



FFPE DNA/RNA Kit

固定组织DNA/RNA提取试剂盒

目录号： CW3145S (50 preps)

保存条件： DNase I及10×Reaction Buffer -20℃保存， Spin Columns DF、Spin Columns RS室温下可保存2个月， 2-8℃保存1年，其余组分常温 (15-30℃)保存。

产品内容

Component	CW3145S 50 preps
DNase I	1000 U
10×Reaction Buffer	1000 μl
RNase A (100 mg/ml)	0.4 ml
Buffer GTL	20 ml
Buffer GL	30 ml
Buffer GW1 (concentrate)	13 ml
Buffer GW2 (concentrate)	15 ml
Buffer RW1	40 ml
Buffer RW2 (concentrate)	11 ml
Buffer EB	10 ml
RNase-Free Water	10 ml
Buffer DS	30 ml
Proteinase K	2×25 mg
Proteinase K Storage Buffer	2×1.25 ml
Spin Columns RS with Collection Tubes	50
Spin Columns DF with Collection Tubes	50
Centrifuge Tubes (L-1.5 ml)	100

产品简介

本试剂盒适用于从石蜡包埋组织中有效纯化基因组DNA及总RNA。本品使用专门优化脱蜡剂和裂解液，释放组织切片样本中的DNA、RNA，不涉及有机试剂二甲苯，无需过夜操作；消化后的样品在较高的温度孵育后，去除由交联造成的抑制作用，有效提高核酸的产量和纯度；优化的缓冲系统使裂解液中的核酸可特异结合到吸附膜上，抑制剂通过两步漂洗步骤有效去除，最后使用低盐缓冲液或水洗脱，即可获得高纯度DNA、RNA。同时配置高效微量吸附柱，洗脱体积可低至20 μ l。经过纯化的DNA、RNA可以直接用于PCR、Real-time PCR、SNP基因分型、STR基因分型、二代测序、药物基因组学研究和印迹分析等实验。

自备试剂：无水乙醇

实验前准备及重要注意事项

1. 获得样品后，要尽快将样品固定，固定时间以14-24小时为宜，时间过长易导致DNA、RNA断裂，影响下游实验。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。
2. 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。
3. 向Proteinase K中加入1.25 ml Proteinase K Storage Buffer使其溶解，-20 $^{\circ}$ C保存。配制好的Proteinase K勿长时间室温放置，以免影响其活性。
4. 第一次使用前应按试剂瓶标签说明先在Buffer RW2、Buffer GW1和Buffer GW2中加入无水乙醇。
5. 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37 $^{\circ}$ C水浴重新溶解。
6. 实验开始前将水浴锅或恒温混匀仪预热至56 $^{\circ}$ C。
7. 请使用常温离心机，或将离心机温度设置为25 $^{\circ}$ C，若温度低于15 $^{\circ}$ C可能会导致吸附柱堵塞。
8. 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 $^{\circ}$ C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。

操作步骤

石蜡包埋样本

1. 将组织块多余的石蜡修剪掉，露出组织后切成5-10 μm 的薄片。
2. 取约 $1 \times 1 \text{ cm}^2$ 的切片（共约1-5片切片）置于离心管（自备）中，加入500 μl Buffer DS，涡旋震荡10秒。短暂离心将样本收集到管底。56°C孵育3分钟，水浴锅中取出后静置，降至室温后进行下一步操作。

注意：如果样品表面暴露在空气中，最初的2-3片弃掉不用。

3. 12,000 rpm离心2分钟，小心彻底吸弃上清液，不要吸到沉淀。可用小枪头（10 μl ）小心去除残留的脱蜡液。
4. 上述管中加入180 μl Buffer GTL和20 μl Proteinase K，涡旋震荡混匀。
5. 56°C孵育15分钟，然后冰上放置3分钟。室温，12,000 rpm离心15分钟。
6. 转移上清液至新的1.5 ml离心管用于RNA提取，注意不要吸到未消化组织。将沉淀用于DNA提取。

RNA提取

7. 把第6步得到的上清液，80°C孵育15分钟。
8. 加入320 μl Buffer GL，涡旋震荡混匀后加入720 μl 无水乙醇，立即涡旋震荡混匀。
9. 所得的溶液全部加入到已装入收集管的吸附柱（Spin Columns RS）中，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。

注意：若吸附柱堵塞，可能是样本量过多，应考虑将起始切片数量减少为1-2片。

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 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。
- 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°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。

向吸附柱中加入500 μl Buffer RW2，12,000 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。

11. 重复步骤10。再12,000 rpm离心2分钟，倒掉收集管中废液。将吸附柱置于室温5分钟以彻底晾干。
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 μ l RNase-Free Water，室温放置5分钟，12,000 rpm离心1分钟，收集RNA溶液，-80 $^{\circ}$ C保存。

DNA提取

7. 取第6步获得的沉淀，加入180 μ l Buffer GTL和20 μ l Proteinase K至沉淀中。涡旋15秒重悬沉淀。
8. 56 $^{\circ}$ C孵育1小时，直至样品完全溶解。90 $^{\circ}$ C孵育1小时。

可选步骤：

如需除去RNA，可将样品温度降到室温后，加入2 μ l浓度为100 mg/ml的RNase A溶液，震荡混匀，室温放置2分钟。

9. 加入200 μ l Buffer GL，涡旋震荡混匀后加入200 μ l无水乙醇，涡旋震荡彻底混匀。短暂离心，使管壁上的溶液收集到管底。
10. 将步骤9所得溶液全部加入已装入收集管的吸附柱（Spin Columns DF）中，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。

注意：若吸附柱堵塞，可能是样本量过多，应考虑将起始切片数量减少为1-2片。

11. 向吸附柱中加入500 μ l Buffer GW1，12,000 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。
12. 向吸附柱中加入500 μ l Buffer GW2，12,000 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。

注意：如需进一步提高纯度，可重复步骤12。

13. 12,000 rpm离心2分钟，倒掉收集管中废液。将吸附柱置于室温5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。
14. 将吸附柱置于一个新的1.5 ml离心管中，向吸附柱的中间部位悬空加入20-50 μ l Buffer EB，室温放置5分钟，12,000 rpm离心1分钟，收集DNA溶液，-20 $^{\circ}$ C保存。