

目 录

简 介	2
原 理	2
试剂盒组成	3
保质期	4
准备工作	5
方案 1:石蜡包埋组织 RNA 和 DNA 共提取	6
方案 2:石蜡包埋组织 RNA 和蛋白质共提取	8
常见问题回答	11

版本: 2013-01

简介

AllPure FFPE DNA/RNA Kit B 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。

AllPure FFPE RNA/Protein Kit 是专门为石蜡包埋组织样品的 RNA 和蛋白质共提取而设计的。试剂盒可以从同一份石蜡包埋组织切片中提取得到 RNA 和蛋白质。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。纯化的蛋白可直接用于 SDS-PAGE 和 Western 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。

AllPure FFPE RNA and Protein 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，加入裂解液处理后，RNA 先释放到裂解液，离心后，取上清(含 RNA)用于 RNA 的纯化。沉淀再经裂解液裂解，蛋白质释放到裂解液中，提取纯化后可直接用于 SDS-PAGE 和 Western 杂交。

组 成

AllPure FFPE DNA and RNA Kit B

产品编号	R5116-01B	R5116-02B	R5116-03B
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure RNA Mini Columns I	10	50	250
Buffer DPS(脱蜡液)	10 ml	50 ml	250 ml
Buffer FRL	5 ml	15 ml	60 ml
Buffer RL	5 ml	15 ml	60 ml
Buffer RW2*	5 ml	20 ml	2 x 50 ml
RNase-Free Water	1.8 ml	10 ml	30 ml
Proteinase K	12 mg	50 mg	220 mg
Protease Dissolve Buffer	1.8 ml	5 ml	15 ml
HiPure DNA Mini Columns I	10	50	250
Buffer ATL	5 ml	15 ml	60 ml
Buffer AL	5 ml	15 ml	60 ml
Buffer GW1*	6.6 ml	13 ml	66 ml
Buffer GW2*	6 ml	20 ml	2 x 50 ml
Elution Buffer	1.8 ml	10 ml	30 ml
2ml Collection Tubes	20	100	500
说明书	1	1	1

保 质 期

HiPure FFPE DNA and RNA Kit B 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。

组 成

AllPure FFPE RNA and Protein Kit

产品编号	R5106-01	R5106-02	R5106-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure RNA Mini Columns I	10	50	250
2ml Collection Tubes	10	50	250
Buffer RL	5 ml	30 ml	120 ml
Buffer FWT	2 ml	10 ml	40 ml
Buffer RW2*	5 ml	20 ml	2 x 50 ml
Buffer PR1	5 ml	20 ml	60 ml
Buffer PR2	5 ml	20 ml	60 ml
RNase Free Water	1 ml	10 ml	20 ml
说明书	1	1	1

保质期

HiPure FFPE RNA/Protein Kit 组份可在室温下(15-25℃)干燥保存 18 个月。长期保存时需置于 2-8℃。因 DEPC 处理水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。我们推荐分装 DEPC 处理水并保存于-20℃，以减少污染。若 DEPC 处理水受到污染，请重新配制。

RNase Free Water 的配制:

在试剂瓶中装入适量去离子水，加入 0.1% DEPC，磁力搅拌器搅拌过夜，于 120℃ 灭菌 20-30 分钟。处理后，分装保存于 2-8℃ 或 -20℃。灭菌后 RNase Free Water 处理水有乙醇气味，属于正常现象。

方案 1. 石蜡包埋组织总 RNA 和 DNA 共提取(R5116B)

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 RW2, 并于室温保存。
- 按瓶子标签所示, 加入适量的无水乙醇稀释 Buffer GW1, 并于室温保存。
- 按瓶子标签所示, 加入适量的无水乙醇稀释 Buffer GW2, 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 μ m 的切片。若样品已曝露在空气中, 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;
- A2. 14,000 \times g 离心 2 分钟; 小心吸弃上清液, 不要吸到沉淀;
- A3. 加入 1ml 100%乙醇, 涡旋混匀 10-30 秒; 14,000 \times g 离心 2 分钟;
- A4. 小心彻底吸弃上清液, 不要吸到沉淀;
- A5. 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。
- A6. 按第 3 步进行操作。

方案 B: 用正庚烷/甲醇去除石蜡

- B1. 加入 0.5 ml 正庚烷至离心管中, 剧烈涡旋 10 秒; 室温静置 10 分钟;
- B2. 加入 25 μ l 甲醇, 涡旋 10 秒。14,000 \times g 离心 2 分钟;
- B3. 小心吸弃上清液, 不要吸到沉淀;
- B4. 加入 1ml 100%乙醇, 涡旋混匀 10 秒; 14,000 \times g 离心 2 分钟;
- B5. 小心彻底吸弃上清液, 不要吸到沉淀;
- B6. 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。
- B7. 按第 3 步进行操作。

方案 C: 用脱蜡液去除石蜡

- C1. 加入 0.8ml Buffer DPS(脱蜡液)至样品中, 涡旋混匀。短暂离心确定样品浸泡到 Buffer DPS 中。

- C2. 短暂离心让样品浸泡到脱蜡液中。56℃水浴 3 分钟；
 - C3. 静置让样品恢复至室温。14,000 × g 离心 2 分钟；
 - C4. 小心彻底吸弃上清液，不要吸到沉淀；
 - C5. 按第三步进行操作。
3. **加入 200µl Buffer FRL 和 20µl Proteinase K 至样品中**，涡旋 10 秒重悬样品。
 4. 55℃水浴 15~20 分钟，然后冰上放置 3 分钟。
 5. 室温，20,000 × g 离心 15 分钟。
 6. 小心转移上清液至新的 1.5ml 离心管用于 RNA 抽提，保留沉淀用于 DNA 抽提。此时沉淀可在 2-8℃保存一天，在-20℃可长期保存。

RNA 抽提

7. 把第 5 步的得到的上清液，80℃水浴 15 分钟。
8. **加入 200µl Buffer RL 和 600µl 无水乙醇**，涡旋混匀 15 秒。
注：若抽提的 RNA 含有小片段的 micro RNA 或其它 small RNA，加入无水乙醇为 1100µl。
9. **把 HiPure RNA Mini Column I 装在 2ml 收集管中。转移一半体积的混合液至柱子中。**8,000 × g 离心 30-60 秒。
10. 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。8,000 × g 离心 30-60 秒。
11. 倒弃流出液，把柱子装在收集管中。**加入 500µl Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中**，8,000 × g 离心 30-60 秒。
注：Buffer RW2 在使用之前，必须按瓶子标签所示用无水乙醇进行稀释。
12. 倒弃流出液，把柱子装在收集管中。**加入 500µl Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中**，8,000 × g 离心 30-60 秒。
13. 倒弃流出液，把柱子装在收集管中。13,000 × g 离心空柱 3 分钟，以甩干柱子的基质。
14. 将柱子转移至新的 1.5ml 离心管。**加入 15-50µl RNase Free Water 至柱子的膜中央。**静置 1 分钟。13,000 × g 离心 1 分钟。
15. 弃去柱子，把 RNA 保存于-80℃。

DNA 抽提

16. 取第 6 步获得的沉淀团，**加入 180 μ l Buffer ATL 和 20 μ l Proteinase K 至沉淀团中。**
涡旋 15 秒重悬沉淀。
17. 55 $^{\circ}$ C 水浴 1 小时，然后再 90 $^{\circ}$ C 水浴 1 小时。
18. 短暂离心，**加入 200 μ l Buffer AL 至样品中**，涡旋混匀 15 秒。
19. **加入 200 μ l 无水乙醇至样品中**。涡旋混匀 15 秒。
20. 把 HiPure DNA Mini Columns I 装在 2ml 收集管中。**转移混合液至柱子中**，8,000 \times g 离心 60 秒。
21. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中，**加入 500 μ l Buffer GW1(已用乙醇稀释)至柱子中**，8,000 \times g 离心 30-60 秒。
注：Buffer GW2 在使用之前，必须按瓶子标签所示用无水乙醇进行稀释。
22. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中，**加入 500 μ l Buffer GW2 已用乙醇稀释)至柱子中**，8,000 \times g 离心 30-60 秒。
注：Buffer GW2 在使用之前，必须按瓶子标签所示用无水乙醇进行稀释。
23. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。13,000 \times g 离心 3 分钟，以甩干柱子的基质。
24. 将柱子转移至新的 1.5ml 离心管，**加入 15-30 μ l 预热至 55 $^{\circ}$ C Elution Buffer 至柱子的膜中央**。放置 3 分钟，13,000 \times g 离心 1 分钟。
25. 丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存于 2-8 $^{\circ}$ C，长期保存需保存于-20 $^{\circ}$ C或-80 $^{\circ}$ C。

方案 2. 石蜡包埋组织总 RNA 和蛋白质共提取

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，加入适量的异丙醇稀释 Buffer FWT，并于室温保存。
 - 按瓶子标签所示，加入适量的无水乙醇稀释 Buffer RW2，并于室温保存。
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 μ 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 1-10 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；
- A2. 14,000 \times g 离心 2 分钟；小心吸弃上清液，不要吸到沉淀；
- A3. 加入 1ml 100%乙醇，涡旋混匀 10-30 秒；14,000 \times g 离心 2 分钟；
- A4. 小心彻底吸弃上清液，不要吸到沉淀；
- A5. 打开管盖，室温（15-25 $^{\circ}$ C）或 37 $^{\circ}$ C 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。
- A6. 按第 3 步进行操作。

方案 B: 用正庚烷/甲醇去除石蜡

- B1. 加入 0.5 ml 正庚烷至离心管中，剧烈涡旋 10 秒；室温静置 10 分钟；
- B2. 加入 25 μ l 甲醇，涡旋 10 秒。14,000 \times g 离心 2 分钟；
- B3. 小心吸弃上清液，不要吸到沉淀；
- B4. 加入 1ml 100%乙醇，涡旋混匀 10 秒；14,000 \times g 离心 2 分钟；
- B5. 小心彻底吸弃上清液，不要吸到沉淀；
- B6. 打开管盖，室温（15-25 $^{\circ}$ C）或 37 $^{\circ}$ C 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。
- B7. 按第 3 步进行操作。

方案 C: 用脱蜡液去除石蜡

- C1. **加入 0.8ml Buffer DPS(脱蜡液)至样品中，涡旋混匀。**短暂离心确定样品浸泡到 Buffer FRC 中。
 - C2. 短暂离心让样品浸泡到脱蜡液中。56℃水浴 3 分钟；
 - C3. 静置让样品恢复至室温。14,000 × g 离心 2 分钟；
 - C4. 小心彻底吸弃上清液，不要吸到沉淀；
 - C5. 打开管盖，37℃干燥 15 分钟；
 - C6. 按第三步进行操作。
3. **加入 400µl Buffer RI 至样品中，涡旋 15 秒打散样品。**
 4. 用机械匀浆器或一次性研磨棒(可订购)进一步匀浆样品。
 5. 70℃水浴 60 分钟。冰上放置 3 分钟。
 6. 14,000 × g 离心 5 分钟。小心转移上清液至新的 1.5ml 离心管中用于 RNA 抽提。
 7. 保留沉淀用于蛋白质抽提。

RNA 抽提

8. **加入 600µl 无水乙醇至上清液中。**涡旋混匀 15 秒。
9. **把 HiPure RNA Mini Column1 装在 2ml 收集管中。转移一半体积的混合液至柱子中。**8,000 × g 离心 30-60 秒。收集滤液并转移至新的 1.5ml 离心管中。
10. 把柱子装在收集管中。转移剩余混合液至柱子中。8,000 × g 离心 30-60 秒。收集滤液并转移至同一个 1.5ml 离心管中。
11. 把柱子装在收集管中。**加入 500µl Buffer FWT(已用异丙醇稀释)至柱子中。**8,000 × g 离心 30-60 秒。
注：Buffer FWT 在使用之前，必须按瓶子标签所示用异丙醇进行稀释
12. 倒弃流出液，把柱子装在收集管中。**加入 500µl Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中。**8,000 × g 离心 30-60 秒。
注：Buffer RW2 在使用之前，必须按瓶子标签所示用无水乙醇进行稀释。
13. 倒弃流出液，把柱子装在收集管中。**加入 500µl Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中。**8,000 × g 离心 30-60 秒。

14. 倒弃流出液，把柱子装在收集管中。13,000 × g 离心空柱 3 分钟，以甩干柱子的基质。

将柱子转移至新的 1.5ml 离心管。加入 15-30μl RNase Free Water 至柱子的膜中央。静置 2 分钟。13,000 × g 离心 1 分钟。

15. 弃去柱子，把 RNA 保存于-80℃。

蛋白质抽提

16. 取第 9 和 10 步获得的滤液，加入等体积 Buffer PR1。涡旋混匀，室温静置 10 分钟。

17. 12,000 × g 离心 10 分钟离心沉淀蛋白。小心倒弃上清液。

18. 加入 500μl 70%乙醇，涡旋混匀。

19. 12,000 × g 离心 2 分钟。小心吸弃所有的上清液。

20. 空气干燥 10-15 分钟。

21. 加入 100 μl Buffer PR2(5% SDS)或其它缓冲液。涡旋或研磨打散沉淀团。

22. 吸取重悬液至第 7 步获得的沉淀团中。涡旋重悬沉淀。

23. 100℃水浴 1 小时。60℃水浴 2 小时充分溶解蛋白质。

24. 冷却到室温。12,000 × g 离心 2 分钟去除不溶解的物质。

25. 转移蛋白质至新离心管，放置 4℃或-20℃，或立即 SDS-PAGE 电泳，或定量等。

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
柱子堵塞	
样品不充分打散或匀浆	参照样品的打散及匀浆，提高样品的裂解效果； 减少样品的用量或增加裂解液 RTL 的用量和延长匀浆时间； 若样品含有丰富的蛋白质，推荐使用 HiPure Tissue RNA Kit。
样品起始用量太多 裂解液加入乙醇之前，需要离心	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； 处理组织、酵母和、细菌时，裂解液在加入乙醇之前需要离心去除不溶的杂质。沉淀中含有细胞碎片会引起柱子的堵塞。处理某些组织样品时，离心后裂解液表面还可能有一层脂类层，转移上清液尽量不要吸到这些物质。
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°C）。离心条件低于 20°C 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°C）。上柱时，把裂解液和乙醇混合液放置于 37°C 水浴有利于减少堵塞现象。
RNA 或 DNA 产量低	
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"> ● 再加入 30-50μl DEPC 水到膜上，室温静置 5 分钟，然后离心洗脱 RNA。 ● DEPC 水没有加到膜上。 ● DEPC 水 pH 值太低。
DNA 洗脱效率低	<ul style="list-style-type: none"> ● 再加入 30-100μl 预热至 65°C 的 Buffer TE 到膜上，室温静置 5 分钟，然后离心洗脱 DNA。 ● Buffer TE 没有加到膜上。

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 × g 离心 2 分钟甩干柱子中的乙醇。

培养液没有彻底去除 从细胞中提取 RNA 时，要把培养液彻底吸弃。

RNA 降解

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

DNA 拖尾现象严重

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。

RNA 产物中 DNA 污染

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。

DNA 产物中存在 RNA 污染

裂解液含有乙醇 样品经 FTL lysis Buffer 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 FTL lysis Buffer 的 pH 约为 7.0。确保样品中无盐或碱物质。

下游实验结果不理想

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。