

YALEPIC[®] FFPE DNA/RNA 提取试剂盒 (DNase I)

YALEPIC[®] FFPE DNA/RNA Isolation Kit (DNase I)

产品货号: YB25003

产品保存及运输条件:

DNase I 及 10× DN Buffer 低温运输, -20°C 保存一年。其它组分常温运输, 室温保存一年。

产品概述

YALEPIC[®] FFPE DNA/RNA Isolation Kit (DNase I) 适用于从石蜡包埋的组织切片中高效纯化 DNA 及总 RNA, 本品采用优化的脱蜡剂及独特的裂解液缓冲系统, 充分释放样本中 DNA 及 RNA, 克服了福尔马林交联造成的抑制效应, 结合特异性吸附过滤技术, 高效提取无蛋白、细胞代谢物等杂质污染的高纯度、高质量的 DNA 和总 RNA。可直接用于 RT-PCR、Real Time PCR、Northern Blot、SNP 基因分型、STR 基因分型、体外翻译、cDNA 文库构建、药物基因组学研究等各种分子生物学实验。

产品组分

序号	产品组分	YB25003 (50 T)
①	FFPE DS Buffer	30 ml
②	FFPE LB Buffer	21 ml
③	FFPE BB Buffer	30 ml
④	Wash Buffer GA	13 ml
⑤	Wash Buffer GB	16 ml
⑥	Wash Buffer A	42 ml
⑦	Wash Buffer B	12 ml
⑧	Proteinase K	2 x 1.2 ml
⑨	Pure Columns RT	50 T
⑩	Pure Columns DP	50 T
⑪	Collection Tubes (2 ml)	50 T
⑫	Nuclease-free Centrifuge Tubes (1.5 ml) 赠	50 T



⑬	RNase-Free H ₂ O	11 ml
⑭	YEB Buffer	11 ml
⑮	RNase A (100 mg/ml)	120 μ l
⑯	DNase I	1000 U
⑰	10 \times DN Buffer	1 ml

适用范围

石蜡组织切片: 5 ~ 8 张 (5 ~ 10 μ m 厚, 1 \times 1 cm² 大小, < 20 mg)

自备试剂及仪器

无水乙醇 (新开封或提取 RNA 专用); 10 mM PBS (pH 7.4); Nuclease-free 离心管; Nuclease-free 移液器吸头; 高速离心机; 恒温水浴锅; 涡旋振荡仪等。

实验准备及注意事项

1. 使用本试剂盒前做好防护措施, 穿戴实验服、手套、口罩等。
2. 使用 Nuclease-free 的移液器吸头和消耗品, 玻璃器皿在使用前于 180°C 高温下干烤 4 h, 塑料器皿可在 0.5M NaOH 中浸泡 10 min, 用水彻底冲洗后高压灭菌。配制溶液应使用 RNase free ddH₂O, 试剂使用完后立即盖好瓶盖, 避免交叉污染的风险。
3. 首次使用 **Wash Buffer B**、**Wash Buffer GA**、**Wash Buffer GB** 前应按照试剂瓶标签加入指定量无水乙醇。
4. 使用前请检查 **FFPE DS Buffer**、**FFPE LB Buffer**、**FFPE BB Buffer** 中是否有结晶和沉淀析出, 如有析出, 可放置 37°C 水浴锅使晶体溶解, 混匀后方可使用。
5. 获得样品后, 尽快将样品在 4% ~ 10% 的福尔马林中固定, 固定时间以 14 ~ 24 h 为宜, 时间过长易导致 RNA 断裂, 影响下游实验。
6. 包埋前的样品应彻底脱水, 残留的福尔马林会抑制 **Proteinase K** 的作用。
7. 离心机及实验操作环境均保持室温, 不低于 15 ~ 25°C。

实验流程

● 样品处理

1. **石蜡包埋样本**: 用手术刀将组织块中过量的石蜡修剪掉, 收集总厚度不超过 40 μ m (例如 2 片 20 μ m、4 片 10 μ m、8 片 5 μ m) 的石蜡切片到一个 1.5 ~ 2 ml 离心管 (自备) 中。 (注: 若样品表面已暴露于空气中, 则前 2 ~ 3 片切片弃掉不用; 用刀片把样品剪切成尽量小的碎片有利于后续脱蜡)
2. 加入 500 μ l **FFPE DS Buffer**, 涡旋振荡 8 ~ 10 s, 56°C 孵育 3 min。取出后降至室温待用。
3. 12,000 rpm 离心 2 min, 小心吸弃上清, 注意不要吸到沉淀。



4. 向上管中加入 180 μl **FFPE LB Buffer**, 重悬沉淀; 加入 20 μl **Proteinase K** 溶液, 涡旋振荡混匀。
5. 56°C 孵育 15 min, 冰上放置 5 min。
6. 室温 12,000 rpm 离心 15 min。
7. 转移上清液至新的 2 ml Nuclease-free 离心管 (自备) 中, 用于 RNA 提取。管内未消化的组织用于 DNA 提取, 请勿吸取。

● RNA 提取

1. 将样本处理步骤得到的上清液转移至 80°C 孵育 15 min。瞬时离心, 收集溶液至管底。

注:

1) 此步骤的目的是修复由甲醛变性的核酸, 孵育的温度过高或时间过长均可能造成 RNA 断裂, 产生 RNA 碎片。

2) 若仅有一台水浴锅, 在 56°C 孵育后的样品可置于室温, 直至水浴锅/干浴锅温度达到 80°C 后再把样品置于 80°C 孵育。

2. 加入 320 μl **FFPE BB Buffer**, 涡旋振荡彻底混匀。
3. 加入 720 μl 无水乙醇 (自备), 涡旋振荡彻底混匀。 (注: 加入无水乙醇后, 可能有少量沉淀物析出, 不影响后续操作)
4. 将上述溶液全部加入到已装入收集管的吸附柱 (**Pure Columns RT**) 中, 若一次不能加完溶液, 可分多次转入。12,000 rpm 离心 1 min, 弃去收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。

可选步骤: 如需去除基因组 DNA, 可按以下步骤进行

*1) 向吸附柱中加入 350 μl **Wash Buffer A**, 12,000 rpm 离心 1 min, 弃废液, 将吸附柱重新放回收集管中。

*2) 配制 **DNase I** 混合液: 取 52 μl RNase-free ddH₂O, 向其中加入 20 μl **DNase I** (1 U/ μl) 及 8 μl 10× **DN Buffer**, 混匀配制成终体积为 80 μl 的反应液。如应用其他公司产品请参考相应说明书。

*3) 向吸附柱中加入 80 μl 配制好的 **DNase I** 反应液, 20~30°C 孵育 15 min。

*4) 向吸附柱中加入 350 μl **Wash Buffer A**, 12,000 rpm 离心 1 min, 弃废液, 将吸附柱重新放回收集管中。

5. 向吸附柱中加入 500 μl **Wash Buffer B** (使用前检查是否加入无水乙醇), 12,000 rpm 离心 1 min, 弃去收集管中废液, 将吸附柱放回收集管中。重复该步骤一次。
6. 12,000 rpm 离心 2 min, 弃去收集管中的废液。将吸附柱置于室温 5 min, 彻底晾干。 (注: 乙醇残留会影响后续的酶促反应, 应将吸附柱中残余的乙醇彻底去除)
7. 将吸附柱置于一个新的 1.5 ml Nuclease-free 离心管中, 向吸附柱的中间部位悬空加入 20 ~ 50 μl **RNase-free ddH₂O**, 室温放置 2 ~ 5 min, 12,000 rpm 离心 1 min, 收集 RNA 溶液。



8. 提取的 RNA 可直接用于下游实验或于 $-85 \sim -65^{\circ}\text{C}$ 保存, 防止降解。

注:

- 1) RNase-free ddH₂O 体积不应小于 20 μl , 体积过小影响回收率。
- 2) 如需提高产量, 可用新的 20~50 μl RNase-Free H₂O 滴加至膜中重复步骤 8。
- 3) 如果要提高 RNA 浓度, 可将得到的溶液重新加入到吸附柱中, 重复步骤 8。

● DNA 提取

1. 将样本处理步骤得到的沉淀加入 180 μl **FFPE LB Buffer**, 重悬沉淀; 加入 20 μl **Proteinase K** 溶液, 涡旋振荡混匀。
2. 56°C 孵育 1 h, 直至样品完全溶解。 90°C 孵育 1 h。
可选步骤: 如需彻底除去 RNA, 可将样品温度降到室温后, 加入 2 μl 100 mg/ml 的 **RNase A** 溶液, 振荡混匀, 室温放置 2 min。
3. 加入 200 μl **FFPE BB Buffer**, 涡旋振荡混匀后加入 200 μl 无水乙醇 (自备), 涡旋振荡彻底混匀。
4. 将上述溶液全部加入到已装入收集管的吸附柱 (**Pure Columns DP**) 中, 若一次不能加完溶液, 可分多次转入。12,000 rpm 离心 1 min, 弃去收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。
5. 向吸附柱中加入 500 μl **Wash Buffer GA** (使用前检查是否加入无水乙醇), 12,000 rpm 离心 1 min, 弃去收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。
6. 向吸附柱中加入 500 μl **Wash Buffer GB** (使用前检查是否加入无水乙醇), 12,000 rpm 离心 1 min, 弃去收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。 (注: 如需进一步提高纯度, 可重复该步骤一次)
7. 12,000 rpm 离心 2 min, 弃去收集管中的废液。将吸附柱置于室温 5 min, 彻底晾干。 (注: 乙醇残留会影响后续的酶促反应, 应将吸附柱中残余的乙醇彻底去除)
8. 将吸附柱置于一个新的 **Nuclease-free Centrifuge Tubes (1.5 ml)** 中, 向吸附柱的中间部位悬空加入 20 ~ 50 μl **YEB Buffer**, 室温放置 2 ~ 5 min, 12,000 rpm 离心 1 min, 收集 DNA 溶液, -20°C 保存。