

## 目 录

简 介	2
原 理	2
试剂盒组成	3
保质期	3
方案 1:石蜡包埋组织 RNA 和 DNA 共提取	4
常见问题回答	8

版本: 2023-01

## 简介

AllPure FFPE DNA/RNA Kit C 是专门为石蜡包埋组织样品的 RNA 和 DNA 共提取而设计的。试剂盒可以从同一份石蜡包埋组织切片样品中提取得到 RNA 和 DNA。试剂盒基于硅胶柱纯化技术，提取过程中无需使用有毒的酚氯仿抽提，也无需进行耗时的醇类沉淀，整个提取过程只需 60 分钟。纯化的 RNA 可直接用于 RT-PCR、Northern blot、核酸保护和体外翻译等实验。纯化的 DNA 可直接用于 PCR、Southern 杂交等实验。

## 原理

HiPure 硅胶柱以高结合力的玻璃纤维滤膜为基质。滤膜在高浓度离子化剂(如盐酸胍或异硫氰酸胍)条件下，可通过氢键和静电等物理化学作用吸附核酸，而蛋白质和其它杂质则不被吸附而去除。吸附了核酸的滤膜经洗涤去除残留的蛋白质和盐，最后可以用低盐缓冲液(如 Buffer TE)或水，洗脱出滤膜上吸附的核酸。得到的核酸纯度高，可直接用于各种下游实验。

AllPure FFPE DNA and RNA Kit 基于硅胶柱纯化方式。石蜡包埋组织样品经脱蜡液脱蜡后，加入裂解液和蛋白酶消化液，RNA 先释放到裂解液，离心后，取上清(含 RNA)用于 RNA 的提取纯化。沉淀(含蛋白酶)再经蛋白酶 K 消化，DNA 释放到裂解液中，再用柱子纯化 DNA。

## 组 成

### AllPure FFPE DNA and RNA Kit C

产品编号	R5116-01C	R5116-02C	R5116-03C
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure RNA Mini Columns I	10	50	250
HiPure DNA Mini Columns I	10	50	250
2ml Collection Tubes	30	150	3 x 250
Buffer DPS(脱蜡液)	10 ml	50 ml	250 ml
Proteinase K	12 mg	24 mg	110 mg
Protease Dissolve Buffer	1.8 ml	1.8 ml	10 ml
Buffer ATL	5 ml	20 ml	80 ml
Buffer GXP	6 ml	30 ml	120 ml
Buffer RV2*	6 ml	50 ml	3 x 50 ml
RNase-Free Water	1.8 ml	15 ml	30 ml
说明书	1	1	1

## 保 质 期

HiPure FFPE DNA and RNA Kit C 可在室温下(15-25℃)干燥保存 18 个月。长期保存时需置于 2-8℃。Proteinase K 干粉采用室温运输，收到产品后，把 Proteinase K 保存于 -20-8℃。低温下， Buffer ATL 可能会有沉淀形成，55℃水浴让沉淀完全溶解后使用。因 RNase Free Water 中不含任何抑菌因子，室温放置或操作时可能会引入细菌或真菌污染。若 RNase Free Water 受到污染，请重新配制。

## 方案 1. 石蜡包埋组织总 RNA 和 DNA 共提取(R5116C)

该方案适合于从石蜡包埋组织样品中提取总 RNA 和 DNA。以下离心条件均在室温下进行。

### 需要准备的材料:

- 按瓶子标签所示，加入适量的无水乙醇稀释 Buffer RVW2，并于室温保存。
  - 溶解 Proteinase K (20mg/ml): 加入 Protease Dissolve Buffer 溶解 Proteinase K 至终浓度为 20mg/ml。轻轻振荡使之溶解，分装保存于-20℃。
1. 用干净刀片去除多余石蜡。把石蜡包埋组织样品切成 5-10 $\mu$ m 的切片。若样品已暴露在空气中，去除表面的 2-3 个切片。立即转移 1-5 片组织切片至 1.5ml 离心管中。
  2. 选择方案 A、方案 B 或方案 C 去除石蜡。

#### 方案 A: 用二甲苯去除石蜡

- A1. 加入 1ml 二甲苯至离心管中，剧烈涡旋 10-30 秒，14,000  $\times$  g 离心 2 分钟；小心吸弃上清液，不要吸到沉淀。
- A2. 加入 1ml 100%乙醇，涡旋混匀 10-30 秒；14,000  $\times$  g 离心 2 分钟；小心彻底吸弃上清液，不要吸到沉淀。
- A3. 打开管盖，室温（15-25℃）或 37℃干燥 15 分钟以彻底去除残留的乙醇。  
注：充分干燥去除乙醇非常重要。残留的乙醇会影响到 RNA 的抽提效率。
- A4. 加入 250 $\mu$ l Buffer ATL 和 20 $\mu$ l Proteinase K 至样品中，55℃温育 60 分钟，90℃温育 1 小时，按第 3 步进行操作。

#### 方案 B: 用脱蜡液去除石蜡

- B1. 加入 0.8ml Buffer DPS(脱蜡液)至样品中，颠倒混匀，56℃水浴 3 分钟，立即涡旋混匀 15 秒让石蜡充分溶解。

- B2. 14,000 × g 离心 2 分钟，小心彻底吸弃上清液，不要吸到沉淀。
- B3. 加入 250µl Buffer ATL 和 20µl Proteinase K 至样品中，55°C 温育 60 分钟，90°C 温育 1 小时，按第 3 步进行操作。

#### 方案 C: 不去除石蜡

- C1. 在 2.0ml 离心管中，加入 2-4 片切片样品，短暂离心让样品收集到管底。
- C2. 加入 350µl Buffer ATL 和 20µl Proteinase K 至样品中，60°C 振荡（500-700rpm）温育 60 分钟。
- C3. 90°C 水浴 1 小时，立即于 13000×g 离心 3 分钟。用移液枪小心穿过石蜡层，转移 300µl 消化液至新的离心管中。

#### DNA 抽提

3. 加入 450µl Buffer GXP 至样品中，涡旋 10 秒。  
Buffer ATL/GXP 混匀时，若有沉淀不能充分溶解，55°C 温育 1-3 分钟让 SDS 充分溶解。
4. 把 HiPure DNA Mini Columns I 装在 2ml 收集管中。转移全部混合液至柱子中。13,000 × g 离心 60 秒，保存滤液，按第 11~18 步进行用于 RNA 提取。
5. 把柱子装在新的收集管中，加入 500µl Buffer RW2 至柱子中。10,000 × g 离心 30-60 秒。
6. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中，加入 500µl Buffer RW2 至柱子中。10,000 × g 离心 30-60 秒。
7. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。10,000 × g 离心 2 分钟甩干柱子的基质。
8. 将柱子转移至新的 1.5ml 离心管，加入 50~100µl 预热至 RNase Free Water 至柱子的膜中央。放置 3 分钟，10,000 × g 离心 1 分钟。
9. (可选)把洗脱液再转移至柱子，放置 3 分钟，10,000 × g 离心 1 分钟。
10. 丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存于 2-8°C，长期保存需保存于 -20°C。

## RNA 抽提

11. 在第 4 步收集管中收集到滤液中，加入 400 $\mu$ l 无水乙醇并吸打混匀 3-5 次。  
若需抽提小片段的 micro RNA 或 small RNA，无水乙醇体积调整为 1100 $\mu$ l。
12. 把 HiPure RNA Mini Column I 装在新的收集管中。转移一半体积的混合液至柱子中。10,000  $\times$  g 离心 30-60 秒。
13. 倒弃流出液，把柱子装在收集管中。转移剩余混合液至柱子中。10,000  $\times$  g 离心 30-60 秒。
14. 倒弃流出液，把柱子装在收集管中。加入 500 $\mu$ l Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中，10,000  $\times$  g 离心 30-60 秒。
15. 倒弃流出液，把柱子装在收集管中。加入 500 $\mu$ l Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中，10,000  $\times$  g 离心 30-60 秒。
16. 倒弃流出液，把柱子装在收集管中。10,000  $\times$  g 离心空柱 2 分钟甩干柱子基质。
17. 将柱子转移至新的 1.5ml 离心管。加入 30-50 $\mu$ l RNase Free Water 至柱子的膜中央。静置 1 分钟。10,000  $\times$  g 离心 1 分钟。
18. 弃去柱子，把 RNA 保存于-80 $^{\circ}$ C。

## 常见问题回答

该列表可能有利于您解决在提取过程中所碰到的问题。Magen 的技术人员也可以随时为您提供咨询服务，若您对试剂盒存在疑问或有良好的建议，又或者您在分子生物学实验中碰到问题，都请您联系我们。我们将竭尽所能为您排忧解难。

现象	原因及解决方法
<b>柱子堵塞</b>	
样品起始用量太多	减少样品用量。正确的样品用量是获得理想结果的必要条件；
裂解液加入乙醇之前，需要离心	
低温离心	试剂盒中除特别指明，所有的离心操作都必须在室温（20-25℃）。离心条件低于 20℃ 时，可能会导致沉淀的形成而引起柱子堵塞。设定离心机的温度为（20-25℃）。上柱时，把裂解液和乙醇混合液放置于 37℃ 水浴有利于减少堵塞现象。
<b>RNA 或 DNA 产量低</b>	
样品不充分匀浆	参照上面
样品的起始用量太多	参照上面
RNA 的洗脱效率低	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 再加入 30-50<math>\mu</math>l RNase Free Water 到膜上，室温静置 5 分钟，然后离心洗脱 RNA。</li> <li>● RNase Free Water 没有加到膜上。</li> </ul>
DNA 洗脱效率低	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 再加入 30-100<math>\mu</math>l 预热至 65℃ 的 Buffer TE 到膜上，室温静置 5 分钟，然后离心洗脱 DNA。</li> <li>● Buffer TE 没有加到膜上。</li> </ul>
乙醇残留	柱子经 Buffer RW2 洗涤后，把空柱子重新装回收集管，室温，10,000 $\times$ g 离心 2 分钟甩干柱子中的乙醇。

<b>RNA 降解</b>	
组织或细胞用量太多	减少样品用量。正确的样品用量是获得理想结果的必要条件。
RNA 酶污染	操作过程引入 RNA 酶的污染
<b>DNA 拖尾现象严重</b>	
匀浆时太过剧烈	DNA 片段大小取决于匀浆过程。若需要大片段 DNA，最好不要用机械匀浆器。
<b>RNA 产物中 DNA 污染</b>	
样品用量太多或样品中基因组 DNA 含量丰富	有些细胞或组织含有丰富的基因组 DNA。减少组织或细胞的用量。进行 DNase 膜上处理彻底去除 DNA。
<b>DNA 产物中存在 RNA 污染</b>	
裂解液含有乙醇	样品经 Buffer GXP 裂解，离心去除杂质后直接过 HiPure DNA 结合柱
样品影响裂解液的 pH	Buffer GXP 的 pH 约为 7.0。确保样品中无盐或碱物质。
<b>下游实验结果不理想</b>	
盐分污染	加入 Buffer RW2 后，静置 5 分钟后，再离心
乙醇污染	确保空柱离心速度高于或等于 12,000xg，离心时间为 2 分钟。
膜材料脱落	硅胶膜在离心过程中可能会发生脱落。脱落到质粒中硅胶膜是不溶解的，可能过 12,000xg 离心 2 分钟去除。

若以上的解答还是无法解决您的问题，请您联系我们。