FFPE DNA Kit

石蜡包埋组织 RNA 提取试剂盒

产品简介

FFPE RNA Kit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。试剂盒采用无毒型的脱蜡试剂代替经典的二甲苯脱蜡过程，并在脱蜡过程中无需去除液体，减少微量样品丢失的风险。本试剂盒提取的RNA可应用于RT-PCR等下游试验。

试剂盒组成

产品编号	D1701	D1705	D1706	D1707
次数	5	50	100	200
纯化柱子	5	50	100	200
收集管	5	50	100	200
Buffer FL1	2ml	22ml	43ml	85ml
Buffer FL2	1.2ml	15ml	30ml	55ml
Buffer BL	1.2ml	15ml	30ml	55ml
Buffer WB	3ml	33ml	55ml	110ml
DNA Wash Buffer	2	13ml	26ml	26ml*2
Proteinase K	120μl	1.05ml	1.05ml*2	2.1ml*2
说明书	1	1	1	1

储存和稳定性

室温保存，12个月内有效。Buffer FL2与Buffer BL可能有沉淀产生，37℃水浴溶解后即可。Proteinase K常温运输，-20℃保存。

实验前准备

请详细阅读该手册并熟悉各个步骤，在开始之前准备好所有的试剂盒组分和必需的器材。

浓缩的DNA Wash Buffer需用无水乙醇按如下稀释：

D17101 加8 ml；D1705加入52 ml ；D1706与D1707每瓶加入104 ml 无水乙醇

需自备器材

无水乙醇　1.5ml离心管　水浴　离心机

操作步骤

1.样本处理

A. 石蜡切片：取石蜡切片（5-10μm厚，1×1cm2大小）5-8张。

B. 石蜡块：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，用手术刀切为数块,置于1.5ml离心管中,加入500μl PBS涡旋振荡混匀12000rpm室温离心1min,重复3次。跳过第二、三步，从第四步起继续操作。

2. 将样品置于1.5 ml离心管中，加入400μl Buffer FL1，剧烈涡旋10 sec。

3. 56ºC 水浴 3 分钟。恢复至室温（20-25℃）。

4. 加入 200μl Buffer FL2 至样品中，涡旋混匀。

5. 11,000×g 离心 1 分钟。此时分成两层：上层含蜡层，下层水相层。*（福尔马林等固定样品，无需进行此步操作。）*

6. 加入 20μl Proteinase K 至下层的溶液中。用移液枪轻轻吸打几次混匀。

7. 56℃水浴直至样本完全裂解。 也可以55℃水浴过夜，过夜消化对提取结果无负面影响。

8. 置于90℃水浴孵育1h。

9. 12,000 rpm(~13,400×g)离心5min，转移下层裂解液到新的1.5ml 离心管中。

10. （可选步骤）如果需要得到无RNA的基因组DNA，每个样品加入5μl RNA酶（10mg/ml，需另购买，GBCBIO货号P3414）。

11.加入200μl Buffer BL至样品中，涡旋20秒。

12. 加入220μl 的无水乙醇，涡旋混匀(可能会出现沉淀) 。

13. 转移溶液和沉淀入吸附柱中（吸附柱放在收集管中），12,000 rpm(~13,400×g)离心1 min，弃掉收集管中的废液，将吸附柱放回收集管中。

14. 加入500μl Buffer WB至柱子中，10,000×g离心1min,倒弃流出液；

15.加入600μl DNA Wash Buffer至柱子中，10,000×g离心1min,倒弃流出液；

注意：DNA Wash Buffer使用前须按要求用无水乙醇稀释。如果放入冰箱中，使用前须恢复到室温。

16.再加入600μlDNA Wash Buffer II至柱子中，10,000×g离心1min,弃去流出液；

17. 将GBC吸附柱重新套回2ml收集管中，最大转速（>13.000×g）离心空结合柱1min以干燥柱子的基质；这一步对下面的洗脱步骤至关重要。

18. 将GBC吸附柱转入一个新的离心管中，加15-30μl TE或者灭菌去离子水，室温放置1 分钟，12,000 rpm (~13,400×g)离心30秒。且RNA 应保存在-70℃，以防降解。

可能出现的问题与对策

问　题	原　　　　因	建　　　　议
纯化柱阻塞	样品太多，脱蜡不完全	切片不能厚度不能 20 μm，使用量不能超过 8 张。
低 RNA 量	柱子阻塞	见上述.
	样品不好	样品固定后超过 20 小时，或者是长时间保存的切片，都会导致 RNA 的量严重下降。
	样品太多	样品太多，裂解效果差。
RNA 降解	样品中 RNA 已经降解	石蜡包埋组织中的 RNA 在固定、包埋、保存的过程中都会发生降解。
	操作过程中，引入 RNase。	所用耗材等，务必是 RNase-free，操作过程中勤换手套。
下游应用差	盐分污染	确保 Wash Buffer II 按说明书加入无水乙醇
	乙醇污染	洗脱前，务必空柱离心 1min
	DNA 污染	减少样品量，进行 DNase 膜上消化

可能用到的产品

货号	品名	规格
P3105	Plasmid Maix Kit	10T
P2105	Endo-free Plasmid Mini kit	50T
P6105	Yeast Plasmid Kit	50T
C4105	MiniElute DNA-Pure Kit	50T
P3415	2XPCR Master Mix	1ml
D1105	Blood DNA Kit	50T
D4105	Plant DNA Kit	50T
D7105	Hpure Fugal DNA Kit	50T
D3105	Baterial DNA Kit	50T
D8105	Soil DNA Kit	50T
R1106	TRNsol(TRIzol)	100ml
R4105	Total RNA Kit II	50T
R5105	Plant RNA Kit	50T
G4210	DH5a 感受态	5*0.2ml
G0668	DEPC-water	100ml
G3420	6X loading buffer	2ml
G3422	DAB 染色液	100ml
G0577	苏木素伊红染色液	50ml*2
G3424	RIPA 裂解液	100ml
P0018	ECL 发光液	100ml
G3418	TMB Solution For Blotting	100ml
G4308	TMB solution For Elisa	100ml
G3005	30%丙烯酰胺（29:1）	500ml
G0528	4%多聚甲醛	500ml
G3422	BCA 蛋白浓度测定试剂盒	500T
G3155	Bradford 蛋白浓度测定试剂盒	1000T
G4256	10X 丽春红染色液	10ml

广州捷倍斯生物科技有限公司

地址：广州市国际生物岛螺旋四路一号研发B区403

电话：020-82160415 Email：genebase@vip.163.com　WEB:www.gbcbio.cn