

版本号: DP220706

# 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)
DP 439	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
	蛋白酶K (Proteinase K)	500 $\mu$ l
	无RNA酶双蒸水 (RNase-Free ddH <sub>2</sub> O)	40 ml
	RNase-Free吸附柱CR3 (含2 ml收集管) (RNase-Free Columns CR3 set)	50 套
	RNase-Free离心管 (1.5 ml) (RNase-Free Centrifuge Tubes (1.5 ml))	50 个
RT411	RNase-Free DNase I (1500 U)	1 支
	RDD缓冲液 (DNA消化缓冲液) (Buffer RDD (DNA Digest Buffer))	4 ml
	无RNA酶双蒸水 (RNase-Free ddH <sub>2</sub> O)	1 ml

**备注: DP 439和RT411组分独立运输和分装**

#### 储存条件

RNase-Free DNase I和RDD缓冲液置于2-8℃保存, 可保存15个月; 其他试剂室温(15-30℃)保存, 可保存15个月。加入 $\beta$ -巯基乙醇的裂解液RL 2-8℃可放置一个月。

---

## 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  $\mu$ l RNase-Free ddH<sub>2</sub>O中，轻柔混匀，分装后-30~-15 $^{\circ}$ C贮存（可保存9个月）。

**注意：从-30~-15 $^{\circ}$ C融化后的DNase I储存液保存于2-8 $^{\circ}$ 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  $\mu$ 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<sup>2</sup>。

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  $\mu\text{m}$ 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10 sec。

3. 室温, 12,000 rpm ( $\sim 13,400\times g$ )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, 12000 rpm ( $\sim 13,400\times g$ )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  $\mu\text{l}$  裂解液RF以及10  $\mu\text{l}$  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, 12,000 rpm ( $\sim 13,400\times g$ )离心5 min, 转移上清入新的RNase-Free离心管中。

12. 加入220  $\mu\text{l}$  的缓冲液RB, 涡旋混匀。

13. 加入660  $\mu\text{l}$ 的无水乙醇, 涡旋混匀(可能会出现沉淀)。

14. 转移700  $\mu\text{l}$ 溶液和沉淀入吸附柱CR3中 (吸附柱放在收集管中), 12,000 rpm ( $\sim 13,400\times g$ )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  $\mu\text{l}$  DNase I 储存液放入新的RNase-Free离心管中, 加入70  $\mu\text{l}$  RDD缓冲液, 轻柔混匀。

17. 向吸附柱CR3中央加入80  $\mu\text{l}$ 的DNase I 工作液, 室温放置15 min。

---



TIANGEN 官方微信，专业服务助力科研：

- 可视化操作指南
- 技术公开课合辑
- 全线产品查询
- 在线专家客服
- 微信直播课堂
- 最新优惠活动

18. 向吸附柱CR3中加入500  $\mu\text{l}$  去蛋白液RW1，室温，12,000 rpm ( $\sim 13,400 \times g$ )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  $\mu\text{l}$ 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 ( $\sim 13,400 \times g$ )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，12,000 rpm ( $\sim 13,400 \times g$ )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  $\mu\text{l}$  RNase-Free ddH<sub>2</sub>O，室温放置2 min，12,000 rpm ( $\sim 13,400 \times g$ )离心2 min，得到RNA溶液。

**注意：**洗脱缓冲液体积不应少于30  $\mu\text{l}$ ，体积过小影响回收效率。RNA溶液请于-70 $^{\circ}\text{C}$ 保存。配置胶用RNA专用系统。