

# 操作手册

## FFPE 样品 DNA/RNA 提取试剂盒

Catalog No. TR109-50 (50 次反应)

### Highlights

- 可从同一 FFPE 组织样品或者切片中提取到高质量的总的核酸（DNA 和 RNA）。
- 提取到的 DNA 和 RNA 可应用于 PCR、测序等下游实验。

## 产品组成:

试剂盒组成	保存	50 次
蛋白酶 K 及保存液	-20°C	2x5 mg
DNase I	-20°C	1 管
脱蜡液	室温	20 ml
2X 消化液	室温	5 ml
DNA 消化液	室温	4 ml
DNA/RNA 裂解液	室温	50 ml
DNA/RNA 预洗液	室温	25 ml
DNA/RNA 洗涤液	室温	2X24 ml
RNase-free H <sub>2</sub> O	室温	30 ml
2 号柱	室温	100 个
收集管 (2ml)	室温	150 个

Note –售出后一年内产品质量是可以保证。试剂已经过大量的常规检测来保证其可操作性。此产品仅供研究并且需要由专业人员来使用。试剂盒中的部分试剂是有刺激性的。请带好手套和防护眼镜。

环境温度低时裂解液可能出现析出和沉淀，可以在 37°C 水浴几分钟帮助重新溶解使用。

## 特性:

- **样品大小:** 封闭在石蜡中的最多 25mg 组织或者表面积~20mm<sup>2</sup> 最多 4 张组织切片(厚度≤20 μm)，首次使用推荐使用 1-2 张切片。兼容新鲜或者冷冻的组织。
- **DNA 回收率:** 每个离心柱最大的结合能力是 50μg。
- **DNA 纯度:** 获得的基因组 DNA/RNA 产量高、纯度好，一般情况  $Abs_{260/280} > 1.8$   $Abs_{260/230} > 1.8$
- **需要的仪器设备/试剂:** 水浴锅或者金属浴 (55°C 和 90°C)，微型离心机，异丙醇。

## 试剂制备:

在操作之前，需添加260 $\mu$ l蛋白酶K保存液到每管蛋白酶K（5mg）中。蛋白酶K溶液的浓度为20mg/ml,混匀后，需要放到-20 $^{\circ}$ C长期保存。

添加96ml 100%乙醇（或104ml 95%乙醇）到24ml的 DNA/RNA洗涤液中。

添加275 $\mu$ l的RNase-free H<sub>2</sub>O到每管的DNase I中,混匀后DNase I的浓度为1U/ $\mu$ l。

## 提取步骤:

### 脱蜡

1. 尽可能多的从组织上去除石蜡，然后将样品放置到一个 1.5ml 离心管内。

最多处理 25mg 石蜡块中的组织或者最多 4 个组织切片（总表面积 20mm<sup>2</sup>）建议处理 1-2 个切片

2. 添加 400 $\mu$ l 的脱蜡液到样品中。在 55 $^{\circ}$ C下孵育 1 分钟，短暂涡旋。

3. 去除脱蜡液然后处理下一个切片

### 组织消化

1. 针对离心管中去除了脱蜡液的组织样品（ $\leq$ 25mg），添加以下混合物：

H <sub>2</sub> O	95 $\mu$ l
2X 消化液	95 $\mu$ l
蛋白酶K	10 $\mu$ l

2.

快速消化流程	标准消化流程
在 55 $^{\circ}$ C下孵育 1 小时（显微切割）	在 55 $^{\circ}$ C下孵育 4 小时（组织块）

针对较大的组织推荐使用标准消化流程

3. 消化之后，将温度调到 94 $^{\circ}$ C并且孵育 20 分钟防止交联样品。

4. 以下步骤是针对 DNA 提取，RNA 提取，DNA/RNA 共同提取的三种不同体系。

## DNA纯化或RNA纯化步骤

所有步骤的离心力均在10,000-16,000xg下离心30秒除非特殊说明

所有步骤均在室温下（20-30℃）下操作除非特殊说明

1. 添加 600μl 的 DNA/RNA 裂解液到脱蜡和消化后的组织中，混匀。最大速离心 1 分钟去除不溶物。
2. 将上清转移至 2 号柱中，2 号柱套在一个收集管里，离心。保存滤出液。

DNA纯化步骤 (DNA结合在柱子上)	RNA纯化步骤 (RNA在滤出液中)
3. 将2号柱套在一个新的收集管内。	3. 添加1体积的（95-100%）无水乙醇到上述滤出液中混匀，将混合物移至一个新的2号柱中，2号柱套在一个新的收集管中，离心，去除滤出液。此时RNA已经结合到柱子上，并且可以采用柱上消化的方式进行 DNase I消化（见附录）。

4. 添加 400μl 的 DNA/RNA 预洗液到 2 号柱中，离心，去除滤出液。
5. 添加 700μl 的 DNA/RNA 洗涤液到 2 号柱中，离心，去除滤出液。
6. 添加 400μl 的 DNA/RNA 洗涤液到 2 号柱中，离心 2 分钟去除洗涤液残留。
7. 将 2 号柱移至干净的 1.5ml 离心管中直接添加≥ 50μl 的 RNase-free H<sub>2</sub>O 到柱基质上，室温下放置 1-2 分钟。离心，洗脱 DNA 或 RNA.

### 附录:

#### 柱上DNase I 消化处理

此步骤主要是为了去除痕量的DNA. a) 添加400μl的DNA/RNA洗涤液到柱子上，离心。去除滤出液。

b)对于每一次的样品处理需要制备80μl的DNase I反应液。配比为 DNase I 5μl DNA消化液 75μl

c)直接添加80μl的DNase I反应液到柱上，在室温下（20-30℃）孵育15分钟。然后进行第4步继续处理后面的步骤。

## DNA/RNA共纯化步骤

所有步骤的离心力均在10,000-16,000xg下离心30秒除非特殊说明

所有步骤均在室温下（20-30℃）下操作除非特殊说明

1. 添加 600 $\mu$ l 的 DNA/RNA 裂解液到脱蜡和消化后的组织中，混匀。最大速离心 1 分钟去除不溶物。将上清转移到一个新的离心管内。
2. 添加 1 体积的（95-100%）无水乙醇到样品中混匀。
3. 将混合物移至一个 2 号柱中，2 号柱套在一个新的收集管中，离心，去除滤出液。
4. 添加 400 $\mu$ l 的 DNA/RNA 预洗液到 2 号柱中，离心，去除滤出液。
5. 添加 700 $\mu$ l 的 DNA/RNA 洗涤液到 2 号柱中，离心，去除滤出液。
6. 添加 400 $\mu$ l 的 DNA/RNA 洗涤液到 2 号柱中，离心 2 分钟去除洗涤液残留。
7. 将 2 号柱移至干净的 1.5ml 离心管中直接添加 $\geq$  50 $\mu$ l 的 RNase-free H<sub>2</sub>O 到柱基质上，室温下放置 1-2 分钟。离心，洗脱 DNA 和 RNA.