|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **天净沙系列** | **CAT#:220715-50****常温运输和保存** | ***e13946acdbc5c1a1176b84696beed66*** |
| **[免RNA提取FFPE RT-PCR试剂盒](http://www.bingene.com/116193.html)** |
| **使用手册V1.0** |
| **江苏天净沙基因诊断技术有限公司****网址：[www.bingene.com](http://www.bingene.com)；电话：400-6605850；电邮：order@bingene.com** |

|  |  |
| --- | --- |
| **产品及特点** | 福尔马林固定和石蜡包埋（FFPE）组织是疾病机制的回顾性临床研究中使用最为广泛的标本。但是由于它们的保存时间一般都比较长，很不容易从中提取到可以进行PCR的RNA，存在的主要问题是RNA的降解和脱蜡过程中样品的丢失。本产品专门用来免提取释放切片核酸的试剂盒，它具有如下特点:1. 免核酸提取，可以直接作为核酸扩增的模板。
2. cDNA第一链合成试剂盒可灵活选用随机引物、Oligo dT引物或专一引物，适合各种情况。
3. PCR mix含有上样染料，所以PCR产物可直接上样电泳。
4. 两管式操作，RT和PCR分步进行，便于单独优化RT反应和PCR反应的条件。
5. 扩增效率高，最高可扩增1kb以上的RNA。
6. 本试剂盒足够对50张石蜡切片进行免提取RT-PCR扩增。
7. 本产品只能用于科研。
 |
| **规格及成分** |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 成份 | 编号 | 规格 | 包装材料 |
| FFPE RNA释放剂 | 220715a | 30 mL | 30 mL本色瓶 |
| 2×RT-PCR Buffer | 91202a | 500 uL | 0.5 mL本色管 |
| 10×RT-PCR酶混合液 | 91202b | 50 uL | 0.5 mL红盖管 |
| RNase-free水 | 980403 | 1 mL |  2 mL蓝盖管 |
| 使用手册 | 220715sc | 1份 | 无 |

本产品使用小扁盒包装 |
| **运输及保存** | 低温运输，-20°C保存，有效期一年。 |
| **自备试剂** | 阳性对照和阴性对照，RNase-free 的1.5 mL离心管（耗材） |
|  | **一、样品RNA的释放**1. 如果有N个样品，可设置N+2个提取，多出的一个是PC（样品制备阳性对照），一个是NC（样品制备阴性对照）。可以用水作为制备的阴性对照。
2. 将 1-5片厚度为6-8um 的石蜡包埋组织切片转移到1.5mL塑料离心管中，并加入1 mL FFPE RNA释放剂溶，振荡器上以最大速度振荡10 秒。
3. 室温放置10分钟。
4. 室温14000g离心1分钟。
5. 将上清（含RNA）转移到一个新的RNase-free离心管中。此上清液可以直接用做PCR、RT-PCR、LAMP 和 RT-LAMP 扩增的模板，未用完的可以放-80°C长期保存。

**二、设置RT-PCR反应（20μL体系）**1. 标记N+4个PCR管，其中N+2个用于上步得到的RNA样品，额外增加的两个管一个用于RT-PCR阳性对照，另一个用于RT-PCR阴性对照。按照下表在各PCR管中加入下列成分：

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 成份 | N+2个样品管 | RT-PCR阴性对照 | RT-PCR阳性对照 |
| 2×RT-PCR Buffer | 各10 μL | 10 μL | 10 μL |
| 10×RT-PCR酶混合液 | 1 μL | 1 μL | 1 μL |
| 自备RT-PCR引物，10pmol/uL | 各2 μL | 2 μL | 2 μL |
| 制备的N+2个RNA模板 | 各7 μL | 不加 | 不加 |
| 超纯水 | 不加 | 7 μL | 不加 |
| 自备RT-PCR阳性对照（如果有） | 不加 | 不加 | 7 μL |

1. 上机进行RT-PCR。下面的RT-PCR反应参数仅供参考:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **过程** | **温度** | **时间** |
| 逆转录 | 42℃ | 55分钟 |
| 预变性 | 95℃ | 5分钟 |
| PCR反应（30个循环） | 95℃ | 15秒 |
| 55℃ | 60秒 |
| 65℃ | 60秒 |
| 延伸 | 72℃ | 10分钟 |

**三、电泳分析**1. 取10uL扩增产物进行常规琼脂糖电泳，检测扩增效果。
 |
| **关联产品** | 石蜡包埋组织RNA纯化试剂盒 |

20220715dx