

版本号: FRI1402

FinePure FFPE DNA/RNA Kit

FinePure 固定组织 DNA/RNA 共提取试剂盒

(离心柱型)

目录号:FR603

产品内容:

Contents	FR603 (50 preps)
Buffer FDA	15 ml
Buffer MDA	15 ml
Buffer GHL	40 ml
Buffer DW	30 ml
Buffer DW2	12 ml
Buffer TB	15 ml
Proteinase K	2 x 1.2 ml
FinePure Mini Spin Columns	2 x 50 个
2 ml Collection Tubes	2 x 50 个
1.5 ml RNase Free Microcentrifuge Tubes	2 x 50 个
RNase A(10 mg/ml)	300 µl
DNase I (2,000 U)	1 瓶
DNase I Buffer	4 ml
Buffer RB	15 ml
Buffer FRW	40 ml
Buffer RW2	12 ml
RNase Free ddH ₂ O	15 ml

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：

本试剂盒可以从福尔马林固定、石蜡包埋组织样本中同时提取基因组DNA和总RNA。根据DNA和RNA在裂解液中的溶解度不同，在特殊的裂解液条件依次释放组织切片中的DNA和RNA，克服了福尔马林交联造成的抑制效应。该试剂盒通过特异性结合DNA和RNA的离心吸附柱和独特的缓冲液系统，将高品质的DNA和RNA纯化至小洗脱体积中。由于固定和包埋的条件不同，FFPE样本中提取得到的DNA和RNA多为片段化的核酸，完整性要低于新鲜或冷冻样本。提取的DNA和RNA纯度高，质量稳定可靠，使用本试剂盒提取的FFPE DNA和RNA可适用于多种下游应用，如PCR和Real-time PCR；SNP基因分析STR基因分析；药物基因组学研究。

产品特点：

样本广泛：可从福尔马林固定、石蜡包埋组织、福尔马林等固定液中的组织中分离纯化基因组DNA和RNA。

轻松提取：轻松提取纯化高品质，高得率的即用型DNA和RNA，结果重复性好。

稳定可靠：彻底去除污染物和PCR抑制剂。

注意事项：

- 1 拿到样品后要尽快在4-10%的福尔马林中固定，固定时间以8-24 h内为宜，时间过长导致基因组断裂，影响下游实验。
- 2 确保包埋前的样品彻底脱水，残留的福尔马林会抑制PCR检测酶的作用。
- 3 本产品适用于医学、科学实验研究。
- 4 本产品所提DNA的完整性依赖于样本类型、储存时间以及固定条件。如果甲醛固定时间过长或样本存放时间过久(>1年)则易导致DNA完整性受损，无法扩出长片段。
- 5 若缓冲液FDA、MDA、GHL、RB中有沉淀，可在60℃水浴中重新溶解，摇匀后使用。
- 6 试剂盒中各试剂在使用前应按照说明书要求操作，所有离心步骤均在室温下进行。

DNase I母液的配制：

先用1 ml注射器吸取550 µl 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℃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℃融化后的DNase I母液保存于4℃ (可保存6周)，不要再次冻存。

操作步骤：

使用前请先在 Buffer DW2 和 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 μm 厚，1×1 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 μl 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，弃上清。（**注意：不要倒掉沉淀。**）

4. 加入 1 ml 无水乙醇到上述管中，涡旋混匀 10 sec。

5. 12,000 rpm 离心 2 min，弃上清。（**注意：不要倒掉沉淀。**）

6. 室温放置 5-10 min，充分挥发乙醇。

7. 加入 150 μl Buffer FDA 和 10 μl Proteinase K 到上述沉淀块中，涡旋振荡混匀。

8. 置于 56 °C 孵育 15 min。

9. 冰上放置 3 min。

10. 13,000 rpm 离心 15 min。

11. 轻轻转移上清到新的离心管中进行 RNA 的提取（步骤 12-25），保留沉淀块进行 DNA 的提取（步骤 26-34 ）。

RNA 的提取纯化：

12. 将步骤 11 中的上清溶液置于 80 °C 孵育 15 min。

13. 加入 220 μl 的 Buffer RB，涡旋混匀。

14. 加入 660 μl 的无水乙醇，涡旋混匀（可能会出现沉淀）。

15. 转移 700 μl 溶液和沉淀至吸附柱 FinePure Mini 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。
16. 重复步骤 15 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。
 17. 加入 350 μ l Buffer FRW 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。
 18. 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。
 19. 加入 80 μ l 的 DNase I 工作液向吸附柱中央, 室温放置 15 min。
 20. 加入 350 μ l Buffer FRW 到吸附柱中, 12,000 rpm 离心 30 sec。
 21. 将收集管中的滤液重新加入吸附柱中, 12,000 rpm 离心 30 sec。
 22. 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。
 23. 重复步骤 22。
 24. 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。
 25. 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 μ l RNase Free ddH₂O, 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 μ l, 体积过小影响回收效率。RNA 溶液请于-70 $^{\circ}$ C 保存。

DNA 的提取纯化:

26. 在步骤 11 中得到的组织沉淀块中加入 200 μ l Buffer FDA 和 20 μ l Proteinase K, 充分混匀, 56 $^{\circ}$ C 孵育 1 h 直至样本完全裂解。
可选步骤: 如果需要制备无 RNA 污染的 DNA, 加入 4 μ l RNase A (10 mg/ml, FA101-02) 混匀后, 室温放置 2 min。
27. 置于 90 $^{\circ}$ C 静止孵育 1 h, 期间不要搅动, 然后冷却至室温。
28. 加入 700 μ l Buffer GHL, 涡旋震荡充分混匀, 短暂离心使管壁上的溶液收集到管底。
29. 将上一步所得的混合液加入一个吸附柱 FinePure Mini Spin Columns 中, 8,000 rpm 离心 2 min, 倒掉废液, 重新将吸附柱放回收集管中。
注意: 吸附柱最大容量为 700 μ l, 可将剩余液体重复上述步骤上柱。

-
30. 加入 500 μ l Buffer DW 到吸附柱中，8,000 rpm 离心 30 sec，倒掉收集管中的废液，将吸附柱放回收集管中。
 31. 加入 500 μ l Buffer DW2（使用前请先检查是否已加入乙醇）到吸附柱中，8,000 rpm 离心 30 sec，倒掉废液，将吸附柱放回收集管中。
 32. 重复操作步骤 31。
 33. 将吸附柱放回收集管中，12,000 rpm 离心 3 min，倒掉废液。
 34. 将吸附柱转入一个干净的离心管中，向吸附膜的中间部位悬空滴加 65 $^{\circ}$ C 预热的 30-100 μ l Buffer TB 洗脱，12,000 rpm 离心 1 min，将收集有 DNA 的离心管-20 $^{\circ}$ C 保存。

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。为增加基因组 DNA 的得率，可将离心得到的溶液再加入吸附柱中，室温放置 2 min，12,000 rpm 离心 2 min。洗脱液的 pH 对于洗脱效率有很大影响，若用 ddH₂O 做洗脱液应保证其 pH 值在 7.0-8.5 范围内，pH 值低于 7.0 会降低洗脱效率；且 DNA 产物应保存在-20 $^{\circ}$ C，以防 DNA 降解。