

Hướng dẫn sử dụng Kit tách chiết DNA

AmoyDx® FFPE DNA Kit

--- ☞ ☝ ---

I. Thành phần bộ kit

1. Các thành phần trong bộ kit

Tube No.	Component	Quantity
-	DNA Spin Columns	36 tubes/bag ×1
-	Collection Tubes (2 mL)	72 tubes/bag ×1
-	Centrifugal Tubes (1.5 mL)	72 tubes/bag ×1
1	Buffer DTL	10 mL/vial ×1
2	Proteinase K Solution	900 µL/tube ×1
3	Buffer DES	800 µL/tube ×1
4	Buffer DTB	10 mL/vial ×1
5	Buffer DW1 (concentrate)	13 mL/vial ×1
6	Buffer DW2 (concentrate)	6 mL/vial ×1
7	Buffer DTE	8 mL/vial ×1

*** Lưu ý:

+ Dung dịch đệm buffer DTB chứa muối guanidine, không tương thích với các chất khử trùng có chứa chất tẩy rửa hoặc các dung dịch có tính axit

+ Lần đầu tiên sử dụng, thêm 17 mL etanol (96 ~ 100%) vào Buffer DW1 (cô đặc) và trộn kỹ; thêm 24 mL etanol (96 ~ 100%) vào Buffer DW2 (cô đặc) và trộn kỹ. Đánh dấu tích lên nhãn chai.

Điều kiện bảo quản

Hạn sử dụng của kit là 12 tháng. Kit bảo quản ở nhiệt độ phòng 10-30oC

2. Các hóa chất, thiết bị cần thiết khác không có trong kit

- Ethanol 96-100%
- Xylene
- Máy ly tâm
- Vortex,
- Máy ly tâm nhanh
- Máy ủ nhiệt (37-90oC)
- Đầu côn sạch, vô trùng
- Bộ pipette đủ dải thể tích.
- Khuyến nghị: microtome thích hợp để cắt mô nhúng parafin có khả năng tạo ra các mặt cắt 5 ~ 10 µm.

3. Nguyên liệu đầu vào:

Quy trình cố định formalin và nhúng parafin tiêu chuẩn luôn dẫn đến sự phân mảnh đáng kể của axit nucleic. Để hạn chế mức độ phân mảnh DNA / RNA, hãy đảm bảo:

- 1) Cố định các mẫu mô trong dung dịch formalin trung tính 4 ~ 10% càng nhanh càng tốt sau khi phẫu thuật cắt bỏ.
- 2) Sử dụng thời gian cố định từ 14 ~ 24 giờ (thời gian cố định lâu hơn dẫn đến sự phân mảnh DNA / RNA nghiêm trọng hơn, dẫn đến hiệu suất kém trong các xét nghiệm sau).
- 3) Khử nước kỹ lưỡng các mẫu trước khi nhúng (formalin dư thừa có thể ức chế sự phân hủy Proteinase K).
- 4) Vật liệu ban đầu để tinh sạch DNA / RNA phải là các phần mô FFPE mới cắt, mỗi phần có độ dày lên đến 5 ~ 10 μm . (Các phần dày hơn có thể dẫn đến sản lượng DNA / RNA thấp hơn, ngay cả sau khi ủ lâu với proteinase K).
- 5) Diện tích mô FFPE phải là 0,5 ~ 1 cm^2 . Nếu diện tích bề mặt mô FFPE nhỏ hơn 0,5 cm^2 , vui lòng sử dụng nhiều phần hơn.
- 6) Thời gian lưu trữ của mẫu FFPE phải dưới ba năm.

4, Hướng dẫn phân đoạn các khối parafin

Để sử dụng bộ kit này, cần 5 ~ 10 μm phần mô trong khối parafin. Bạn có thể sử dụng bất kỳ phương pháp nào để cắt các khối parafin.

Các hướng dẫn chung để phân chia các khối parafin được nêu dưới đây:

- 1) Tránh nhiễm nuclease bằng cách sử dụng một chiếc nhíp và lưỡi cắt microtome sạch, sắc bén.
- 2) Khi xử lý nhiều mẫu, làm sạch lưỡi cắt microtome và nhíp bằng các chất khử hoạt tính RNase để tránh nhiễm chéo axit nucleic và RNase. Nên chiếu tia UV trong 10 phút sau khi làm sạch.
- 3) Luôn đeo găng tay cao su hoặc găng tay nitrile.
- 4) Cắt các đoạn dày 5 ~ 10 μm từ các khối parafin đã cắt tia với diện tích bề mặt mô khoảng 0,5 ~ 1 cm^2 .

II. Quy trình thực hiện:

1. Deparaffinization (loại paraffin):

- 1.1 Dùng dao cắt bỏ phần parafin thừa ra khỏi khối mẫu.
- 1.2 Cắt các phần có độ dày từ 5 ~ 10 μm và diện tích bề mặt từ 0,5 ~ 1 cm^2 .
- 1.3 Đặt ngay 2 ~ 5 phần vào ống ly tâm 1,5 mL.
- 1.4 Thêm 1 mL xylen, đóng nắp và xoáy mạnh trong 10 giây.
- 1.5 Ly tâm ở 13000 \times g trong 2 phút ở nhiệt độ phòng.
- 1.6 Loại bỏ phần nổi phía trên bằng pipet (không loại bỏ bất kỳ viên nào).
- 1.7 Thêm 1mL etanol (96 ~ 100%) vào viên bột và trộn bằng cách xoáy trong 10 giây.
- 1.8 Ly tâm ở 13000 \times g trong 2 phút ở nhiệt độ phòng.
- 1.9 Loại bỏ phần nổi phía trên bằng pipet (không loại bỏ bất kỳ viên nào).
- 1.10 Mở ống và ủ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút hoặc ở 37 $^{\circ}\text{C}$ trong 5 phút. Đảm bảo rằng tất cả etanol dư đã bay hơi trước khi tiếp tục

2. Tách chiết DNA:

*** Lưu ý: Lần đầu tiên sử dụng, bổ sung 17 mL etanol (96 ~ 100%) vào Buffer DW1 (đậm đặc), thêm 24 mL etanol (96 ~ 100%) vào Buffer DW2 (đậm đặc) và đánh dấu rõ ràng.

Trước khi tách chiết DNA, kiểm tra lọ dung dịch không bị rò rỉ. Lắc nhẹ các lọ dung dịch để trộn đều. Nếu trong lọ chứa kết tủa, hòa tan bằng cách đun nóng ở 50 $^{\circ}\text{C}$.

2.1 Thêm 180 μL Buffer DTL và 20 μL Proteinase K Solution vào ống mẫu trộn nhẹ bằng cách dùng pipet lên và xuống.

2.2 Ủ ở 56 $^{\circ}\text{C}$ trong 1 giờ để ly giải mẫu mô. Nếu mô chưa được ly giải hoàn toàn, hoặc cần nồng độ DNA cao hơn, hãy ủ thêm thời gian hoặc qua đêm.

2.3 Thêm 10 μL Buffer DES, vortex nhẹ và ly tâm nhanh (spin) trong 5 ~ 10 giây. Chuyển ống ly tâm máy ủ nhiệt và ủ ở 90 $^{\circ}\text{C}$ trong 1 giờ.

2.4 Ly tâm nhanh trong 5 ~ 10 giây. Nếu cần có DNA bộ gen không có RNA, hãy để mẫu nguội đến nhiệt độ phòng, thêm 2 μL RNase A (100 mg / mL) và ủ trong 5 phút ở nhiệt độ phòng.

2.5 Thêm 200 μL Buffer DTB và 200 μL etanol (96 ~ 100%), trộn bằng vortex.

2.6 Ly tâm nhanh trong 5 ~ 10 giây.

2.7 Chuyển toàn bộ dung dịch trên vào DNA Spin Column (trong ống thu 2 mL) mà không làm ướt vành, đậy nắp và ly tâm ở 10000 x g trong 1 phút.

2.8 Loại bỏ dung dịch bên dưới ống thu.

2.9 Thêm 600 μL Buffer DW1 vào cột DNA Spin Column, ly tâm ở 10000 x g trong 1 phút.

2.10 Loại bỏ dung dịch bên dưới ống thu.

2.11 Thêm 600 μL Buffer DW2 vào cột DNA Spin Column, ly tâm ở 10000 x g trong 1 phút.

2.12 Loại bỏ dung dịch bên dưới ống thu.

2.13 Đặt cột DNA Spin Column vào ống thu 2 mL sạch, ly tâm ở 13000 x g trong 3 phút.

2.14 Loại bỏ ống thu chứa dịch.

2.15 Đặt cột DNA Spin Column vào ống ly tâm 1,5 mL mới, sạch.

2.16 Bổ sung 30 ~ 100 μL Buffer DTE vào giữa màng. Không chạm vào màng.

2.17 Ủ ở nhiệt độ phòng (15 ~ 25 $^{\circ}\text{C}$) trong 2 ~ 5 phút.

2.18 Ly tâm ở 13000 x g trong 1 phút.

2.19 DNA thu được trong ống 1,5 có thể sử dụng ngay hoặc để bảo quản dưới -20 $^{\circ}\text{C}$.

*** Lưu ý: Giảm thể tích Buffer DTE thích hợp để thu được nồng độ DNA cao hơn.

Hạn chế:

- 1) Chất lượng của DNA được chiết tách phụ thuộc vào ảnh hưởng của các yếu tố như nguồn mẫu, quy trình lấy mẫu, formalin định hình, nhúng parafin và điều kiện bảo quản.
- 2) Chất lượng mẫu có tác động cao đến chất lượng và số lượng DNA / RNA tinh sạch.
- 3) Do các điều kiện cố định và nhúng, các axit nucleic trong các mẫu FFPE thường bị phân mảnh nhiều và bị biến đổi về mặt hóa học bởi formaldehyde. DNA / RNA chiết xuất từ mô FFPE không nên được sử dụng trong các ứng dụng hạ nguồn yêu cầu DNA / RNA có chiều dài đầy đủ.

Trung tâm Chăm sóc và Hỗ trợ Khách hàng – Công ty BCE Việt nam

Tại Hà Nội: Tel: 024 3234 5666 / 0913526170 Email: infors@bcevietnam.com.vn

Tại TP. HCM: Tel: 028 62905623 / 0913526170 Email: info.hcm@bcevietnam.com.vn