



RNApure FFPE Kit

固定组织RNA提取试剂盒

目录号： CW0535S (50 preps)

保存条件： DNase I及10×Reaction Buffer -20℃保存，其它组分室温（15-30℃）。

产品内容

Component	CW0535S 50 preps
DNase I	1000 U
10×Reaction Buffer	1000 μl
Buffer DS	30 ml
Buffer GTL	15 ml
Buffer GL	25 ml
Proteinase K	12.5 mg
Proteinase K Storage Buffer	1.25 ml
Buffer RW1	40 ml
Buffer RW2 (concentrate)	11 ml
RNase-Free Water	10 ml
Spin Columns RS with Collection Tubes	50
RNase-Free Centrifuge Tubes (1.5 ml)	50

产品简介

本试剂盒适用于从福尔马林固定、石蜡包埋的组织中有效纯化总RNA。适合从小于30 mg的石蜡包埋组织或切片中抽提高纯度的总RNA，本试剂盒无需使用酚/氯仿抽提和异丙醇沉淀，一小时内即可完成多个样品的抽提。本品使用专门优化的裂解液和蛋白酶K，释放福尔马林固定或组织切片样本中的RNA，无需过夜操作；消化后的样品在较高的温度孵育后，去除由福尔马林交联造成的抑制作用，有效释放组织切片中的RNA，而避免危害RNA的完整性；优化的缓冲系统使裂解液中的RNA可特异结合到硅胶吸附膜上，而其他污染物可流过膜；可通过漂洗步骤有效去除，经过洗脱的RNA可直接用于RT-PCR、Real-Time PCR和印迹分析等实验。

自备试剂：无水乙醇（新开封或提取RNA专用）、10mM PBS(PH7.4)。

实验前准备及重要注意事项

1. 向Proteinase K中加入0.625 ml Proteinase K Storage Buffer使其溶解，-20℃保存。配制好的Proteinase K勿长时间室温放置，避免反复冻融，以免影响其活性。
2. 预防RNase污染，应注意以下几方面：
 - 1) 使用无RNase的塑料制品和枪头，避免交叉污染。
 - 2) 玻璃器皿应在使用前于180℃高温下干烤4小时，塑料器皿可在0.5 M NaOH中浸泡10分钟，用水彻底冲洗后高压灭菌。
 - 3) 配制溶液应使用无RNase的水。
 - 4) 操作人员戴一次性口罩和手套，实验过程中要勤换手套。
3. 获得样品后，要尽快将样品在4%-10%的福尔马林中固定，固定时间以14-24小时为宜，时间过长易导致RNA断裂，影响下游实验。
4. 确保包埋前的样品彻底脱水，残留的福尔马林会抑制Proteinase K的作用。
5. 第一次使用前应按试剂瓶标签说明先在Buffer RW2中加入无水乙醇。
6. 使用前请检查Buffer GTL、Buffer GL和Buffer DS是否出现结晶或者沉淀，如有结晶或者沉淀，请将Buffer GTL、Buffer GL和Buffer DS于56℃水浴重新溶解。

操作步骤

1. 样本处理
 - 1a. 石蜡包埋样本：用手术刀将组织块中多余的石蜡修剪掉，露出组织后切成5-10 μm的薄片。

注意：如果样品表面已经暴露在空气中，请将接触空气的2-3片弃掉不用。

1b. 福尔马林等固定液中的样本：取约20 mg的样本，切成小块，置于离心管中，加入500 μ l 10mM PBS (PH7.4)，涡旋振荡，12,000 rpm (\sim 13,400 \times g) 离心1分钟，弃上清，重复3次，可直接进行第3步操作。

2. 选择方案 A 或方案 B 去除石蜡

方案 A

A1. 取约1 \times 1 cm²的切片（共约4-5片切片）置于离心管（自备）中，加入500 μ l Buffer DS，涡旋震荡10秒。56 $^{\circ}$ C孵育3分钟。

A2. 12,000 rpm离心2分钟，小心吸弃上清，注意不要吸到沉淀。

方案 B

B1. 取约1 \times 1 cm²的切片（共约4-5片切片）置于离心管（自备）中，加入1 ml二甲苯，盖紧管盖，涡旋震荡10秒。

B2. 12,000 rpm离心2分钟，小心吸弃上清，注意不要吸弃沉淀。

B3. 加入1 ml无水乙醇，涡旋震荡混匀。12,000 rpm离心2分钟，弃上清，注意不要吸弃沉淀。

B4. 打开管盖，室温或最高至37 $^{\circ}$ C孵育10分钟，直至无水乙醇残留。

3. 加入150 μ l Buffer GTL，重悬沉淀；加入10 μ l Proteinase K，涡旋震荡混匀。

4. 56 $^{\circ}$ C孵育15分钟，直至样品完全溶解。80 $^{\circ}$ C孵育15分钟。短暂离心，使管壁上的溶液收集到管底。

注意：1) 此步骤的目的是修复由甲醛变性的核酸，孵育的温度过高或时间过长可能造成RNA断裂，产生RNA碎片。

2) 56 $^{\circ}$ C孵育后的样品可置于室温，直至水浴锅或干浴锅温度达到80 $^{\circ}$ C后再把样品置于80 $^{\circ}$ C孵育。

5. 置于冰上3min，12,000 rpm离心15分钟，将上清转移至新的离心管中，小心不要吸到沉淀。

6. 在上清中加入320 μ l Buffer GL，涡旋震荡彻底混匀。

7. 加入720 μ l无水乙醇，涡旋震荡彻底混匀。

注意：加入无水乙醇后，可能有少量沉淀物析出，但不影响后续操作。

8. 将步骤7中所得的溶液全部加入到已装入收集管的吸附柱（Spin Columns RS）中，若一次不能加完溶液，可分多次转入。12,000 rpm离心1分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

可选步骤：若需去除基因组DNA，可按照以下步骤进行

a. 向吸附柱中加入350 μ l Buffer RW1，12,000 rpm离心1分钟，弃废液，将吸附柱重新放回收集管中。

- b. 配制DNase I 混合液：取52 μl RNase-Free Water，向其中加入8 μl 10 \times Reaction Buffer和20 μl DNase I（1 U/ μl ），混匀，配制成终体积为80 μl 的反应液。
- c. 向吸附柱中直接加入80 μl DNase I 混合液，20-30 $^{\circ}\text{C}$ 孵育15分钟。
- d. 向吸附柱中加入350 μl Buffer RW1，12,000 rpm离心1分钟，弃废液，将吸附柱重新放回收集管中。
9. 向吸附柱中加入500 μl Buffer RW2（使用前检查是否已加入无水乙醇），12,000 rpm离心1分钟，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。
10. 重复步骤9。
11. 12,000 rpm离心2分钟，倒掉收集管中废液。将吸附柱置于室温数分钟以彻底晾干。
注意：这一步目的是将吸附柱中残余乙醇去除，乙醇残留会影响后续酶促反应（酶切、PCR等）。
12. 将吸附柱置于一个新的无RNase离心管中，向吸附柱的中间部位悬空加入20-50 μl RNase-Free Water，室温放置2-5分钟，12,000 rpm离心1分钟，收集RNA溶液，-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存RNA。
**注意：1) RNase-Free Water体积不应小于20 μl ，体积过小影响回收率。
2) 如果要提高RNA的产量，可用20-50 μl 新的RNase-Free Water重复步骤12。
3) 如果要提高RNA浓度，可将得到的溶液重新加入到吸附柱中，重复步骤12。**

本产品仅供科研使用，请勿用于临床诊断及商业用途