

FastPure FFPE RNA Kit HandBook

FastPure FFPE 石蜡切片 RNA 提取试剂盒说明书

产品组成

FastPure FFPE RNA Purification Kit		
产品编号	EK-1312-50T	EK-1312-100T
纯化次数	50 次	100 次
Buffer TLB	10mL	20mL
Buffer B1	50mL	100mL
Buffer WB I	32mL	64mL
Buffer WB II	24mL	48mL
RNase-Free Water	10mL	20mL
Proteinase K Solution (20mg/mL)	2mL	4mL
RNase-Free 吸附柱	50 个	100 个
2mL Collection Tubes	50 个	100 个
使用手册	1	1

产品介绍

本试剂盒可以快速地从小量 FFPE 石蜡切片中提取 RNA，不含酚氯仿等有毒试剂，可用于 RT-PCR、Real Time RT-PCR、mRNA 差异显示、分子克隆等多种下游实验。本产品仅供科研使用，请勿用于医药、临床治疗、食品级化妆品等用途。

存储条件

室温干燥保存可至少稳定 12 个月。

需要额外准备的材料

- 二甲苯（或相应脱蜡液）
- 无水乙醇（96%-100%）
- 无酶 1.5mL 离心管
- 无酶吸头
- 干净的手套
- 高速离心机
- 物理研磨设备

开始前注意事项 请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项。

- Buffer TLB 在储存时可能会形成沉淀，如果有沉淀出现，请 37-70°C 加热溶解后室温使用。
- Buffer WB I 作为浓缩液提供，在第一次使用前加入 0.25 倍体积的乙醇（96-100%）以获得工作溶液。
- Buffer WB II 作为浓缩液提供，在第一次使用前加入 4 倍体积的乙醇（96-100%）以获得工作溶液。
- RNase-free 水中不含任何抑菌因子，室温放置或操作时可能会引入细菌或真菌污染，使用时尽量注意，推荐开瓶后分装保存以减少污染风险保证实验稳定性。
- RNA 提取操作及离心过程室温进行即可。

操作步骤:**1. 样本处理**

- a. 石蜡切片: 取 5-8 张石蜡切片, 每张厚度为 5-10 μ m, 尺寸为 1 \times 1cm。
- b. 石蜡块: 使用手术刀刮取约 30mg 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 30mg 样本, 用手术刀切成数块, 置于 1.5mL 离心管中, 加入 500 μ L 1 \times PBS, 涡旋振荡混匀, 以 13,000 \times g (约 13,400 \times g) 室温离心 1min。弃去上清, 重复此步骤 3 次。

2. 将石蜡切片或石蜡块切片放入 1.5 或 2mL 微量离心管中, 并向样品中加入 0.8mL 二甲苯。盖紧管盖后充分混匀并室温孵育 5 分钟, 期间需多次手动进行颠倒混匀。

3. 孵育结束后, 直接向管中补加 400 μ L 无水乙醇 并剧烈震荡 10 s。

4. 在室温 (15-25 $^{\circ}$ C) 下以 13,000 \times g 离心 2 min, 弃上清。注意: 不要倒掉沉淀。

5. 向沉淀中加入 1mL 无水乙醇, 并通过涡旋混合约 10s。

6. 在室温 (15-25 $^{\circ}$ C) 下以 13,000 \times g 离心 2 min, 弃上清。注意: 不要倒掉沉淀。

建议使用细枪头小心吸尽残留液体, 或将离心管在干净纸巾上轻轻扣干, 以最大限度去除乙醇残留。

7. 打开离心管盖, 将离心管置于 55 $^{\circ}$ C 金属浴或烘箱中干燥 10min (或直至乙醇完全挥发, 组织沉淀呈干燥状态)。

8. 向干燥后的样本管中加入 100 μ L Buffer TLB, 16 μ L 10%SDS 和 40 μ L 蛋白酶 K 溶液。每隔几次短暂涡旋, 后在 55 $^{\circ}$ C 下孵育过夜 (或 2-4 小时)。

9. 加入 325 μ L Buffer B1 和 325 μ L 无水乙醇, 上下颠倒轻轻混合。

10. 将上述步骤混匀后的溶液转移入无酶吸附柱中并套上 2mL 收集管, \geq 12000 \times g (\geq 12,000rpm) 离心 1min, 弃废液, 直至将溶液全部转移完成吸附。

吸附柱最大上柱量为 700 μ L, 若溶液过多可分多次上柱。后续操作若无特殊说明吸附柱均置于 2mL 收集管中。

11. 向吸附柱中分别加入 500 μ L Buffer WB I (使用前请确认 Buffer WBI 按要求加入相应体积无水乙醇), \geq 8000 \times g (\geq 10,000 rpm) 离心 30s, 弃废液。

12. 将两个吸附柱重套回收集管中, 向吸附柱中加入 500 μ L Buffer WBII (使用前请

确认 Buffer WBII 按要求加入相应体积无水乙醇), \geq 8000 \times g (\geq 10,000 rpm) 离心 30s, 弃废液。

13. 重复步骤 12 一次。

14. 倒弃滤液, 将吸附柱放入收集管中, 以最大转速 (\sim 13,400 \times g) 离心 3min 干燥柱子。

15. 将两个吸附柱分别套入新的 RNase-free 的 1.5mL 离心管中, 并置于无 RNA 酶的环境中开盖静置 5-10min 至乙醇晾干。

若吸附柱中残留乙醇将会对纯化后的 RNA 的下游实验造成影响。

16. 向两个吸附柱膜正中央分别加入 30-50 μ L RNase-Free Water, 盖上盖子室温静置 3-5 min。后置于离心机中 \geq 12,000 \times g (\geq 13,000 rpm) 离心 3min 得到 RNA 溶液。

注意: 洗脱体积不应小于 30 μ L, 体积过少会影响回收效率。为了提高 RNA 的回收量, 可将 RNase-Free Water 加热 (约 60 $^{\circ}$ C) 并洗脱两次, 可增加约 15-20% 得率。