

版本号: FRHI1109

FinePure FFPE RNA Kit

FinePure 固定组织 RNA 提取试剂盒

(离心柱型)

目录号:FR601

产品内容:

Contents	FR601 (50 preps)
Buffer RF	15 ml
Buffer RB	15 ml
Buffer RW	40 ml
Buffer RW2	12 ml
RNase Free ddH ₂ O	15 ml
Proteinase K	1.2 ml
DNase I (2,000 U)	1 瓶
DNase I Buffer	4 ml
RNAPure Spin Columns	50 个
2 ml Collection Tubes	50 个
1.5 ml RNase Free Microcentrifuge Tubes	50 个

储存条件:

本试剂盒中的 DNase I 组分采用冰袋运输, 收到后立即将 DNase I 置于 2-8°C 保存, 其他试剂室温(15-25°C)保存。

本产品仅供科研使用。请勿用于医药、临床治疗、食品及化妆品等用途。

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。

DNase I母液的配制：

先用 1 ml 注射器吸取 550 μ l RNase Free ddH₂O，然后打进装有 DNase I 干粉 (2,000 U) 的玻璃瓶中，轻柔混匀，分装后-20 $^{\circ}$ C贮存 (可保存 9 个月)。(如果需要另外购买 DNase I, 目录号：RA102-01)。

注意：从-20 $^{\circ}$ C融化后的DNase I母液保存于4 $^{\circ}$ C (可保存6周)，不要再次冻存。

注意事项：

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 mm²。
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。
4. 所有离心步骤均在室温下进行。

操作步骤：

使用前请先在 Buffer RW2 中加入无水乙醇，加入体积请参照瓶上的标签。

1. 样本处理：
 - a.石蜡切片：取石蜡切片 (5-10 μ m 厚，1 \times 1 cm²大小) 5-8 张。
 - b.石蜡块：手术刀刮取约 30 mg 的组织样本 (尽量去除多余的石蜡)。

注意：如果样品表面暴露于空气中，最初刮取的 2-3 片弃掉不用。

-
- c.福尔马林等固定液中的样本：取 30 mg 样本，用手术刀切为数块，置于 1.5 ml 离心管中，加入 500 μ l PBS(10 mM, pH7.4)涡旋振荡混匀，12,000 rpm 离心 1 min，重复 2 次，然后从步骤 7 开始操作。
2. 将石蜡切片或石蜡块样本装于 1.5 ml 无菌离心管中，加入 1 ml 二甲苯，剧烈涡旋 10 sec，静置 1 min。
 3. 12,000 rpm 离心 2 min。
 4. 用吸头吸除上清，小心不要吸到沉淀。
 5. 加入 1 ml 无水乙醇到上述管中，涡旋混匀 10 sec。
 6. 12,000 rpm 离心 2 min。
 7. 用吸头吸除上清，小心不要吸到沉淀（用一个新的吸头小心吸出残余的乙醇）。
 8. 打开管盖，室温(15-25 $^{\circ}$ C)或 37 $^{\circ}$ 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 μ l Buffer RF 和 10 μ l Proteinase K 到上述沉淀块中，涡旋振荡混匀。
 10. 置于 55 $^{\circ}$ C 孵育 15 min 后再进行 80 $^{\circ}$ C 孵育 15 min。
 11. 12,000 rpm 离心 5 min，转移上清入新的 RNase Free 离心管中。
 12. 加入 220 μ l 的 Buffer RB，涡旋混匀。
 13. 加入 660 μ l 的无水乙醇，涡旋混匀（可能会出现沉淀）。
 14. 转移 700 μ l 溶液和沉淀至吸附柱 RNAPure Spin Columns 中（吸附柱放在收集管中），12,000 rpm 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，弃废液，将吸附柱放回收集管中。
 16. DNase I 工作液的配制：取 10 μ l DNase I 母液放入新的 RNase Free 离心管中，加入 70 μ l DNase I Buffer，轻柔混匀。
 17. 加入 80 μ l 的 DNase I 工作液向吸附柱中央，室温放置 15 min。
 18. 加入 500 μ l Buffer RW 到吸附柱中，12,000 rpm 离心 30 sec。
 19. 加入 500 μ l Buffer RW2（使用前请先检查是否已加入乙醇）到吸附柱中，12,000 rpm 离心 30 sec，弃废液，将吸附柱放回收集管中。
 20. 重复操作步骤 19 一次。
 21. 12,000 rpm 离心 3 min，倒掉废液。将吸附柱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。
 22. 将吸附柱转入一个新的 1.5 ml RNase Free Microcentrifuge Tubes 中，向吸附膜的中间

部位悬空滴加 30-100 μl RNase Free ddH₂O, 室温放置 1 min, 12,000 rpm 离心 1 min, 得到 RNA 溶液。

注意：洗脱缓冲液体积不应少于 30 μl , 体积过小影响回收效率。RNA 溶液请于-70°C 保存。