

## AllPure FFPE DNA and RNA Kit B

FFPE RNA/DNA 共提试剂盒 B

### 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。

### 产品组份

产品编号	R5116-01B	R5116-02B	R5116-03B
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure RNA Mini Columns I	10	50	250
HiPure DNA Mini Columns I	10	50	250
2ml Collection Tubes	20	100	500
Buffer DPS (脱蜡液)	10 ml	50 ml	250 ml
Proteinase K Solution	0.6 ml	2.5 ml	12 ml
Buffer FRL	3 ml	15 ml	65 ml
Buffer RLC	3 ml	15 ml	60 ml
Buffer RW2*	5 ml	20 ml	2 x 50 ml
RNase Free Water	1.8 ml	10 ml	30 ml
Buffer ATL	3 ml	15 ml	60 ml
Buffer AL	3 ml	15 ml	60 ml
Buffer GW1*	6.6 ml	13 ml	66 ml
Buffer GW2*	6 ml	20 ml	2 x 50 ml
Elution Buffer	1.8 ml	10 ml	30 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。Proteinase K Solution 室温运输，长期保存时，建议保存于 2~8℃。

## 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 GW2 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 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

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，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 1-6 个切片至 1.5ml 离心管中，加入 1ml 二甲苯，涡旋混匀 10 秒让石蜡充分溶解。14,000 x g 离心 3 分钟，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 分钟去除乙醇。
  - 用安全型脱蜡液 (Buffer DPS) 去除石蜡

B1. 转移 1-6 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°C 温育 5 分钟让石蜡充分溶解。

B2. 14,000 × g 离心 3 分钟收集组织，小心彻底吸弃脱蜡液，按第 2 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°C 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 FRL 和 20µl Proteinase K 至样品中，混匀，55°C 温育 15~30 分钟。

处理只有 1-3 个切片时，这一步消化时间控制在 15 分钟。处理 3-6 个切片时，这一步消化时间控制在 20-30 分钟。消化时间延长 RNA 产量越高，但也会引起 DNA 的产量损失。

3. 冰上放置 5 分钟，室温下，15,000 × g 离心 15 分钟。

4. 转移 200µl 上清液至新的 1.5ml 离心管，按第 5 步进行 RNA 提取；余下~30µl 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°C 保存一天，在 -20°C 可长期保存。

## RNA 抽提

5. 把第 4 步得到的含 RNA 上清液，80°C 水浴 15~30 分钟。

80°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°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°C 温育时间，但最短不要低于 15 分钟。

6. 加入 200µl Buffer RLC 至样品中，涡旋混匀 5 次。

7. 加入 300µl 无水乙醇至样品中，涡旋混匀 5 秒，室温静置 5 分钟。

若提取 mi RNA 时，加入 800µl 无水乙醇。

8. 把 HiPure RNA Micro Column 装在 2ml 收集管中。转移不超过 750µl 混合液至柱子中。10,000 × 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 × g 离心 1 分钟。

10. 倒弃滤液把柱子装在收集管中，加入 500µl Buffer RW2，10,000 × g 离心 1 分钟。

11. 倒弃滤液把柱子装在收集管中，加入 500µl Buffer RW2，10,000 × g 离心 1 分钟。

12. 倒弃滤液，把柱子装在收集管中，13,000 × g 离心空柱 3 分钟以甩干柱子的基质。
13. 将柱子转移至新的 1.5ml 离心管，加入 20~50µl Nuclease Free Water 至柱子的膜中央。静置 2 分钟，13,000 × g 离心 1 分钟。弃去柱子，把 RNA 保存于-80°C。

## DNA 抽提

14. 取第 4 步的 DNA 沉淀和残液，加入 180µl Buffer ATL 和 20µl Proteinase K，涡旋重悬沉淀，55°C 温育 1 小时，90°C 温育 1~2 小时。  
若需要彻底去除 RNA，恢复至室温，加入 5µl RNase A (自配)，混匀，静置 10 分钟。
15. 短暂离心，加入 200µl Buffer AL 至样品中，涡旋混匀 5 次。
16. 加入 200µl 无水乙醇至样品中，涡旋混匀 5 秒。
17. 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 × g 离心 1 分钟。
18. 倒弃滤液把柱子装在收集管中，加入 500µl Buffer GW1，10,000 × g 离心 1 分钟。
19. 倒弃滤液把柱子装在收集管中，加入 500µl Buffer GW2，10,000 × g 离心 1 分钟。
20. 倒弃滤液把柱子装在收集管中，加入 500µl Buffer GW2，10,000 × g 离心 1 分钟。
21. 倒弃滤液，把柱子装在收集管中。13,000 × g 离心空柱 3 分钟以甩干柱子的基质。
22. 将柱子转移至新的 1.5ml 离心管，加入 30~50µl 预热至 55°C Elution Buffer 至柱子的膜中央。静置 3 分钟，10,000 × g 离心 1 分钟。
23. 再加入 30~50µl 预热至 55°C Elution Buffer 至柱子的膜中央。静置 3 分钟，10,000 × g 离心 1 分钟。弃去柱子，把 DNA 保存于-80°C。