

Isolation von: RNA

Ausgangsmaterial: Formalin-fixiertes und in Paraffin-eingebettetes Gewebe

Kit: Maxwell® 16 FFPE LEV RNA Purification Kit **AS1260**

ANMERKUNG: Firmwareversion 4.95 oder höher für AS2000 bzw. 1.50 oder höher für AS3000 erforderlich

Probenvorbereitung:

- 1.) Lösen Sie die im Kit enthaltene lyophilisierte DNase I in **275 µl** Nuklease-freiem Wasser auf (Röhrchen invertieren, um ggf. Lyophilisat am Deckel aufzulösen. Nicht vortexen!). Die so erhaltene Stammlösung können Sie für den späteren Gebrauch einfrieren (-20°C, maximal 10 Einfrier-/Auftauzyklen).
- 2.) Überführen Sie Ihr Probenmaterial (5-10 µm dicke FFPE-Schnitte mit einer Gesamtgewebemenge von bis zu 2,0 mm³) in ein 1,5 ml Probengefäß und bedecken es mit **300 µl** Mineralöl.
- 3.) Inkubieren Sie den Ansatz 2 min bei 80°C. Stellen Sie die Proben auf Raumtemperatur während Sie den Mastermix ansetzen.
- 4.) Bereiten Sie einen Mastermix aus **224 µl** Lysepuffer, **25 µl** Proteinase K und **1 µl** Blue Dye vor (n+2 Ansätze für n Proben; bei n = 1 bis 5 genügen n+1).
HINWEIS: Verbrauchen Sie den Mastermix innerhalb 1 h!
- 5.) Fügen Sie **250 µl** des Mastermixes hinzu und vortexen Sie anschließend für 5 s.
- 6.) Zentrifugieren Sie die Proben 20 s bei 10,000 × g, um die Phasen zu trennen. Falls ein Pellet in der wässrigen Phase (unten, blau) zu sehen ist, diese vorsichtig mit einer Pipette mischen, um das Pellet zu resuspendieren.
- 7.) Proben 15 min bei 56°C inkubieren.
- 8.) Proben 1 h bei 80°C inkubieren.
- 9.) Proben 15 min bei Raumtemperatur abkühlen lassen.
- 10.) Bereiten Sie einen DNase-Cocktail durch Pipettieren von **26 µl** MnCl₂, **14 µl** DNase Buffer und **10 µl** rekonstituierter DNase I **in dieser Reihenfolge** vor (n+2 bzw. n+1 Ansätze wie beim Mastermix).
- 11.) Pipettieren Sie **50 µl** DNase-Cocktail zur wässrigen (blauen) Phase der Probe. Mischen Sie durch zehnmaliges auf und ab Pipettieren.
- 12.) Proben 15 min bei Raumtemperatur (15-30°C) inkubieren.
- 13.) 2 min bei maximaler Geschwindigkeit in einer Tischzentrifuge zentrifugieren.
- 14.) Die blaue, wässrige Phase sofort in die erste Kammer der vorbereiteten Kartusche (s. Rückseite) pipettieren

Extraktion:

- 1.) Setzen Sie eine LEV-Kartusche in das Probenrack und entfernen Sie die Schutzfolie.
- 2.) Stellen Sie eines der im Kit enthaltenen Elutions-Gefäße in das Probenrack und befüllen Sie dieses mit **50 µl** des mitgelieferten Nuklease-freien Wassers (s. **1**).
- 3.) Platzieren Sie einen Stößel an der angegebenen Position in der Kartusche (s. **2**).
- 4.) Überführen Sie anschließend die gesamte wässrige Phase in die erste Kammer der Kartusche (s. nachfolgende Zeichnung, **3**). Eventuell im Probengefäß vorhandene Paraffin-Reste sollten nicht in die Maxwell-Kartusche transferiert werden!
- 5.) Wählen Sie im Gerätemenü für **LEV** das Programm: **RNA → FFPE** und starten Sie den Lauf.
- 6.) Nach der Extraktion setzen Sie das Eluat gemäß den Anforderungen des nachfolgenden Testsystems ein.

