

版本号: DP170427

RNAPrep Pure FFPE Kit

RNAPrep Pure

石蜡包埋组织切片总 RNA 提取试剂盒

(离心柱型)

目录号: DP439

产品内容

产品组成	DP439 (50 preps)
裂解液 RF (Buffer RF)	12 ml
缓冲液 RB (Buffer RB)	12 ml
去蛋白液 RW1 (Buffer RW1)	40 ml
漂洗液 RW (Buffer RW)	12 ml
Proteinase K	500 μ l
RNase-Free ddH ₂ O (瓶装)	40 ml
RNase-Free 吸附柱 CR3 (含 2 ml 收集管) (RNase-Free Spin Column CR3 in a 2 ml Collection Tube)	50 套
DNase I(1500 U)	1 支
缓冲液 RDD (Buffer RDD)	4 ml
RNase-Free ddH ₂ O (管装)	1 ml
RNase-Free 离心管 (1.5 ml) (RNase-Free Centrifuge Tubes 1.5ml)	50 个

储存条件

DNase I, 缓冲液RDD和RNase-Free ddH₂O(管装)置于2-8°C保存; 其他试剂室温(15-25°C)保存。

产品简介

本试剂盒可从福尔马林固定石蜡包埋组织切片(以下简称FFPE)中提取总RNA。由于固定和包埋的条件限制, FFPE样本核酸通常发生片段化并且会被甲醛化学修饰, 因此较难提取, 本试剂盒提取的RNA可应用于RT-PCR等下游试验。

使用前注意事项:

1. 第一次使用前应在漂洗液 RW 中加入无水乙醇, 加入量请参见瓶上标签。
2. **DNase I 储存液的配制**

将 DNase I 干粉 (1500 U) 溶解在 550 μ l RNase-Free ddH₂O 中, 轻柔混匀, 分装后 -20°C 贮存 (可保存 9 个月)。

注意: 从 -20°C 融化后的 DNase I 储存液保存于 4°C (可保存 6 周), 不要再次冻存。

起始材料

1. 标准的福尔马林固定石蜡包埋程序也常常会造成核酸的片段化。为了尽量降低 RNA 片段化的可能性, 应该按照以下操作步骤进行样本处理:
 - 组织切除后应尽快浸入 4%-10% 的福尔马林溶液中;
 - 固定时间最好为 14-24 h (固定时间过长会导致 RNA 片段化更严重, 不利于下游的试验);
 - 样本包被之前必须彻底脱水。
 2. 应采用新鲜的 FFPE 组织切片, 切片厚度不超过 10 μ m, 切片过厚可能会造成 RNA 得率低, 每次制备采用的切片数应不超过 8 片, 表面积应不超过 250 mm^2 。
 3. 如果没有起始样本的信息, 建议初次制备采用的切片数应不超过 2 片, 然后根据 RNA 的得率和纯度, 下次制备采用的切片数可以进行调整, 但应不超过 8 片。
-

操作步骤

- 1 将石蜡样品切成 5-10 μm 厚的片状。
注意: 如果样品表面暴露于空气中, 最初的 2~3 片弃掉不用。
 - 2 迅速将 2-8 张切片置于 1.5 ml RNase-free 的离心管中, 加入 1 ml 二甲苯, 剧烈涡旋 10sec。
 - 3 室温(15-25 $^{\circ}\text{C}$), 12,000 rpm (~13,400 \times g)离心 2 min。
 - 4 用枪头吸除上清, 小心不要吸到沉淀。
 - 5 加入 1 ml 无水乙醇于沉淀中, 涡旋混匀。
 - 6 室温(15-25 $^{\circ}\text{C}$), 12000 rpm (~13,400 \times g)离心 2 min。
 - 7 用枪头吸除上清, 小心不要吸到沉淀 (用一个新的枪头小心吸出残余的乙醇)。
 - 8 打开管盖, 室温(15-25 $^{\circ}\text{C}$)或 37 $^{\circ}\text{C}$ 放置 10 min 直至残余的乙醇挥发完全。
注意: 完全去除残余的乙醇很重要, 残余的乙醇会对 RNA 产生影响。
 - 9 加入 200 μl 裂解液 RF 以及 10 μl Proteinase K 于沉淀中, 彻底涡旋混匀。
 - 10 55 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min 之后 80 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min。
 - 11 室温(15-25 $^{\circ}\text{C}$), 12,000 rpm(~13,400 \times g)离心 5 min, 转移上清入新的 RNase-Free 离心管中。
 - 12 加入 220 μl 的缓冲液 RB, 涡旋混匀。
 - 13 加入 660 μl 的无水乙醇, 涡旋混匀(可能会出现沉淀)。
 - 14 转移 700 μl 溶液和沉淀入吸附柱 CR3 中 (吸附柱放在收集管中), 12,000 rpm(~13,400 \times g)离心 1 min, 弃掉收集管中的废液, 将吸附柱放回收集管中。
 - 15 重复步骤 14, 直到所有的溶液和沉淀完全通过吸附柱 CR3, 弃废液, 将吸附柱 CR3 放回收集管中。
 - 16 DNase I 工作液的配制: 取 10 μl DNase I 储存液放入新的 RNase-Free 离心管中, 加入 70 μl RDD 溶液, 轻柔混匀。
 - 17 向吸附柱 CR3 中央加入 80 μl 的 DNase I 工作液, 室温放置 15 min。
-

-
- 18 向吸附柱 CR3 中加入 500 μ l 去蛋白液 RW1, 室温 (15-25°C), 12,000 rpm (~13,400 \times g)离心 30-60 sec, 弃废液, 将吸附柱放回收集管中。
 - 19 向吸附柱 CR3 中加入 500 μ l 漂洗液 RW (使用前请先检查是否已加入乙醇), 室温静置 2 min, 12,000 rpm (~13,400 \times g)离心 30-60 sec, 弃废液, 将吸附柱 CR3 放回收集管中。
 - 20 重复步骤 19。
 - 21 室温(15-25°C), 12,000 rpm (~13,400 \times g)离心 2 min, 倒掉废液。将吸附柱 CR3 置于室温放置数分钟, 以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。
注意: 此步骤目的是将吸附柱 CR3 中残余的漂洗液去除, 漂洗液的残留, 可能会影响后续的 RT 等实验。
 - 22 将吸附柱 CR3 转入一个新的 RNase-Free 离心管中, 向吸附膜的中间部位悬空滴加 30-100 μ l RNase-Free ddH₂O, 室温放置 2 min, 12,000 rpm (~13,400 \times g)离心 2 min, 得到 RNA 溶液。
注意: 洗脱缓冲液体积不应少于 30 μ l, 体积过小影响回收效率。RNA 溶液请于 -70°C 保存。配置胶用 RNA 专用系统。
-