

FFPE RNA/DNA 提取试剂盒(过柱法/磁珠法)

一、产品简介

FFPE RNA/DNA 提取试剂盒不使用二甲苯等有机溶剂,可直接从石蜡包埋组织/切片中分别提取 RNA 和 DNA。优化的裂解条件能在 20 分钟左右分散厚度 $\leq 10\mu\text{m}$ 的组织切片,约 30 分钟即可充分释放 RNA(此时 DNA 处于未溶解状态),通过离心可实现 RNA 和 DNA 的分别提取,电泳观察获得的 RNA 可见明显的 18S RNA 和少量 28S RNA。

后续提取过程可采用硅胶膜吸附过柱法或者磁珠法。磁珠法试剂预分装于 96 孔板,配套使用 16/32/48 通道核酸纯化仪,洗脱体积为 100 μl ,洗脱液为去离子水,仪器运行时间约 15 分钟。

获得的 DNA 可直接应用于 PCR、NGS 等后续实验,获得的 RNA 可直接应用于 RT-PCR。

二、试剂盒组成和储存

组成内容	MN211-S1 (50 次)	MN211-SD1 (50 次)	原理与用途
产品描述	过柱法,提取 DNA 或者 RNA	过柱法,分别提取 DNA 和 RNA	
Proteinase K*	1 ml	1 ml \times 2	降解蛋白
Buffer TNL3	10 ml	20 ml	分散组织释放 RNA、DNA
Buffer FFPA	15 ml	15 ml	溶解石蜡
Buffer FFPB	15 ml	30 ml	去除残留的石蜡
Buffer TNB	15 ml	30 ml	调整 RNA、DNA 结合条件
Buffer WAN	25 ml	50 ml	洗涤去除蛋白
Buffer WB2 [§]	16 ml	16 ml \times 2	洗涤去除盐
核酸吸附柱-C4	50 个	50 个 \times 2	吸附 RNA 或者 DNA
收集管	2 \times 50 个	200 个	接收废液
1.5 ml 离心管(用于洗脱)	50 个	100 个	接收洗脱的 RNA 或者 DNA
TE*	15 ml	15 ml	洗脱 RNA 或者 DNA

组成内容	MN211-M3 (48 次)	MN211-MD3 (48 次 \times 2)	原理与用途
产品描述	磁珠法,提取 DNA 或者 RNA	磁珠法,分别提取 DNA 和 RNA	
Proteinase K*	1 ml	1 ml \times 2	降解蛋白
Buffer TNL3	10 ml	20 ml	分散组织释放 RNA、DNA
Buffer FFPA	15 ml	15 ml	溶解石蜡
Buffer FFPB	15 ml	30 ml	去除残留的石蜡
MN211 预分装 96 孔板-28	3 块	6 块	配套使用 16/32/48 通道核酸纯化仪
磁棒套	3 \times 2	6 \times 2	加样孔位为 2 和 8

*Proteinase K: 20 mg/ml, 室温保存。可能会析出白色粉末状、絮状或者晶体状不溶物,不影响使用效果,使用前混合均匀。

[§]Buffer WB2: 第一次使用前按试剂瓶所示体积加入无水乙醇,混合均匀。

*TE: 10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 8.0(25°C)。

所有组成成分于室温储存。

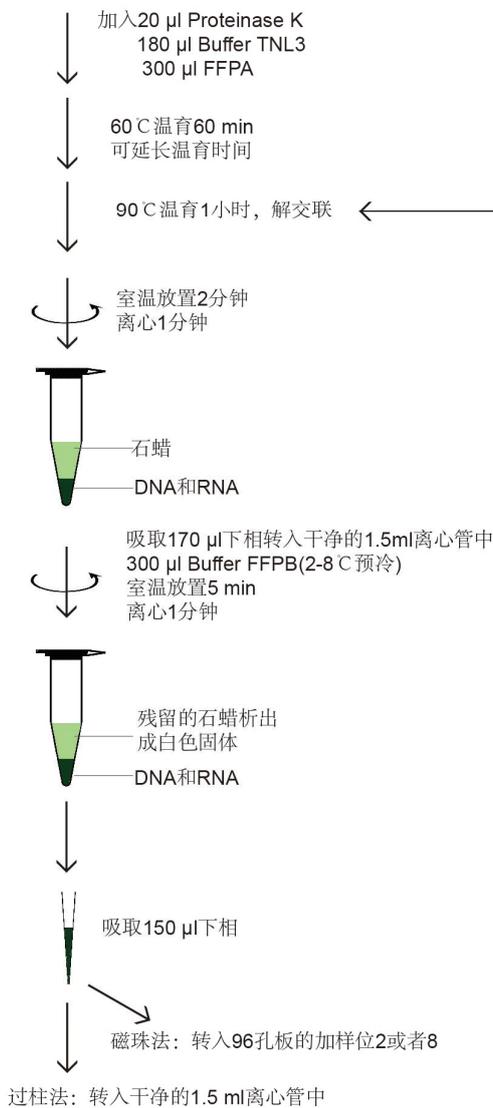
三、实验准备

1. 60℃水浴、金属浴或者温箱，推荐使用恒温震荡仪。
2. 提取 RNA 需准备 80℃水浴、金属浴或者温箱
3. 提取 DNA 需准备 90℃水浴、金属浴或者温箱
4. 至少提前半小时将 Buffer FFPB 置于 2-8℃冰箱预冷，建议将 Buffer FFPB 长期置于 2-8℃冰箱中
5. 提取 DNA 如需去除 RNA，需准备 RNase A1(50mg/ml)。
6. 第一次使用前，按试剂瓶所示体积在 Buffer WB2 中加入无水乙醇，混合均匀。

四、操作流程

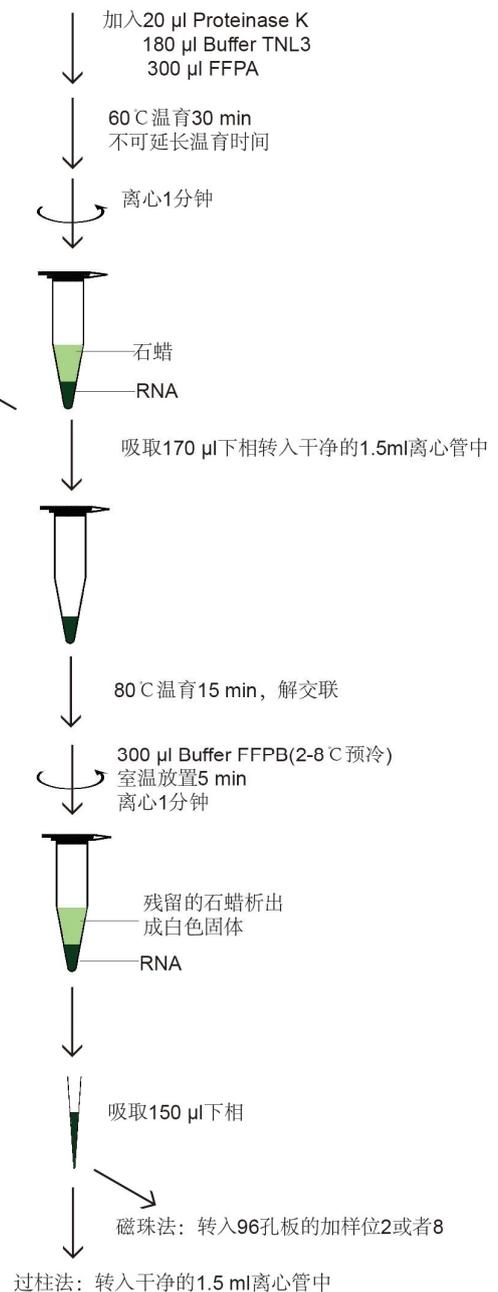
(一) 提取DNA

1-5张切片或者<25 mg石蜡包埋组织



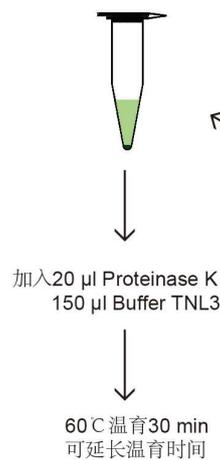
(二) 提取RNA

1-5张切片或者<25 mg石蜡包埋组织



(三) 同时提取DNA

保留样品管
用作DNA提取



五、操作步骤

按照以下三种需求设计的操作步骤：（一）提取 DNA（二）提取 RNA（三）同时提取 DNA

磁珠法的前处理与过柱法相同，在获得预处理的 RNA 或者 DNA 溶液后按照（四）磁珠法仪器运行参数继续操作。

（一）提取 DNA

1. 石蜡切片：刮取 1-5 张切片，尽可能去除石蜡，转入干净的 1.5ml 离心管（自备）。

石蜡包埋组织：尽可能去除石蜡，切碎组织，称取 <25 mg 组织转入干净的 1.5ml 离心管（自备）。

2. 加入 **180 μ l Buffer TNL3**、**20 μ l Proteinase K** 和 **300 μ l FFPA**，用力摇晃 10 次使溶液成为乳浊液，60℃温育 60 min，推荐使用恒温震荡仪器。

如果温浴无震荡功能，每隔 5 分钟摇晃混合一次，直至组织块被完全分散(约 20 min)，继续温育至总时间为 60 min。

延长温育时间不影响提取效果，可温育过夜。

△ 为方便操作，可事先将 Buffer TNL3、Proteinase K 按照比例预混，混合液需 1 小时内使用完；Buffer FFPA 不可预混。

△ Buffer FFPA 为粘稠溶液，吸取溶液时在液面下停顿 1 秒，体积偏差 \pm 10%不影响提取效果。

3. 90℃温育 1 小时-----! 请勿摇晃或者震荡，以避免高温气流冲开离心管盖

4. 压住离心管盖小心取出样品管，室温放置 2 分钟；12,000-16,000 \times g 离心 1 分钟，溶液分为两相，石蜡分配于上相，DNA 分配于下相，未消化的组织分配于相间或者沉淀于离心管底部。

将 Tip 头伸入离心管底部，避开沉淀物，吸取 **170 μ l** 下相转入干净的 1.5ml 离心管中。

5. 加入 **300 μ l Buffer FFPA(2-8℃预冷)**，用力摇晃 10 次，室温放置 5 min，12,000-16,000 \times g 离心 1 分钟，溶液分为两相，DNA 分配于下相。

△ Buffer FFPA 为粘稠溶液，吸取溶液时在液面下停顿 1 秒，体积偏差 \pm 10%不影响提取效果。

6. 过柱法：将 Tip 头伸入离心管底部，避开沉淀物，吸取 **150 μ l** 下相干净的 1.5 ml 离心管中。

磁珠法：将 Tip 头伸入离心管底部，避开沉淀物，吸取 **150 μ l** 下相转入 96 孔板的加样位 2 或者 8，按（四）磁珠法仪器运行参数继续操作。

7. 加入 **300 μ l Buffer TNB**，吹打 3 次混合均匀，如需去除 RNA，在此步骤加入 5 μ l RNase A1(50mg/ml)，溶液混合后室温放置 5 min；

将混合液转入核酸吸附柱-C4(置于收集管中)；离心 1 min，将核酸吸附柱-C4 转入另一个干净的收集管中。

8. 加入 **500 μ l Buffer WAN**，离心 1 min，弃废液，将核酸吸附柱-C4 放回收集管中。

9. 加入 **500 μ l Buffer WB2**，离心 1 min，弃废液，将核酸吸附柱-C4 放回收集管中。

10. 重复步骤 9。

11. 离心 2 min。

12. 将核酸吸附柱-C4 转入试剂盒携带的 1.5 ml 离心管中，在硅胶膜中央加 \geq 25 μ l TE 或去离子水(pH \geq 7.0)，离心 1 min。

(二) 提取 RNA

1. 石蜡切片：刮取 1-5 张切片，尽可能去除石蜡，转入干净的 1.5ml 离心管（自备）。

石蜡包埋组织：尽可能去除石蜡，切碎组织，称取 <25 mg 组织转入干净的 1.5ml 离心管（自备）。

2. 加入 **180 μ l Buffer TNL3**、**20 μ l Proteinase K** 和 **300 μ l FFPA**，用力摇晃 10 次使溶液成为乳浊液，60℃温育 30 min，推荐使用恒温震荡仪器。

如果温浴无震荡功能，每隔 5 分钟摇晃混合一次，直至组织块被完全分散(约 20 min)，继续温育至总时间为 30 min。

△ 为方便操作，可事先将 Buffer TNL3、Proteinase K 按照比例预混，混合液需 1 小时内使用完；Buffer FFPA 不可预混。

△ Buffer FFPA 为粘稠溶液，吸取溶液时在液面下停顿 1 秒，体积偏差 \pm 10%不影响提取效果。

3. 12,000-16,000 \times g 离心 1 min，溶液分为两相，石蜡分配于上相，RNA 分配于下相，未消化的组织分配于相间或者沉淀于离心管底部。

将 Tip 头伸入离心管底部，避开沉淀物，吸取 **170 μ l 下相**转入干净的 1.5ml 离心管中；

如果同时需要提取 DNA，请保留原样品管，室温放置 2 小时内不影响提取效果，按照 (三) 同时提取 DNA 继续操作。

4. 将步骤 3 分离的下相溶液置于 80℃温育 15 min-----! 请勿摇晃或者震荡，以避免高温气流冲开离心管盖

5. 加入 **300 μ l Buffer FFPA(2-8℃预冷)**，用力摇晃 10 次混合均匀，室温放置 5 min，12,000-16,000 \times g 离心 1min，RNA 分配于下相。

△ Buffer FFPA 为粘稠溶液，吸取溶液时在液面下停顿 1 秒，体积偏差 \pm 10%不影响提取效果。

6. 过柱法：将 Tip 头伸入离心管底部，避开沉淀物，吸取 **150 μ l 下相**转入干净的 1.5 ml 离心管中。

磁珠法：将 Tip 头伸入离心管底部，避开沉淀物，吸取 **150 μ l 下相**转入 96 孔板的加样位 2 或者 8，按 (四) 磁珠法仪器运行参数继续操作。

7. 加入 **300 μ l Buffer TNB**，吹打 3 次混合均匀，将混合液转入核酸吸附柱-C4(置于收集管中)；

离心 1 min，将核酸吸附柱-C4 转入另一个干净的收集管中。

8. 加入 **500 μ l Buffer WAN**，离心 1 min，弃废液，将核酸吸附柱-C4 放回收集管中。

9. 加入 **500 μ l Buffer WB2**，离心 1 min，弃废液，将核酸吸附柱-C4 放回收集管中。

10. 重复步骤 9。

11. 离心 2 min。

12. 将核酸吸附柱-C4 转入试剂盒携带的 1.5 ml 离心管中，在硅胶膜中央加 \geq 25 μ l TE 或去离子水(pH \geq 7.0)，离心 1 min。

(三) 同时提取 DNA

从(二)提取 RNA 步骤 3 保留的样品管中进一步提取 DNA。

1. 加入 **150 µl Buffer TNL3**、**20 µl Proteinase K**，60℃温育 30 min；延长温育时间不影响效果，可温育过夜。推荐使用恒温震荡仪器。

△ 为方便操作，可事先将 Buffer TNL3、Proteinase K 按照比例预混，混合液需 1 小时内使用完。

2. 90℃温育 1 小时-----! 请勿摇晃或者震荡，以避免高温气流冲开离心管盖

3. 压住离心管盖小心取出样品管，室温放置 2 分钟；12,000-16,000×g 离心 1 分钟，溶液分为两相，石蜡分配于上相，DNA 分配于下相，未消化的组织分配于相间或者沉淀于离心管底部。

将 Tip 头伸入离心管底部，避开沉淀物，吸取 **170 µl 下相**转入干净的 1.5ml 离心管中。

4. 加入 **300 µl Buffer FFPB(2-8℃预冷)**，用力摇晃 10 次，室温放置 5 min，12,000-16,000×g 离心 1 分钟，溶液分为两相，DNA 分配于下相。

△ Buffer FFPB 为粘稠溶液，吸取溶液时在液面下停顿 1 秒，体积偏差±10%不影响提取效果。

5. 过柱法：将 Tip 头伸入离心管底部，避开沉淀物，吸取 **150 µl 下相**干净的 1.5 ml 离心管中。

磁珠法：将 Tip 头伸入离心管底部，避开沉淀物，吸取 **150 µl 下相**转入 96 孔板的加样位 2 或者 8，按(四)磁珠法仪器运行参数继续操作。

6. 加入 **300 µl Buffer TNB**，吹打 3 次混合均匀，如需去除 RNA，在此步骤加入 5 µl RNase A1(50mg/ml)，溶液混合后室温放置 5 min；

将混合液转入核酸吸附柱-C4(置于收集管中)；离心 1 min，将核酸吸附柱-C4 转入另一个干净的收集管中。

7. 加入 **500 µl Buffer WAN**，离心 1 min，弃废液，将核酸吸附柱-C4 放回收集管中。

8. 加入 **500 µl Buffer WB2**，离心 1 min，弃废液，将核酸吸附柱-C4 放回收集管中。

9. 重复步骤 8。

10. 离心 2 min。

11. 将核酸吸附柱-C4 转入试剂盒携带的 1.5 ml 离心管中，在硅胶膜中央加≥25 µl TE 或去离子水(pH≥7.0)，离心 1 min。

(四) 磁珠法仪器运行参数

1. 将预分装试剂的 96 孔板 1000-2000 rpm 离心 2 min，撕去热封膜待用。

2. 在核酸纯化仪上插入磁棒套。

MN211 预分装 96 孔板-28 加样孔位为 2 和 8，仪器运行过程无需加热步骤，运行时间约 15 min。

如需去除 RNA，在孔位 2 和 8 加入 5 µl RNase A1(50mg/ml)，加入样品后吹打 3 次混合均匀，室温放置 5 min。

步骤	孔位	混合时间 (min)	混合速度	温度 (℃)	吸磁时间 (sec)	设定体积 (µl)	试剂分装
1	吸磁	1	0	--	20	250	磁珠 250 µl
2	吸附	2	5	快	20	450	Buffer TNB 300 µl
3	漂洗 1	3	1	快	20	500	Buffer WAN 500 µl
4	漂洗 2	4	1	快	20	550	Buffer WB2 550 µl
5	漂洗 3	5	1	快	20	600	Buffer WB2 600 µl
6	挥发乙醇	5	0	--	吸磁后等待 3 min	--	
7	洗脱	6	1	快	20	100	去离子水 100 µl
8	弃磁	1	1	快	0	250	