

石蜡包埋组织切片miRNA提取 试剂盒(DP502) 操作指南

天根生化科技（北京）有限公司

版本号：20170524

实验准备

1. 石蜡切片或石蜡块样本
2. 无水乙醇，二甲苯
3. 移液器及配套RNase-Free无菌枪头（200 μ l，1 ml）；1.5 ml，2.0 ml 离心管（RNase-free）
4. 涡旋振荡器，台式低温离心机，金属浴/水浴



实验准备-试剂盒准备

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。在加入无水乙醇后在瓶身做好标记。



Step 1



使用石蜡切片样本时，取切片（5-10 μm 厚， $1 \times 1 \text{ cm}^2$ 大小）2-8张，刮取样本。



使用石蜡块样本时，将石蜡样品切成5-10 μm 厚的片状，切2-8片。

注意：使用石蜡块样本时，如果样品表面暴露于空气中，最初的2~3片弃掉不用。

Step 2



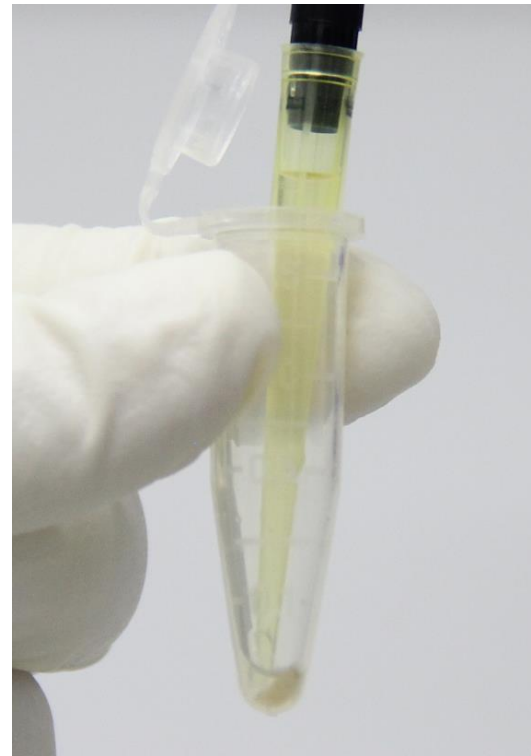
迅速将切片或刮取的样本置于1.5 ml RNase-free的离心管中，加入1 ml二甲苯，剧烈涡旋10 sec。

Step 3



12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 室温离心2 min, 弃上清。

注意：建议用移液枪吸除上清，不要吸到沉淀；不要用倾倒去除上清。



Step 4

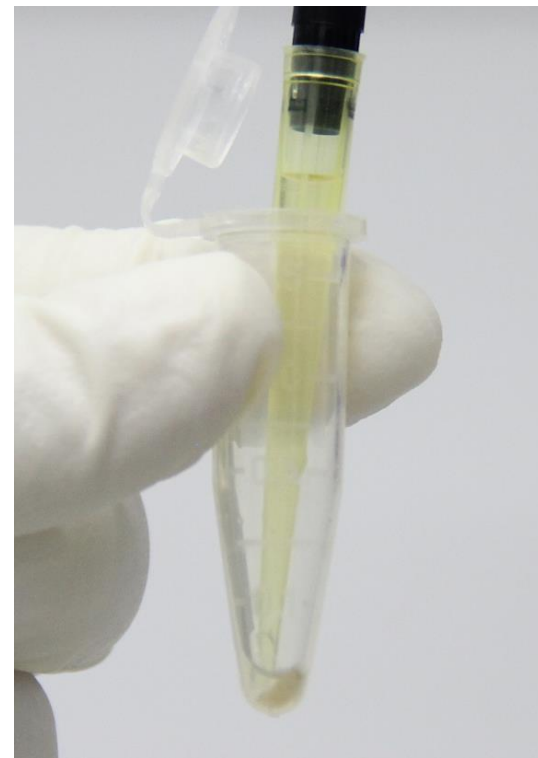


在上述管中加入1 ml无水乙醇，涡旋混匀10 sec。

Step 5



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



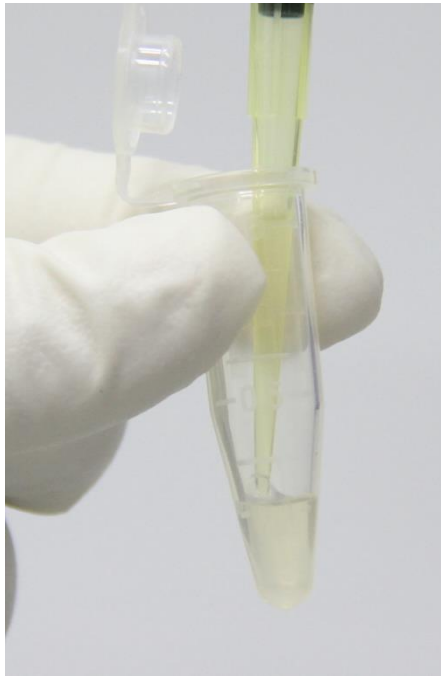
用枪头吸除上清，小心不要吸到沉淀
用一个新的枪头小心吸出残余的乙醇。

Step 6



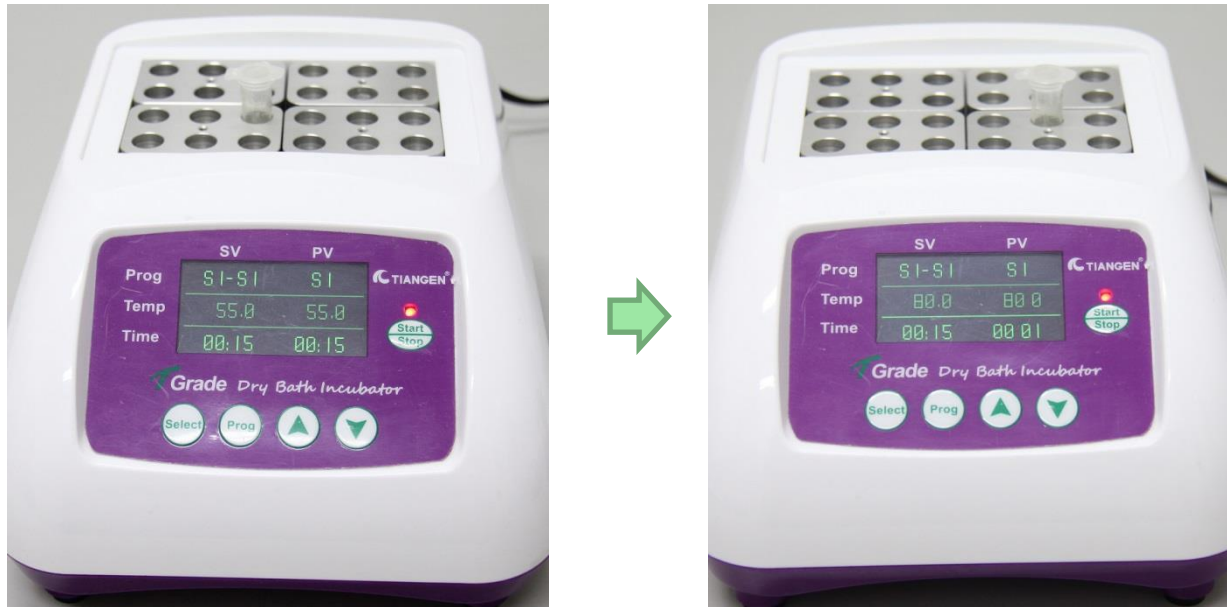
打开管盖，室温(15-25°C)或37°C放置10 min直至残余的乙醇挥发完全。
残余的乙醇会对RNA产生影响。

Step 7



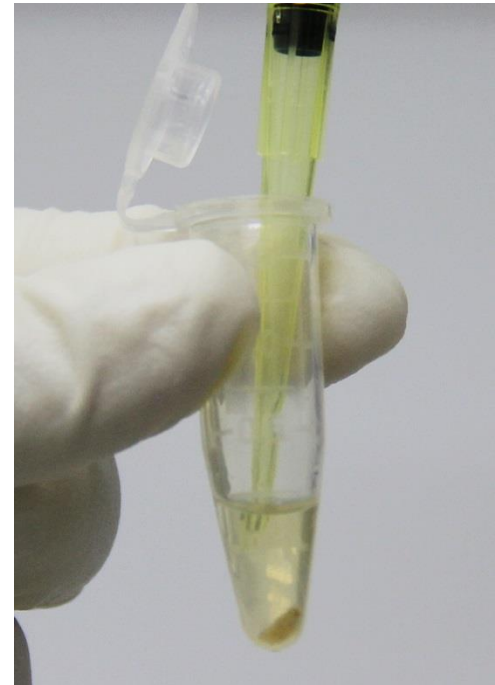
加入150 μ l裂解液RF以及10 μ l Proteinase K于沉淀中，彻底涡旋混匀。

Step 8



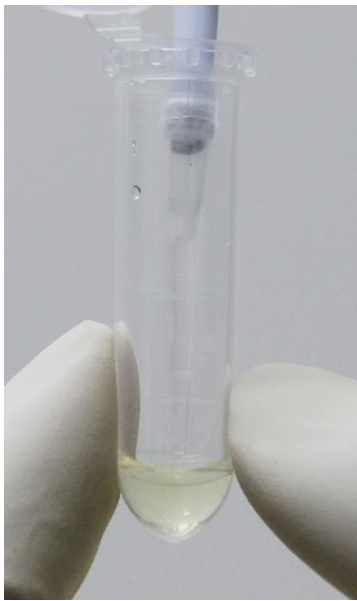
55°C孵育15 min之后80°C孵育15 min。

Step 9

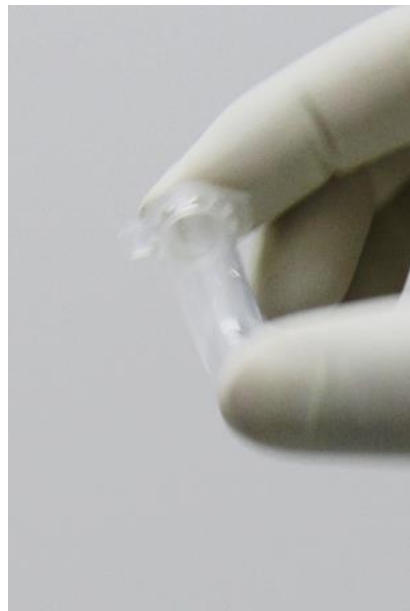


冰上放置3 min，12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$)离心15 min，转移上清至新的2 ml RNase-Free离心管中。

Step 10



加入 16 μ l 的 RDD
和 10 μ l 的 DNase I

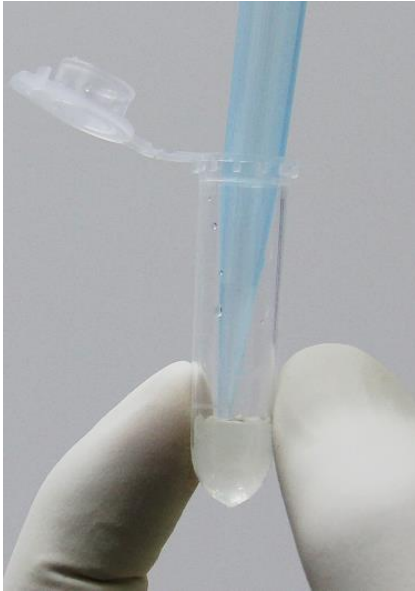


颠倒混匀

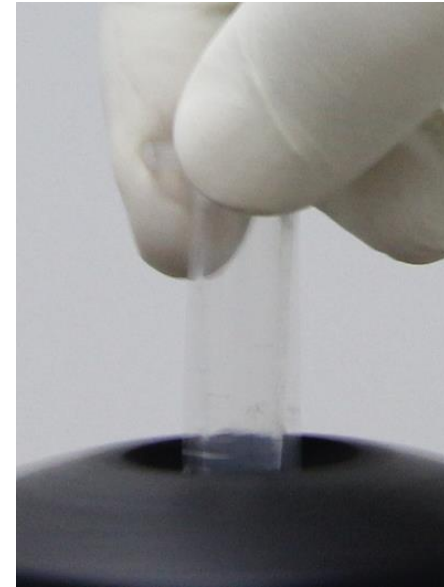
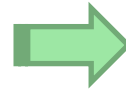


室温放置 15 min

Step 11

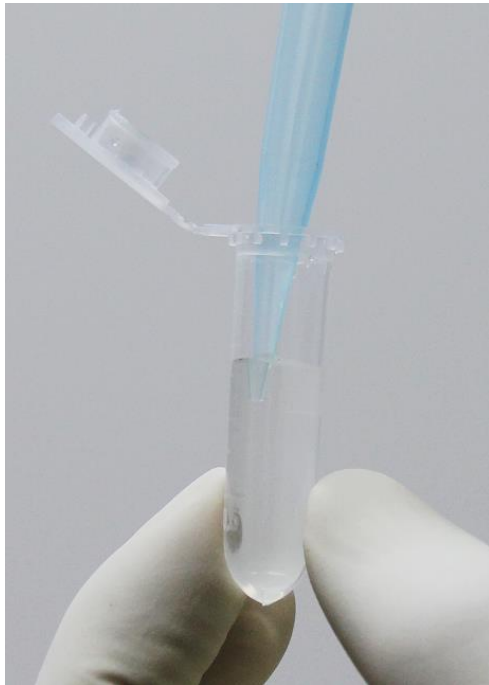


加入320 μ l缓冲液RB

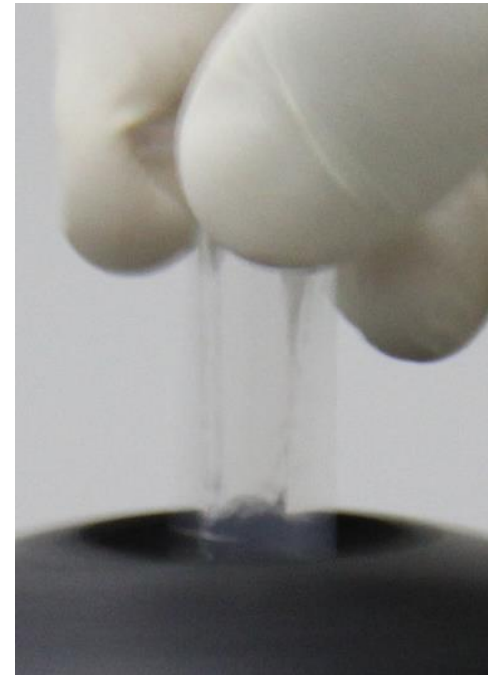
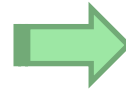


涡旋混匀

Step 12



加入1120 μ l的无水乙醇



涡旋混匀(可能会出现沉淀)

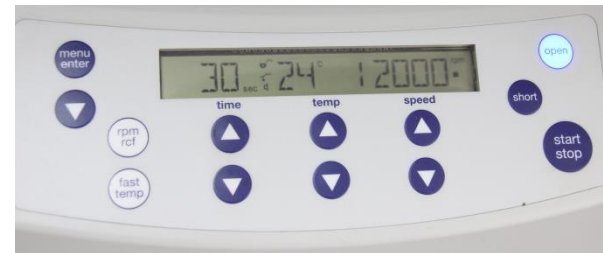
Step 13 and 14



转移700 μ l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。

Step 14 重复步骤13直到所有溶液完全通过吸附柱CR3，弃废液，将吸附柱CR3放回收集管中。

Step 15 and 16



向吸附柱CR3中加入500 μ l漂洗液RW (请先检查是否已加入乙醇)

室温静置2 min, 室温 12,000 rpm (~13,400 \times g)离心30-60 sec, 弃废液。

Step 16 重复步骤 15一次

Step 17



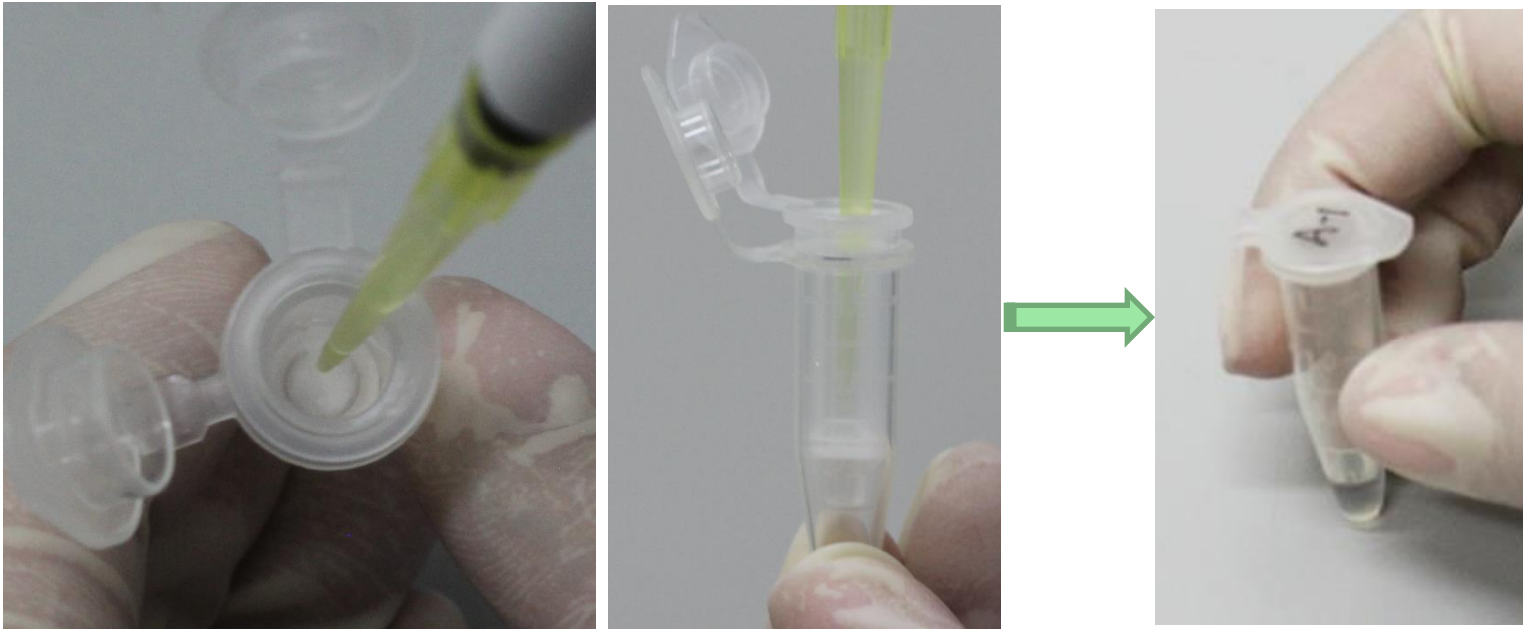
将吸附柱CR3放入2 ml收集管中，室温 12,000 rpm (~13,400×g)离心2 min，去除残余液体。



吸附柱CR3室温放置2-5 min
彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。

此步骤目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除，漂洗液中乙醇的残留会影响后续的酶反应（酶切、PCR等）实验。

Step 18



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 μl RNase-Free ddH₂O，室温放置2 min，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。RNA溶液请于-70°C保存，以防降解。