

版本号: :DP140916

miRNAprep Pure FFPE Kit

石蜡包埋组织切片miRNA提取试剂盒

(离心柱型)

目录号: DP502

产品内容

产品组成	DP502 (50 preps)
裂解液RF (Buffer RF)	12 ml
缓冲液RB (Buffer RB)	2×12 ml
漂洗液RW (Buffer RW)	12 ml
Proteinase K	500 µl
RNase-Free ddH ₂ O (瓶装)	15 ml
RNase-Free吸附柱CR3 (含2 ml收集管) (RNase-Free Spin Column CR3 in a 2 ml Collection Tube)	50 套
DNase I (1500 U)	1支
缓冲液RDD (Buffer RDD)	4 ml
RNase-Free ddH ₂ O (管装)	1 ml
RNase-Free离心管 (1.5 ml) (RNase-Free Centrifuge Tubes 1.5 ml)	50个

储存条件

DNase I, 缓冲液RDD和RNase-Free ddH₂O (管装) 置于2-8°C保存; 其他试剂室温 (15-25°C) 保存。

产品简介

本试剂盒采用特殊的缓冲液系统并优化了相应的实验操作步骤，特别针对福尔马林固定石蜡包埋组织切片(以下简称FFPE)中的miRNA提取进行设计，具有实验样品针对性强，实验快速，提取miRNA质量高等特点。

使用本试剂盒提取的RNA可应用于RT-PCR等下游试验。

使用前注意事项

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。

2. 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。

起始材料

1. 标准的福尔马林固定石蜡包埋程序也常常会造成核酸的片段化。为了尽量降低RNA片段化的可能性，应该按照以下操作步骤进行样本处理：

- 组织切除后应尽快浸入4%-10%的福尔马林溶液中；
- 固定时间最好为14-24 h(固定时间过长会导致RNA片段化更严重，不利于下游的试验)；
- 样本包被之前必须彻底脱水。

2. 应采用新鲜的FFPE组织切片，切片厚度不超过10 μ m，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 mm²。

3. 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，然后根据实验结果，下次制备采用的切片数可以进行调整，但应不超过8片。

操作步骤

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。
 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10 sec。
 3. 室温(15-25 $^{\circ}\text{C}$), 12,000 rpm (~13,400 \times g)离心2 min。
 4. 用枪头吸除上清, 小心不要吸到沉淀。
 5. 加入1 ml无水乙醇于沉淀中, 涡旋混匀。
 6. 室温(15-25 $^{\circ}\text{C}$), 12000 rpm (~13,400 \times g)离心2 min。
 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)。
 8. 打开管盖, 室温(15-25 $^{\circ}\text{C}$)或37 $^{\circ}\text{C}$ 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。
 9. 加入150 μl 裂解液RF以及10 μl Proteinase K于沉淀中, 彻底涡旋混匀。
 10. 55 $^{\circ}\text{C}$ 孵育15 min之后80 $^{\circ}\text{C}$ 孵育15 min。
 11. 冰上放置3 min, 12,000 rpm (~13,400 \times g)离心15 min, 转移上清至新的2 ml RNase-Free离心管中。
 12. 加入16 μl 的RDD buffer和10 μl 的DNase I溶液, 颠倒混匀。室温放置15 min。简短离心以收集管壁及管盖上的液滴。
 13. 加入320 μl 的缓冲液RB, 涡旋混匀。
 14. 加入1120 μl 的无水乙醇, 涡旋混匀(可能会出现沉淀)。
 15. 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 (~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。
 16. 重复步骤15, 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。
-

17. 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。

18. 重复步骤17。

19. 室温(15-25 $^{\circ}$ C)，12,000 rpm (\sim 13,400 \times g)离心2 min，倒掉废液。将吸附柱CR3置于室温放置数分钟，以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。

注意：此步骤目的是将吸附柱CR3中残余的漂洗液去除，漂洗液的残留，可能会影响后续的RT等实验。

20. 将吸附柱CR3转入一个新的RNase-Free离心管中，向吸附膜的中间部位悬空滴加30-100 μ l RNase-Free ddH₂O，室温放置2 min，12,000 rpm (\sim 13,400 \times g)离心2 min。

注意：洗脱缓冲液体积不应少于30 μ l，体积过小影响回收效率。RNA溶液请于-70 $^{\circ}$ C保存。
