

(DP439) 石蜡包埋组织切片 总RNA提取试剂盒操作指南

天根生化科技（北京）有限公司

版本号：20170413

实验准备

1. 石蜡组织块
2. 无水乙醇, β -巯基乙醇, 二甲苯
3. 移液器, 配套无菌枪头 (200 μ l, 1ml), 一次性无菌注射器 (Dnase I配置)
4. 通风橱 涡旋振荡器 金属浴 台式低温离心机



实验准备-试剂盒准备1

第一次使用前应在漂洗液RW中加入无水乙醇，加入量请参见瓶上标签。并在加入无水乙醇后在瓶身做好标记。



DNase I储存液的配制

将DNase I干粉（1500 U）溶解在550 μ l RNase-Free ddH₂O中，轻柔混匀，分装后-20 $^{\circ}$ C贮存（可保存9个月）。



注意：从-20 $^{\circ}$ C融化后的DNase I储存液保存于4 $^{\circ}$ C（可保存6周），不要再次冻存。

实验准备-试剂盒准备2

此步骤建议在通风橱内操作

操作前在RL中加入β-巯基乙醇至终浓度为1%，如1 ml RL中加入10 μl β-巯基乙醇。此裂解液最好现用现配。配好的RL 4°C可放置一个月，裂解液RL在储存时可能会形成沉淀，如果有沉淀出现，请加热溶解后使用。



Step 1



将石蜡样品切成5-10 μm 厚的片状。

注意: 如果样品表面暴露于空气中, 最初的2~3片弃掉不用。

注意: 应采用新鲜的FFPE组织切片,切片厚度不超过10 μm , 切片过厚可能会造成RNA得率低, 每次制备采用的**切片数应不超过8片**, 表面积应不超过250 mm^2 。如果没有起始样本的信息, 建议初次制备采用的切片数应不超过2片, 然后根据RNA的得率和纯度, 下次制备采用的切片数可以进行调整, 但应不超过8片。

Step 2



迅速将2-8张切片置于
1.5 ml RNase-free的离心管中，

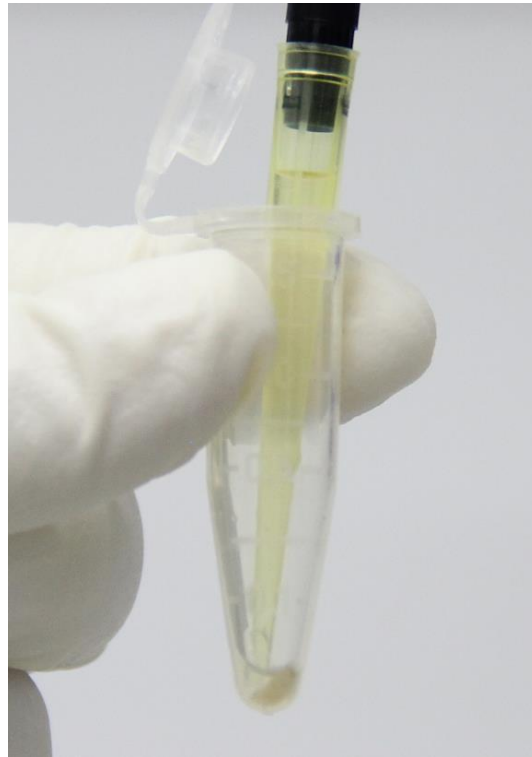
加入1 ml二甲苯，剧烈涡旋10sec。

Step 3



室温(15-25°C), 12,000 rpm(~13,400×g), 离心2 min

Step 4



用枪头吸除上清，小心不要吸到沉淀。

Step 5



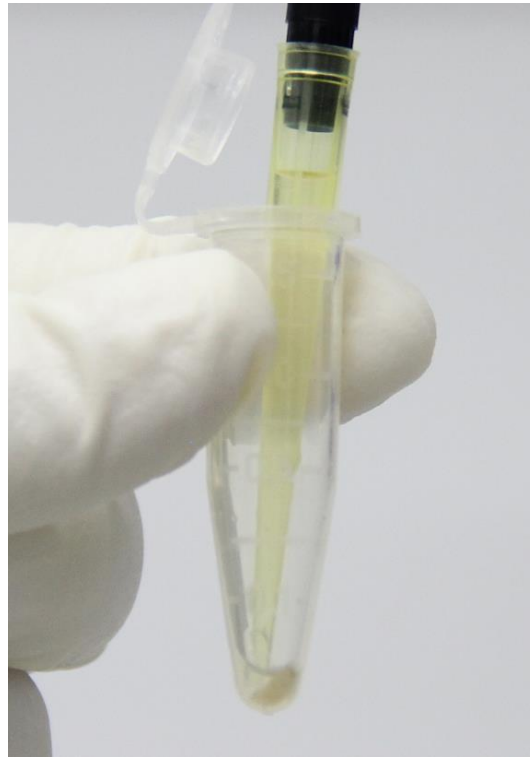
加入1 ml 无水乙醇于沉淀中，涡旋混匀。

Step 6



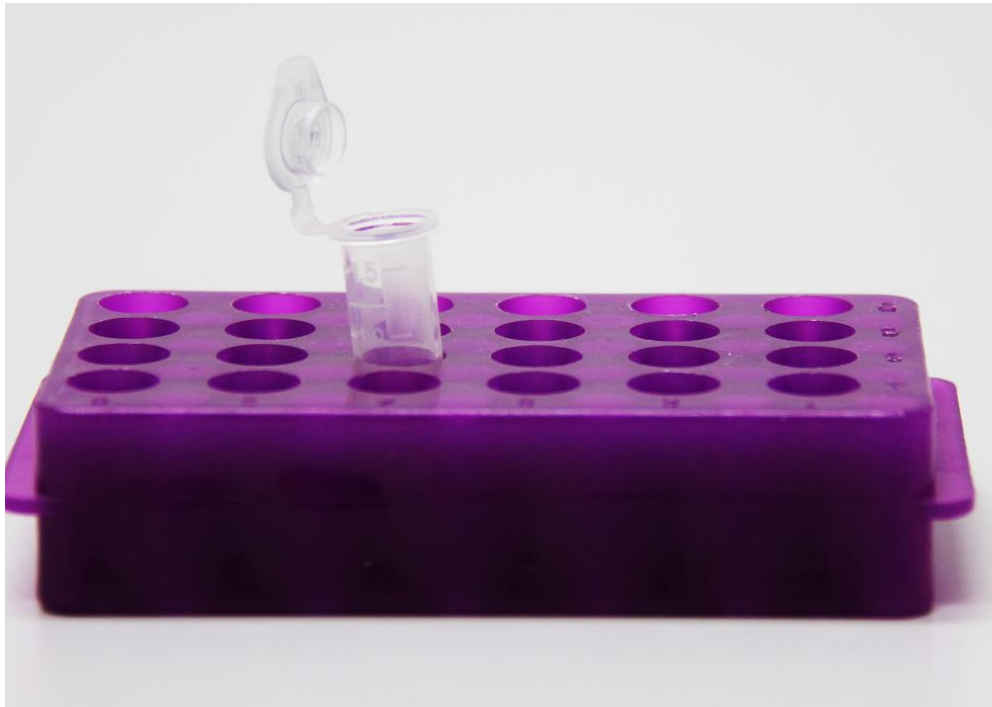
室温(15-25°C), 12000 rpm (~13,400×g)离心2 min。

Step 7



用枪头吸除上清，小心不要吸到沉淀
(用一个新的枪头小心吸出残余的乙醇)。

Step 8



打开管盖，室温(15-25°C)或37°C放置10 min直至残余的乙醇挥发完全。

注意:完全去除残余的乙醇很重要，残余的乙醇会对RNA产生影响。

Step 9



加入200 μ l 裂解液RF以及10 μ l Proteinase K于沉淀中，彻底涡旋混匀。

Step 10



55°C 孵育 15 min

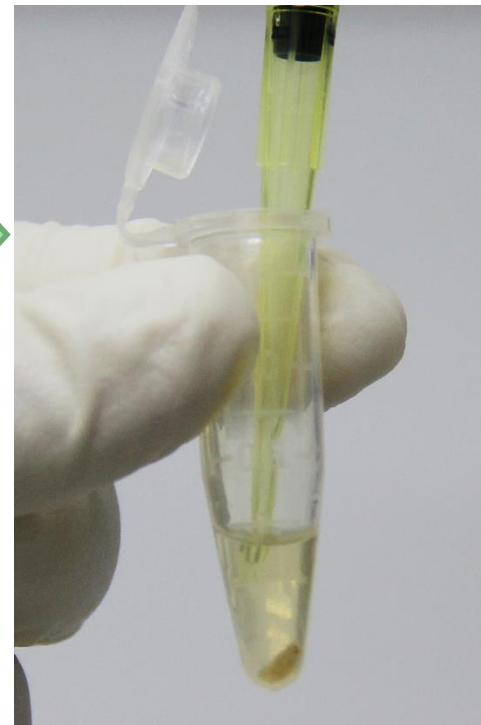


之后 80°C 孵育 15 min。

Step 11



室温(15-25°C), 12,000 rpm(~13,400×g)
离心5 min,



转移上清入新的RNase-Free离心管中。

Step 12



加入220 μl 的缓冲液RB，涡旋混匀。

Step 13



加入660 μ l的无水乙醇，涡旋混匀(可能会出现沉淀)。

Step 14



转移700 μl 溶液和沉淀入吸附柱CR3中（吸附柱放在收集管中），12,000 rpm($\sim 13,400 \times g$)离心1 min，弃掉收集管中的废液，将吸附柱放回收集管中。

重复步骤14，直到所有的溶液和沉淀完全通过吸附柱CR3，弃废液，将吸附柱CR3放回收集管中。

Step 16



DNase I 工作液的配制：

以一个样品为例：取10 μl DNase I 储存液放入新的 RNase-free离心管中，加入70 μl RDD溶液，轻柔混匀（用移液枪轻柔吹打混匀）。

如同时提取多个样品，建议混合统一配置DNase I 工作液。如样品较多建议在配置时预留出一定的量，以免因移液器的误差或枪头吸附造成总量不够的情况。

Step 17



向吸附柱CR3中央加入80 μ l
的DNase I 工作液，
室温放置15 min。

Step 18



向吸附柱CR3中加入500 μ l 去蛋白液RW1，室温(15-25 $^{\circ}$ C)，
12,000 rpm (\sim 13,400 \times g)离心30-60 sec，弃废液，将吸附柱放回收集管中。

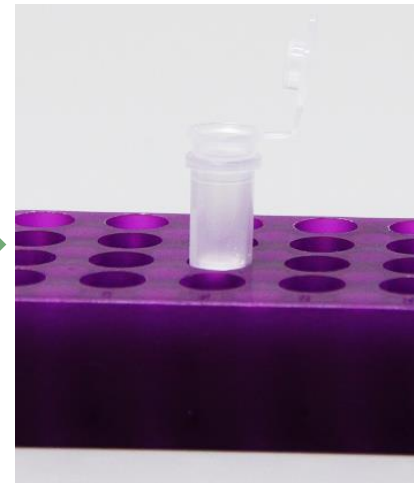
Step 19



向吸附柱CR3中加入500 μ l漂洗液RW（使用前请先检查是否已加入乙醇），室温静置2 min，12,000 rpm(\sim 13,400 \times g)离心30-60 sec，弃废液，将吸附柱CR3放回收集管中。

Step 20重复操作步骤19

Step 21

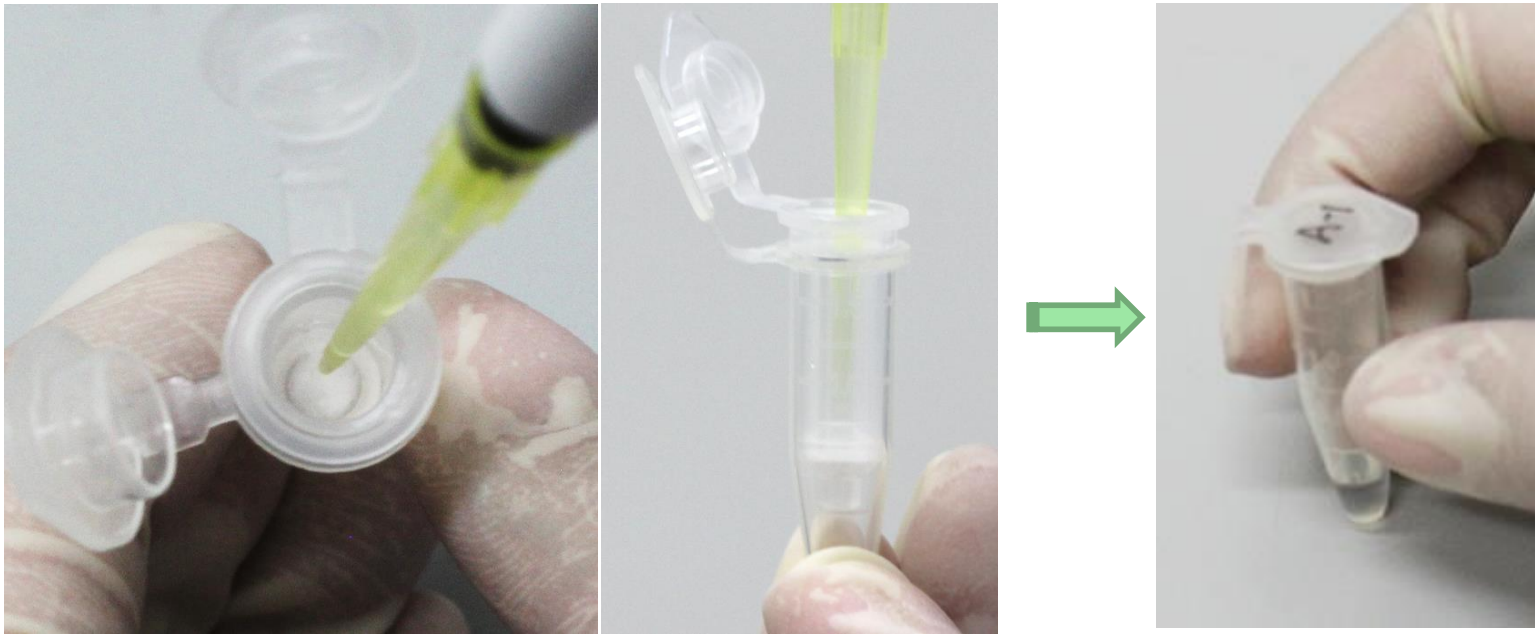


将吸附柱放入新的2 ml收集管中，
12,000 rpm (~13,400 × g) 离心2 min，去除残余液体。

离心后将吸附柱CR3在室温放置片刻，或置于超净工作台上通风片刻，以充分晾干。

注意：漂洗液中乙醇的残留会影响后续的酶反应（酶切、PCR等）实验。
但也不要时间过长以免过分干燥核酸不易溶解或RNA降解。

Step 22



将吸附柱CR3转入试剂盒自带的离心管中，加30–100 μl RNase-Free ddH₂O，室温放置2 min，4°C 12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$)离心2 min。

洗脱缓冲液体积不应少于30 μl ，体积过小影响回收效率。且RNA应保存在-70°C，以防降解。