

## AllPure FFPE DNA and RNA Kit

FFPE RNA/DNA 共提试剂盒（结合分选）

### 产品简介

本产品是专门为石蜡包埋组织样品的RNA和DNA同时提取而设计的。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30分钟（不计消化时间）。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。

### 产品组份

产品编号	R5115-01	R5115-02	R5115-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure RNA Micro Columns	10	50	250
HiPure DNA Mini Columns I	10	50	250
2ml Collection Tubes	20	100	2 x 250
Buffer DPS (脱蜡液)	10 ml	50 ml	250 ml
Proteinase K	12 mg	24 mg	120 mg
Protease Dissolve Buffer	1.8 ml	1.8 ml	10 ml
Buffer ATL	5 ml	20 ml	80 ml
Buffer GXP	6 ml	30 ml	150 ml
Buffer GW1	13 ml	26 ml	2 x 66 ml
Buffer RW2*	6 ml	50 ml	3 x 50 ml
Nuclease Free Water	3 ml	10 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。

## 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体积无水乙醇，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，分装保存于-20℃。
- 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 mm<sup>2</sup>。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

### ● 方案 A: 去除脱蜡液流程

1. 用干净刀片去除多余石蜡，把石蜡包埋组织样品切成 10-20μm 的切片，若样品已暴露在空气中，去除表面的 2-3 个切片。转移 1~6 个切片至 1.5ml 离心管中，加入 0.8~1.0 ml Buffer DPS，涡旋混匀 10 秒，56℃温育 5 分钟让石蜡充分溶解。

当石蜡较多时，脱蜡液与石蜡比例不够时，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(总体积 1.5-1.8ml)，56℃温育 1-3 分钟充分溶解。若石蜡去除不充分时，吸弃脱蜡液后再进行第二次脱蜡以充分去除石蜡。

2. 13,000 x g 离心 3 分钟收集组织切片，小心倒弃上清液，反扣于吸水纸上吸尽残液。残留少量的脱蜡液不影响操作。
3. 加入 250μl Buffer ATL 和 20μl Proteinase K 至样品中，涡旋 5 秒，55℃振荡温育 60 分钟，90℃温育 60 分钟。

55℃温育时间可以延长至过夜。

4. 13,000 x g 离心 3 分钟去除杂质，转移上清液 (~250µl) 至新的离心管中，按 5 步进行操作。

● **方案 B: 不去除脱蜡液流程**

1. 用干净刀片去除多余石蜡。把样品切成厚度为 10-20µm 的切片。若样品已暴露在空气中，去除表面的 2-3 个切片。转移 1~3 个切片至 1.5ml 离心管中，加入 ~0.6ml Buffer DPS (脱蜡液) 至样品中，涡旋混匀 10 秒，56°C 温育 3~5 分钟让石蜡充分溶解。
2. 13,000 x g 离心 3 分钟让组织碎片沉淀至管底。
3. 加入 250µl Buffer ATL 至离心管底部，然后再加入 20µl Proteinase K 至离心管底部，并轻轻吸打 6~8 次。55°C 温育 60~120 分钟，90°C 温育 60 分钟。  
不要振荡温育以防止 Buffer ATL 和脱蜡液发生乳化发生，影响消化效果。
4. 13,000 x g 离心 3 分钟，转移下层消化液 (~250µl) 至新的离心管中，按 5 步进行操作。离心后，脱蜡液/石蜡在上层，含 RNA 的消化液在下层溶液，转移下层消化液至新的离心管中，转移少量的脱蜡液不影响的提取。

● **方案 C: 无需脱蜡步骤**

1. 用干净刀片去除多余石蜡。把样品切成厚度为 10-20µm 的切片。若样品已暴露在空气中，去除表面的 2-3 个切片。转移 1~4 个切片至 1.5ml 离心管中，13,000 x g 离心 3 分钟让切片尽量沉淀至管底。
2. 加入 300µl Buffer ATL 和 20µl Proteinase K 至样品中，60°C 振荡温育 120 分钟。90°C 温育 60 分钟。
3. 13,000 x g 离心 3 分钟去除杂质。
4. 小心用移液器拨开石蜡层，转移 250µl 下层消化液至新的离心管中，按 5 步进行操作。离心后，石蜡会固定并漂浮在消化液的上面。

**DNA 抽提**

5. 加入 500µl Buffer GXP 至消化液中，涡旋混匀 5~10 秒，室温放置 3-5 分钟。  
Buffer ATL/GXP 混匀后，若有沉淀不能充分溶解，37~55°C 温育 1-3 分钟让 SDS 充分溶解。
6. 把 HiPure DNA Mini Columns I 装在 2ml 收集管，转移全部混合液至柱子中。10,000 x g

离心 30~60 秒，保存滤液，按第 14~22 步进行用于 RNA 提取。

7. 把柱子装在新的收集管中，加入 500 $\mu$ l Buffer GW1 至柱子。10,000  $\times$  g 离心 30-60 秒。
8. 倒弃滤液把柱子装在收集管中，加入 500 $\mu$ l Buffer RW2。10,000  $\times$  g 离心 30-60 秒。
9. 倒弃滤液把柱子装在收集管中，加入 500 $\mu$ l Buffer RW2。10,000  $\times$  g 离心 30-60 秒。
10. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。10,000  $\times$  g 离心 2 分钟甩干柱子的基质。
11. 将柱子转移至新的 1.5ml 离心管，加入 50~100 $\mu$ l 预热 55 $^{\circ}$ C 至 Nuclease Free Water 至柱子的膜中央。放置 3 分钟，10,000  $\times$  g 离心 1 分钟。
12. 把洗脱液再转移至柱子的膜中央，放置 3 分钟，10,000  $\times$  g 离心 1 分钟。
13. 丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存于 2-8 $^{\circ}$ C，长期保存需保存于-20 $^{\circ}$ C。

### RNA 抽提

14. 在 2ml 收集管的滤液（第 6 步）中，加入 700 $\mu$ l 无水乙醇，用移液器吸打混匀 3-5 次。  
若需抽提 micro RNA，无水乙醇体积调整为 1100 $\mu$ l。
15. 把 HiPure RNA Micro Column 装在收集管中。转移一半体积的混合液至柱子中。10,000  $\times$  g 离心 30-60 秒。
16. 倒弃滤液把柱子装在收集管中。转移剩余混合液至柱子中。10,000  $\times$  g 离心 30-60 秒。
17. 倒弃滤液把柱子装在收集管中，加入 500 $\mu$ l Buffer GW1。10,000  $\times$  g 离心 30-60 秒。
18. 倒弃滤液把柱子装在收集管中，加入 500 $\mu$ l Buffer RW2。10,000  $\times$  g 离心 30-60 秒。
19. 倒弃滤液把柱子装在收集管中，加入 500 $\mu$ l Buffer RW2。10,000  $\times$  g 离心 30-60 秒。
20. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。12,000  $\times$  g 离心 2 分钟甩干柱子的基质。
21. 将柱子转移至新的 1.5ml 离心管，加入 30-50 $\mu$ l RNase Free Water 至柱子的膜中央。静置 1 分钟。12,000  $\times$  g 离心 1 分钟。
22. 弃去柱子，把 RNA 保存于-80 $^{\circ}$ C。