

Isolation von: **Gesamt-RNA**

Ausgangsmaterial: Formalin-fixiertes und in Paraffin-eingebettetes Gewebe

Kit: RSC RNA FFPE Kit **AS1440**

Probenvorbereitung

- 1.) Die im Kit enthaltene lyophilisierte DNase I in **275 µl** Nuklease-freiem Wasser auflösen (Röhrchen invertieren, um ggf. Lyophilisat am Deckel aufzulösen. Nicht vortexen!). Die so erhaltene Stammlösung für den späteren Gebrauch einfrieren (-20°C, maximal 10 Einfrier-/Auftauzyklen).
- 2.) Probenmaterial (5-10 µm dicke FFPE-Schnitte mit einer Gesamtgewebemenge von bis zu 2,0 mm³) in ein 1,5 ml Probengefäß überführen und mit **300 µl** Mineralöl bedecken.
- 3.) Den Ansatz 2 min bei 80°C inkubieren. Die Proben auf Raumtemperatur stellen während Sie den Mastermix ansetzen.
- 4.) Einen Mastermix aus **224 µl** Lysepuffer, **25 µl** Proteinase K und **1 µl** Blue Dye vorbereiten (n+2 Ansätze für n Proben; bei n = 1 bis 5 genügen n+1).

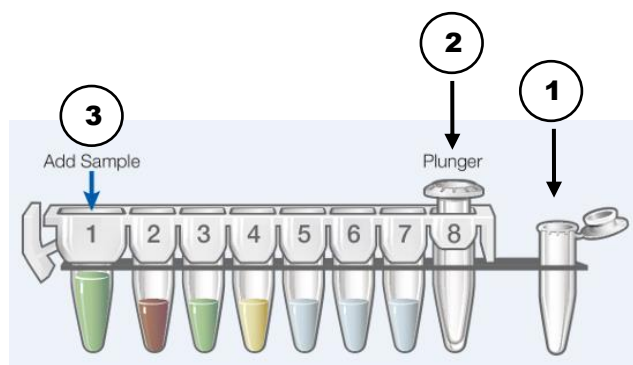
HINWEIS: Verbrauchen Sie den Mastermix innerhalb 1 h!

- 5.) **250 µl** des Mastermixes hinzufügen und anschließend für 5 s vortexen.
- 6.) Die Proben 20 s bei 10,000 × g zentrifugieren, 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.) Einen DNase-Cocktail durch Pipettieren von **26 µl** MnCl₂, **14 µl** DNase Buffer und **10 µl** rekonstituierter DNase I **in dieser Reihenfolge** vorbereiten (n+2 bzw. n+1 Ansätze wie beim Mastermix).
- 11.) **50 µl** DNase-Cocktail zur wässrigen (blauen) Phase der Probe pipettieren. Durch zehnmaliges auf und ab Pipettieren mischen.
- 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

Bitte beachten: Dieses Protokoll ist eine Anleitungs-Empfehlung und ersetzt keine laborinterne Evaluierung. Weitere Informationen erhalten Sie im Technical Manual unter www.promega.com/resources/protocols

Extraktion:

- 1.) Eine Kartusche in das Probenrack setzen und die Schutzfolie entfernen.
- 2.) Eines der im Kit enthaltenen Elutions-Gefäße in das Probenrack stellen und dieses mit **50 µl** nukleasefreiem Wasser befüllen (s. ①).
- 3.) Einen Stößel an der angegebenen Position in der Kartusche (s. ②) platzieren.
- 4.) Anschließend die gesamte wässrige Phase in die erste Kammer der Kartusche überführen (s. ③). Eventuell im Probengefäß vorhandene Paraffin-Reste sollten nicht in die Maxwell-Kartusche transferiert werden!
- 5.) Im Gerätemenü das passende Programm zum **RNA FFPE Kit** wählen und den Lauf starten.
- 6.) Nach der Extraktion das Eluat gemäß den Anforderungen des nachfolgenden Testsystems einsetzen.



Bitte beachten: Dieses Protokoll ist eine Anleitungs-Empfehlung und ersetzt keine laborinterne Evaluierung. Weitere Informationen erhalten Sie im Technical Manual unter www.promega.com/resources/protocols