

AllPure FFPE DNA and RNA Kit

FFPE RNA/DNA 共提试剂盒（消化分选）

产品简介

本产品是为石蜡包埋组织样品的RNA和DNA共提取而设计的。试剂盒可以从同一份石蜡包埋组织切片样品中提取得到RNA和DNA。试剂盒基于硅胶柱纯化技术，提取过程中无需使用有毒的酚氯仿抽提，也无需进行耗时的醇类沉淀，整个提取过程只需60分钟。纯化的RNA可直接用于RT-PCR、Northern blot、核酸保护和体外翻译等实验。纯化的DNA可直接用于PCR、Southern杂交等实验。

产品组成

产品编号	R5116-01	R5116-02	R5116-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure RNA Micro Columns	10	50	250
HiPure DNA Mini Column I	10	50	250
2ml Collection Tubes	20	100	500
Proteinase K	12 mg	50 mg	220 mg
Protease Dissolve Buffer	1.8 ml	5 ml	15 ml
Buffer DPS	10 ml	50 ml	250 ml
Buffer ATL	6 ml	30 ml	120 ml
Buffer AL	6 ml	30 ml	120 ml
Buffer GW1	13 ml	26 ml	2 x 66 ml
Buffer RW2*	10 ml	25 ml	3 x 50 ml
Nuclease Free Water	3 ml	20 ml	60 ml
说明书	1	1	1

保存条件

本产品可在室温(15~25℃)保存 18 个月。因 RNase Free Water 不含抑菌剂，室温放置或操作时可能会引入细菌或真菌污染，推荐分装保存于 2~8℃，以减少污染。

准备事项

- 在 Buffer RW2 中，按瓶子标签加入 4 倍体积无水乙醇，于室温保存。
- 在 Buffer GW1 中，按瓶子标签加入适量的无水乙醇，于室温保存。
- 溶解 Proteinase K (20mg/ml): 加入 Protease Dissolve Buffer 溶解 Proteinase K 至终浓度为 20mg/ml。轻轻振荡使之溶解，保存于-20~8℃。
- 福尔马林固定以及石蜡包埋程序会造成核酸的片段化，为了尽量降低 DNA/RNA 片段化的可能性，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 14-24h，样本包被之前必须彻底脱水。切片厚度不超过 20 μm，切片数应不超过 8 片，表面积应不超过 250 mm²。初次实验时，用的切片数应不超过 3 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 5 片。

方案. 石蜡包埋组织总RNA和DNA共提取

1. 用干净刀片去除多余石蜡，把石蜡包埋组织样品切成 5-20μm 的切片，若样品已暴露在空气中，去除表面的 2-3 个切片，选择二甲苯或安全型脱蜡液去除石蜡。
 - 用二甲苯去除石蜡
 - A1. 转移 1-5 个切片至 1.5ml 离心管中，加入 1ml 二甲苯，涡旋混匀 10~15 秒让石蜡充分溶解，14,000 x g 离心 3 分钟收集组织样品，小心倒弃上清液。
 - A2. 加入 1ml 100%乙醇，涡旋 5 秒，14,000 x g 离心 3 分钟，小心倒弃上清液。短暂离心吸尽全部残液。打开管盖，室温干燥 15~20 分钟去除乙醇。
 - 用安全型脱蜡液 (Buffer DPS) 去除石蜡
 - B1. 转移 1-5 个切片至 1.5ml 离心管中，加入 0.8~1.0ml Buffer DPS (脱蜡液)，涡旋 10 秒，56℃温育 5 分钟。
 - B2. 14,000 x g 离心 3 分钟收集组织样品，小心彻底吸弃脱蜡液，按第三步进行操作。

当石蜡较多时，脱蜡液 DPS 与石蜡比例不够时，常温下脱蜡液/石蜡会固化而影响操作。此时可以加入更多的脱蜡液 Buffer DPS, 56℃再温育 1-3 分钟充分溶解。若石蜡去除不充分时，吸弃脱蜡液后再重复第二次脱蜡以充分去除石蜡。
2. 加入 230μl Buffer ATL 和 20μl Proteinase K 至样品中，混匀，55℃温育 15 分钟。
3. 冰上放置 5 分钟，室温下，15,000 x g 离心 15 分钟。

4. 转移 200 μ l 上清液至新的 1.5ml 离心管，按第 5 步进行 RNA 提取；余下~50 μ l 残液和沉淀按第 14~23 步用于 DNA 抽提。

此时 DNA 沉淀可以在室温保存 6 小时，在 2-8 $^{\circ}$ C 保存一天，在 -20 $^{\circ}$ C 可长期保存。

RNA 抽提

5. 把第 4 步得到的含 RNA 上清液，80 $^{\circ}$ C 水浴 15~30 分钟。
80 $^{\circ}$ C 温育可以逆转被甲醛修饰的核酸。受甲醛固定时间的影响，有部分样品可能需要延长 80 $^{\circ}$ C 的温育时间至 30 分钟，或 60 分钟来提高产量和扩增效率。可以根据下游应用和样品情况，延长或缩短 80 $^{\circ}$ C 温育时间，但最短不要低于 15 分钟。
6. 加入 200 μ l Buffer AL 至样品中，涡旋混匀 5 次。
7. 加入 300 μ l 无水乙醇至样品中，涡旋混匀 5 秒。
若提取 mi RNA 时，加入 800 μ l 无水乙醇。
8. 把 HiPure RNA Micro Column 装在 2ml 收集管中。转移不超过 750 μ l 混合液至柱子中。
10,000 \times g 离心 1 分钟。
9. 倒弃滤液把柱子装在收集管中，转移剩余混合液至柱子，10,000 \times g 离心 1 分钟。
10. 倒弃滤液把柱子装在收集管中，加入 500 μ l Buffer GW1，10,000 \times g 离心 1 分钟。
11. 倒弃滤液把柱子装在收集管中，加入 500 μ l Buffer RW2，10,000 \times g 离心 1 分钟。
12. 倒弃滤液把柱子装在收集管中，加入 500 μ l Buffer RW2，10,000 \times g 离心 1 分钟。
13. 倒弃滤液，把柱子装在收集管中，13,000 \times g 离心空柱 3 分钟以甩干柱子的基质。
14. 将柱子转移至新的 1.5ml 离心管，加入 20~50 μ l Nuclease Free Water 至柱子的膜中央。
静置 2 分钟，13,000 \times g 离心 1 分钟。弃去柱子，把 RNA 保存于 -80 $^{\circ}$ C。

DNA 抽提

15. 取第 4 步的 DNA 沉淀和残液，加入 150 μ l Buffer ATL 和 20 μ l Proteinase K，涡旋重悬沉淀，
55 $^{\circ}$ C 温育 1 小时，90 $^{\circ}$ C 温育 1~2 小时。
若需要彻底去除 RNA，恢复至室温，再加入 5 μ l RNase A (自配)，混匀，静置 10 分钟。
16. 短暂离心，加入 200 μ l Buffer AL 至样品中，涡旋混匀 5 次。
17. 加入 300 μ l 无水乙醇至样品中，涡旋混匀 5 秒。
18. 把 HiPure DNA Mini Column I 装在 2ml 收集管中，转移全部混合液至柱子中。10,000 \times g

离心 1 分钟。

19. 倒弃滤液把柱子装在收集管中，加入 500 μ l Buffer GW1，10,000 \times g 离心 1 分钟。
20. 倒弃滤液把柱子装在收集管中，加入 500 μ l Buffer RW2，10,000 \times g 离心 1 分钟。
21. 倒弃滤液把柱子装在收集管中，加入 500 μ l Buffer RW2，10,000 \times g 离心 1 分钟。
22. 倒弃滤液，把柱子装在收集管中。13,000 \times g 离心空柱 3 分钟以甩干柱子的基质。
23. 将柱子转移至新的 1.5ml 离心管，加入 50~100 μ l Nuclease Free Water 至柱子的膜中央。静置 5 分钟，10,000 \times g 离心 1 分钟。弃去柱子，把 DNA 保存于-80 $^{\circ}$ C。

常见问题

该列表可能有利于您解决在提取过程中所碰到的问题。Magen 的技术人员可以随时为您提供咨询服务，若您对试剂盒存在疑问或有良好的建议，又或者您在分子生物学实验中碰到问题，都请您联系我们。我们将竭尽所能为您排忧解难。

现象	原因及解决方法
RNA 产量低	
样品的起始用量太多	参照上面
乙醇残留	脱蜡时，干燥时间不够，有乙醇残留。
切片太厚	石蜡组织切片太厚，不要超过 10 μ m。
石蜡残留	二甲苯去除石蜡不彻底。
RNA 降解	
样品中 RNA 已经降解	石蜡包埋组织 RNA 在固定，包埋及保存过程都会发生降解。
RNA 酶污染	操作过程引入 RNA 酶的污染。
下游实验结果不理想	
盐分污染	加入 Buffer RW2 后，静置 5 分钟后，再离心。
乙醇污染	确保空柱离心速度高于或等于 12,000xg，离心时间为 2 分钟。
膜材料脱落	硅胶膜在离心过程中可能会发生脱落。脱落到质粒中硅胶膜是不溶解的，可能过 12,000xg 离心 2 分钟去除。