特生命科学代表。
- 有关更新的方案，请参阅 www.beckman.com/techdocs。

符号词汇表发布于

www.beckman.com/techdocs (PN C05838)。

【产品可用性】

REF B89230 — FormaPure DNA FFPE DNA 核酸提取试剂盒，50 次制备试剂盒

REF B89231 — FormaPure DNA FFPE DNA 核酸提取试剂盒，96 次制备试剂盒

REF B89232 — FormaPure DNA FFPE DNA 核酸提取试剂盒，384 次制备试剂盒

可通过以下网址联系我们：

www.beckman.com

Beckman Coulter Eurocenter S.A.

22, rue Juste-Olivier

Case Postale 1044

CH - 1260 Nyon 1, Switzerland

电话： +41 (0) 22 365 36 11

Beckman Coulter (UK) Ltd.

Oakley Court

Kingsmead Business Park, London Road

High Wycombe

United Kingdom HP11 1JU

01494 441181

可能涉及一项或多项专利。 - 请参见

www.beckman.com/patents

美国印刷

【目录】

- 简介，第 3 页
- 试剂盒规格，第 4 页
- 警告和预防措施，第 4 页
- 提供的材料，第 5 页
- 需要但未提供的材料，第 6 页
- 过程概述，第 7 页
- DNA 提取方案，第 7 页
- 故障排除指南，第 11 页
- 修订历史，第 15 页

【简介】

FormaPure DNA 提取和纯化试剂盒利用获得专利的 Beckman Coulter SPRI 顺磁性微珠技术，在不使用二甲苯的情况下，从福尔马林固定、石蜡包埋（FFPE）组织中分离 DNA。已优化此试剂盒用于下游测序和基因分型测定。具体而言，使用 FormaPure DNA FFPE DNA 核酸提取试剂盒分离的基因组 DNA 与以下下游应用兼容：

- 靶向扩增子 NGS
- 靶向捕获 NGS
- 全外显子组测序
- 全基因组测序
- 终点或 qPCR



FormaPure DNA FFPE DNA 核酸提取试剂盒从组织切片（总厚度高达 3×10 微米）中分离 DNA。可以在 96 孔板（手动和自动）和 1.5 mL 离心管（仅手动）中执行该方案。溶解石蜡后，从离心管的组织切片中开始核酸提取。酶裂解步骤可消化组织并释放核酸，随后在高温下解交联。可以在孔板或离心管中进行剩余方案。从样品中去除 RNA，并加入结合液以将核酸固定至 SPRI 微球表面。使用简单清洗流程冲洗掉污染物，并用水洗脱核酸。


【试剂盒规格】


试剂盒类型	制备次数
小号试剂盒，PN B89230	50
中号试剂盒，PN B89231	96
大号试剂盒，PN B89232	384

【警告和预防措施】


阅读并遵守以下安全信息。

重要提示 该  符号表示执行程序操作所需的材料、操作或设备的潜在安全风险；当您看到该  符号时，请返回本章节查看相关安全信息。

		危险
蛋白酶 K		
H315		引起皮肤刺激。
H319		造成严重眼睛刺激。
H334		如果吸入，可能引起过敏或哮喘症状或呼吸困难。
H335		可能造成呼吸道刺激。
P261		避免吸入蒸汽。
P280		穿戴防护手套、防护服和护目镜 / 面部防护装置。
P284		如果通风不畅，应佩戴呼吸防护设备。
P304+P340		如不慎吸入：将受害人转移至新鲜空气处，并保持呼吸通畅的姿势休息。
P342+P311		如出现呼吸道症状：请联系毒物中心或医生。
SDS		化学品安全技术说明书提供于 www.beckman.com/techdocs 。

 **注意**

蛋白酶 K 有造成化学损伤的风险。为避免接触蛋白酶 K，请穿戴适当的个人防护装备，包括护目镜、手套和合适的实验室服装。使用化学品之前，请参阅安全技术说明书，以了解有关化学品暴露的详细信息。

 **注意**


滚烫液体溅入眼睛或皮肤上有灼伤风险。孵育样品时需穿戴适当的个人防护设备。在离心管上放置锁定管帽，以防止离心管顶部在孵育过程中打开。

【提供的材料】

FormaPure DNA FFPE DNA 核酸提取试剂盒中提供以下试剂。试剂图标作为视觉辅助包含在说明书中，以确保使用正确试剂。

注释 有关失效日期，请参阅产品标签。

试剂	图标	储存条件
矿物油		15 至 30°C
裂解液		15 至 30°C
结合液		15 至 30°C

清洗液		15 至 30°C
RNase A	-	15 至 30°C
蛋白酶 K	-	15 至 30°C

【需要但未提供的材料】

【所需试剂】

试剂	供应商	部件编号
100% 乙醇	AmericanBio	AB00138 (或等效产品)
无核酸酶水	Thermo Fisher	AM9932 (或等效产品)

【所需设备】

可以以 96 孔板或离心管形式进行 FormaPure DNA FFPE DNA 核酸提取试剂盒处理。有关本实验流程所需硬件和耗材，请参阅下表。

表 1 所需硬件和配件

硬件和配件	形式
移液器 (P20、P200、P1000 多通道或单通道，视需要而定)	孔板和离心管
可调节热源 (例如，水浴或加热块)。建议使用两个。	孔板和离心管
涡旋振荡器	孔板和离心管
Beckman Coulter 微量离心管 16，或等效产品	孔板和离心管
Beckman Coulter Agencourt SPRIPlate 96R 环形超级磁力板，PN A32782	孔板
Beckman Coulter Agencourt SPRIStand 磁性 6 管磁力架 (适用于 1.5、1.7 或 2.0 mL 离心管)，PN A29182	离心管

表 2 所需耗材

耗材	形式
用于 P20、P200 和 P1000 移液器的屏障吸头	孔板和离心管
1.5-1.7 mL 微量离心管	孔板和离心管
微量离心管锁定盖	孔板和离心管
Thermo Fisher 1.2 mL 96 孔板，PN AB1127，或等效产品	孔板
200 μL 96 孔储存板	孔板
PCR 粘性密封膜	孔板

【过程概述】



- | | |
|------------------|-----------|
| 1. 脱蜡 | 6. 结合 DNA |
| 2. 组织消化 | 7. 清洗 |
| 3. DNA 延长裂解 (可选) | 8. 乙醇清洗 |
| 4. 解交联 | 9. 洗脱 |
| 5. RNase A 处理 | |

【DNA 提取方案】

【开始前】


- 将可调节热源预热至 80°C 和 55°C。
- 使用无核酸酶水从 100% 储备液中制备 80% 乙醇。不得使用之前制备的溶液。
- 处理样品和试剂需穿戴适当的个人防护设备 (PPE)。

【实验流程】

1 样品制备:

对于每份样品, 将一至三份 10 μm FFPE 组织切片转移至 1.5 mL 离心管中。

2 脱蜡:


- 用移液器吸头将 450 μL 矿物油 (MO) 加入每份样品中, 并完全浸没切片。
-  在 80°C 下孵育 5 分钟。
- 涡旋离心管两次, 每次 5 秒, 以溶解石蜡并分散组织。


3 组织消化:

- 将 200 μL 裂解液 (LBA) 加入每份样品中。


注释 请勿涡旋离心管，因其可能会导致矿物油和裂解液乳化。

- b. 以 $10,000 \times g$ 离心 **15 秒**。矿物油形成一个单独上层相。

注释  如果矿物油层开始变浑浊或组织卡在矿物油和裂解缓冲液的交界面上，则在 80°C 下再**孵育** 3 分钟。孵育后，加入蛋白酶 K 之前，确保冷却样品 2 分钟。

- c.  在不破坏上层相的情况下，将 **20 μL 蛋白酶 K** 加入水下层相并吹打混匀混合 10 次。
- d. 在 55°C 下孵育样品管至少 **60 分钟**（最长 16 小时），以实现完全裂解。

4 解交联:

- a.  在 80°C 下**孵育** 样品管 **60 分钟**。
- b. 从热源上取下样品管。
- c. 在不破坏上层相的情况下，将尽可能多的裂解液（下层相）转移至 96 孔板或 1.5 mL 离心管中。

注释 尽量减少随裂解液一起转移的**矿物油量**。但少量**矿物油**携带不会影响下游应用。

5 RNase A 处理:

- a. 将 **5 μL RNase A** 加入每份样品中。
- b. 使用设置为 150 μL 的 P200 移液器吹打混合五次，以彻底将酶分散。轻轻混合以尽量减少气泡的产生。
- c. 在室温下孵育 **5 分钟**。

6 结合 DNA:

- a. 通过摇晃或涡旋使**结合液 BBA** 完全重悬。
- b. 将 **300 μL 结合液 BBA** 加入每份样品中，并用设置为 350 μL 的 P1000 移液器混合 10 次。轻轻混合以尽量减少气泡的产生。


注释 在此步骤中，DNA 结合至磁珠。混合时，使用略小于孔中总体积的混合体积，并缓慢移液以最大限度地减少气泡的形成。气泡会捕获磁珠，阻止其被吸附至板底，从而降低产量。

- c. 在室温下孵育 **5 分钟**。
- d. 将样品放在磁力板上 10 分钟，或直至溶液澄清，使磁珠分离。如在 96 孔板中工作，则使用 SPRIPlate 96R 环形超级磁力板；如使用离心管，则将离心管放置在 Agencourt SPRIStand 磁性 6 管磁力架中。
- e. 样品置于磁力板上，在不破坏磁珠的情况下吸出上清液。丢弃上清液。

注释 抽吸时，将移液器放置在环中心或远离离心管中的磁珠，以避免干扰磁珠。磁珠损失会

降低产量。

7 清洗：

- a. 从磁力板上取下样品。
- b. 将 400 μL 清洗液  加入每份样品中。
- c. 使用设置为 250 μL 的 P1000 移液器，将样品混合 15 次或直至磁珠完全重悬在溶液中。轻轻混合以尽量减少气泡的产生。
- d. 将样品放回磁力板上 10 分钟，或直至溶液澄清，使磁珠分离。
- e. 样品置于磁力板上，在不破坏 cz 的情况下吸出上清液。丢弃上清液。
注释 抽吸时，将移液器放置在环中心或远离离心管中的磁珠，以避免干扰磁珠。磁珠损失会降低产量。

8 乙醇清洗：

- a. 从磁力板上取下样品。
- b. 将 750 μL 新鲜制备的 80% 乙醇加入每份样品。
- c. 使用设置为 600 μL 的 P1000 移液器，将样品混合 20 次或直至磁珠完全重悬。
- d. 将样品放回磁力板上 3 分钟，或直至溶液澄清，使磁珠分离。
- e. 样品置于磁力板上，在不破坏磁珠的情况下吸出上清液。丢弃上清液。
注释 干燥前，在不干扰磁珠的情况下，尽可能多地去除乙醇。按照当地法规和可接受的实验室规范处置乙醇废液。
- f. 将磁力板上的样品风干 10 分钟。

9 洗脱：

- a. 从磁力板上取下样品。
- b. 将至少 40 μL 无核酸酶水加入每份样品中，并用设置为 30 μL 的 P200 移液器混合 10 次，或直至磁珠完全重悬。
- c. 盖上离心管或用 PCR 粘性密封膜覆盖孔板，在 55°C 下孵育 1 分钟。
- d. 将样品放回磁力板上 1 分钟，或直至溶液澄清，使磁珠分离。
- e. 样品置于磁力板上时，在不干扰磁珠的情况下，将尽可能多的上清液转移至 96 孔储存板或新离心管中。
- f. 储存于 -20°C 下。

本故障排除指南可能有助于最大限度地提高 FFPE 组织的核酸产量、完整性和纯度，或解决可能出现的任何问题。Beckman Coulter 的专家可解答您对本故障排除指南中的信息和本手册中的方案的任何相关问题（联系信息请参阅第 1 页的“联系我们”）。

注释 有关指导视频和最新信息，请访问 www.Formapure.com。

本章节包括以下表格：

- 表 3，故障排除 - 低产量
- 表 4，故障排除 - 提取核酸的质量不佳

表 3 故障排除 - 低产量

问题	可能的解决方案和备注
初始样品质量不佳	福尔马林固定、石蜡包埋和/或储存 FFPE 组织的过程对核酸造成损伤。虽然 FormaPure 化学物质旨在最大限度地提高挑战性 FFPE 样品的产量和完整性，但此化学物质无法修复受损核酸。
组织输入量少或组织类型	<ul style="list-style-type: none"> • 根据组织和疾病类型，一些 FFPE 样品可能含有非常少量的组织或细胞；因此，提取前核酸量可能原本较低。如可能，增加 FFPE 样品量以获得所需产量。 • 某些组织类型比其他组织类型更难消化。可以延长组织消化孵育时间（仅用于 DNA 分离）以释放更多核酸。
磁珠/样品损失	<ul style="list-style-type: none"> • 上清液去除过程中微球颗粒的破坏可能导致产量降低。抽吸过程中，移液器吸头不应接触微球颗粒。如果抽吸过程中观察到移液器吸头内呈棕色，则存在微球，应将溶液重新加注至离心管或孔中。将样品放回磁力板上，直至溶液完全澄清，让微球朝磁力板吸附，然后再次抽吸。 • 磁性分离过程中磁珠吸附不充分可能导致产量下降。去除上清液之前，确保磁珠完全吸附在磁力板上，且上清液澄清。 • 未消化的组织可捕获磁珠并阻止核酸有效结合或导致磁珠和样品损失。加入磁珠前，应在组织消化步骤中彻底消化组织。如果在组织消化步骤后仍有未消化的组织，则在结合步骤之前，应避免将未消化的组织转移至另一个离心管或孔中。有关更多信息，请参见下文组织消化不完全。

表 3 故障排除 - 低产量

问题	可能的解决方案和备注
组织消化不完全	如果 3 小时后未完全消化组织，可以延长 组织消化 孵育时间（仅用于 DNA 分离）。如果不希望延长 组织消化 时间，则在 RNA 分离 时，应避免转移任何未消化的组织。可以将样品以 10,000 × g 离心 5 分钟 ，随后应仅转移上清液。如果组织仍未朝离心管或孔底形成沉淀，则可再次将样品以 10,000 × g 离心 5 分钟 。如果在转移过程中不可避免地出现小组织碎片，则在本方案的 清洗 步骤中，这些组织碎片将与其他污染物一起被清洗掉。
孵育温度不精确	<ul style="list-style-type: none"> • 在组织消化和解交联步骤中，高于推荐温度会导致核酸降解，尤其是 RNA 降解。确保热源的温度精确且无明显波动。 • 在整个方法中精确的孵育温度对于实现最佳化学性能至关重要。验证热源是否经过校准并正常工作，调整热源设置以保持规定的孔内/离心管内温度。 • 尽管在脱蜡步骤中，在 80°C下应在 5 分钟内去除所有石蜡，但根据老化、包埋过程和所用石蜡的类型，可能需要更长孵育时间。即使已添加裂解缓冲液，但在添加蛋白酶 K 之前，建议将样品在 80°C下多孵育 3 分钟。

<p>孵育时间不精确或不足</p>	<p>已优化所提供的孵育时间，以此平衡提取样品的最高可能产量和质量。除非故障排除程序中另有说明，否则不建议偏离所提供的孵育时间。</p>
<p>洗脱液浑浊</p>	<p>取决于引起洗脱液浑浊的原因，可能影响提取的核酸的下游功能，也可能无影响。</p> <p>应为惰性的原因：</p> <ul style="list-style-type: none"> 在裂解液转移和清洗步骤中过多矿物油携带可能会使洗脱液看起来浑浊。在这些步骤过程中尽量减少携带的矿物油量。但是，如转移了一些矿物油，则可在随后清洗步骤中将其去除。由于矿物油会始终停留在清洗液的顶部，从上清液顶部抽吸将确保完全去除矿物油。 一些组织的脂质含量很高，可能导致洗脱液浑浊。脂质引起的洗脱液浑浊应不影响大多数下游应用的功能。 <p>应解决的原因：</p> <ul style="list-style-type: none"> 确保所有石蜡在脱蜡步骤后溶解。离心后，完全 3 脱蜡组织应完全浸入底部裂解液层中。参见下文石蜡过多/脱蜡不充分。 确保正确且充分执行清洗步骤。石蜡携带引起的洗脱液浑浊应不影响大多数下游应用，但可能由于组织消化不充分而降低产量。

表 3 故障排除 - 低产量

问题	可能的解决方案和备注
<p>磁珠结块</p>	<ul style="list-style-type: none"> 参见下文磁珠过度干燥。 清洗和杂质去除不充分。确保充分执行清洗步骤。观看视频以更好地了解正确清洗技术。 参见下文组织消化不完全。
<p>使用的乙醇百分比不精确</p>	<p>乙醇具有吸湿性，随着时间推移可能稀释；应新鲜制备 80%乙醇。在清洗步骤中，较低的乙醇浓度可能增加核酸溶解。</p>
<p>石蜡过多/脱蜡不充分</p>	<p>加入裂解缓冲液且随后离心后，确认组织完全浸入底部裂解液层中。如果石蜡未完全溶解，即使在离心后，组织也可能朝矿物油层迁移。如观察到此情况，在加入蛋白酶 K 之前，将样品放回 80°C 环境下，再放置 3 分钟。</p>
<p>裂解液转移不完全</p>	<p>确保转移全部裂解液，包括可能在交界面附近形成的白色沉降物。如为确保转移所有裂解液，允许携带一些矿物油。</p>
<p>磁珠过度干燥</p>	<p>确保在乙醇清洗步骤后未过度干燥磁珠。如观察到磁珠颗粒破裂，此为过度干燥迹象，应立即进行下一步操作。</p>
<p>洗脱不完全</p>	<p>确保在洗脱步骤中使用推荐的时间和温度，以完全洗脱磁珠上的核酸。</p>
<p>使用非推荐离心管或孔板</p>	<ul style="list-style-type: none"> 不同类型塑料的热传递速率可能不同，从而导致非预期的孔内孵育温度。 不同类型塑料会导致所施加磁场对顺磁性微珠的影响发生变化。 在微球分离步骤中，调整热源设置以保持规定的孔内/离心管内温度和吸附时间。
<p>使用非推荐磁力板</p>	<p>使用表 1, 所需硬件和配件中列出的特定磁力板，进行 FormaPure 化学物质的开发。如使用非推荐磁力板，吸附时间可能会不同。在磁珠分离步骤中调整吸附时间；上清液应澄清，在离心管或孔侧壁上应可见颗粒。</p>

表 4 故障排除 - 提取核酸的质量不佳

问题	可能的解决方案和备注
<p>核酸似乎已降解</p>	<ul style="list-style-type: none"> 福尔马林固定、石蜡包埋和/或储存 FFPE 组织的过程导致核酸降解。 如核酸降解程度超过预期，请使用无菌技术确保 DNase 和 RNase 在分离过程中不会成为污染源。 将核酸储存在 -20°C 或 -80°C，长期储存。
<p>RNase 和/或 DNase 污</p>	<ul style="list-style-type: none"> 请使用无菌技术确保 DNase 和 RNase 在分离过程中不会成为污染源。

染	<ul style="list-style-type: none"> RNA 工作流程应使用过滤吸头，以免缓冲液来源受到污染。 如排除所有其他污染源，则更换试剂。
RNA 污染 DNA	虽然 RNase A 在含有细胞碎片和裂解缓冲液成分的样品裂解液中应为活性，但这些成分会抑制 DNase 活性。确保在 DNase 处理之前正确进行乙醇清洗，由于过量乙醇也可能抑制 DNase 活性，因此尽可能多地去除乙醇。
DNA 污染 RNA	确保温度适合全核酸酶活性：应在室温下进行 RNase A 处理，且应在 37°C 下进行 DNase I 处理。
下游测定中性能不佳	<ul style="list-style-type: none"> 确保正确且充分执行清洗步骤。观看视频以更好地了解正确清洗技术。 在进行后续步骤之前，应去除和/或风干残留乙醇。 磁性分离后去除上清液步骤中，确保在不干扰磁珠的情况下，去除尽可能多的上清液。 一些纤维含量更高的组织（如肌肉），固定时会形成更广泛或更紧密的交联，因此延长解交联孵育时间可能会增加核酸功能。对于 DNA 分离，可在 80°C 下进行长达 3 小时的解交联孵育。不建议延长 RNA 分离的解交联孵育时间，因为延长时间会进一步降解 RNA。

【修订历史】

如需下载该产品的最新手册，请访问 www.beckman.com/techdocs。

初始发布版本 AA，2017 年 12 月

修订版 AB，2018 年 1 月

修订版 AC，2018 年 5 月

对以下章节进行了更新：

- 过程概述
- 故障排除指南

修订版 AD，2019 年 3 月

对以下章节进行了更新：

- 提供的材料

修订版 KG，2021 年 11 月

对以下章节进行了更新：

- 将英国地址和电话号码添加至第 2 页。

【说明书版本说明】

原文说明书文档版本：B44690KG，原文说明书生效日期：2021 年 11 月；

中文说明书文档版本：B44690KG -CN，中文说明书生效时间：2024 年 4 月；

中文说明书 B44690KG -CN 内容直接翻译自原文说明书 B44690KG。

www.beckman.com

