EndoPredict RNA萃取紀錄表

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 病患姓名 |  | 病歷號 |  | 分子病理號 |  |

操作人員:\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ 操作日期:\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

1. 儀器:
   * 開啟高速恆溫震盪器(編號:\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_)；使用時間\_\_\_\_:\_\_\_\_，共\_\_\_\_時\_\_\_分鐘。
   * 開啟高速恆溫震盪器(編號:\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_)；使用時間\_\_\_\_:\_\_\_\_，共\_\_\_\_時\_\_\_分鐘。
2. 試劑耗材:

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 名稱 | 廠牌 | 批號 | 效期 |
| Tissue preparation reagent kit | Myriad |  |  |
| Proteinase K | Myriad |  |  |
| EndoPredict QC Strip | Myriad |  |  |

1. 作業流程: 完成該步驟後請打勾。
   * 準備RNase-free 1.5mL 反應管，於管壁上標示檢體編號。
   * 準備組織蠟塊，切取厚度為10 µm的組織切片收集至反應管中；或使用RNase-free filter tip將附著在玻片上的組織切片刮取至反應管中；檢體採集時間\_\_\_\_點\_\_\_\_分。
   * 將檢體於室溫下離心1分鐘、15,000 × g。
   * 取150 µL BUFFER FFPE到檢體中。
   * 將檢體放置於80℃的恆溫震盪器中，調整轉速為1,400 × rpm、30分鐘。
   * 將檢體離心15,000 × g、30秒，此時將恆溫震盪器的溫度設定從80℃調整為25℃。
   * 接著添加50 µL proteinase K到各個檢體中，置於65℃的恆溫震盪器中，調整轉速為1,400 rpm，使其反應30分鐘。
   * 接著將檢體離心15,000 × g、30秒，此時將恆溫震盪器的溫度設定從65℃調整為70℃。
   * 取出上清液轉移到新的、已標示檢體編號的RNase-free1.5mL 反應管中。
   * 取出MAG BEADS並震盪1分鐘，接著取50µL MAG BEADS加到各個檢體中；**如果檢體數量超過3個以上，則每加3個檢體後，須重新震盪MAG BEADS至少20秒。**
   * 將檢體放置於25℃的恆溫震盪器上，調整轉速為1,400 × rpm、15分鐘。
   * 將檢體離心15,000 × g、30秒。
   * 將檢體放置於磁座(magnetic rack)上，**確保裡面的磁性物質是附著於管壁上而非沉澱於管底。**
   * 調整25℃的恆溫震盪器的溫度設定為37℃。
   * 小心的移除上清液，接著避開磁性物質、小心的取出組織檢體並棄置於感染性垃圾桶中。
   * 加入850 µL WASH 1到反應管中，上下反轉數次重新混和磁性物質。

**----------請翻頁繼續操作----------**

EndoPredict RNA萃取紀錄表

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 病患姓名 |  | 病歷號 |  | 分子病理號 |  |

* + 離心15,000 × g、30秒。
  + 將檢體放置於磁座(magnetic rack)上，**確保裡面的磁性物質是附著於管壁上而非沉澱於管底。**
  + 小心的移除上清液，接著避開磁性物質、小心的取出組織檢體並棄置於感染性垃圾桶中。
  + 加入450 µL WASH 2到反應管中，上下反轉數次重新混和磁性物質。
  + 離心15,000 × g、30秒。
  + 將檢體放置於磁座(magnetic rack)上，**確保裡面的磁性物質是附著於管壁上而非沉澱於管底。**
  + 小心的移除上清液，接著避開磁性物質、小心的取出組織檢體並棄置於感染性垃圾桶中。
  + 加入 850 µL WASH 3到反應管中，上下反轉數次重新混和磁性物質。
  + 離心15,000 × g、30秒。
  + 將檢體放置於磁座(magnetic rack)上，**確保裡面的磁性物質是附著於管壁上而非沉澱於管底。**
  + 將殘留的液體徹底的移除後，加入100 µL BUFFER ELUTE。
  + 將檢體放置於70℃的恆溫震盪器中，調整轉速為1,400 rpm、10分鐘，之後將溫度設定至80℃。
  + 配製DNase I / BUFFER DNase I混合溶液: **此步驟絕對不可以使用振盪器混合，以避免破壞酵素活性。**

檢體數量 ×11µL (10× BUFFER DNase I) +檢體數量× 2.2µL( DNase I) = Total\_\_\_\_µL

* + 將混合均勻的DNase I / BUFFER DNase I混合溶液取12µL 分裝至已標示檢體編號的新的RNase-free 1.5mL反應管中。
  + 離心15,000 × g、30秒。
  + 將檢體放置於磁座(magnetic rack)上，**確保裡面的磁性物質是附著於管壁上而非沉澱於管底。**
  + 取90µL 的檢體到裝有DNase I / BUFFER DNase I的反應管中。
  + 將檢體放置於37℃的恆溫震盪器中反應30分鐘，不須震盪。
  + 離心15,000 × g、30秒。
  + 將檢體放到80℃恆溫震盪器中、10分鐘，以終止DNase I的活性。
  + 最後離心(spin down)，待檢體溫度回到室溫後，便可用於EndoPredict檢測中，如沒有要立即使用，需儲存於-80℃冰箱中。

1. RNA QC Check ﹕使用EndoPredict QC Strip進行RNA產量驗證和DNA切割品質驗證等控值組實驗。
   * 於-20℃冰箱中取出1組EndoPredict QC Strip，於96孔保冷盤上回溫30分鐘，接著離心450 g、1分鐘，再放回保冷盤上。

**----------請翻頁繼續操作----------**

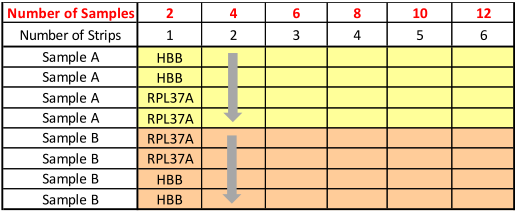
EndoPredict RNA萃取紀錄表

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 病患姓名 |  | 病歷號 |  | 分子病理號 |  |

* + 依照「Aglient MX3005P QPCR作業標準書FA01-010」開啟儀器暖機；使用時間\_\_\_\_:\_\_\_\_，共\_\_\_\_時\_\_\_分鐘。
  + 取出2× Reaction buffer以及RNA檢體，振盪混合均勻後，離心使溶液集中與管底，接著放置於保冷盤上或冰上。
  + 依照檢體數量配製PCR混合液，PCR混合液配製方式請參考下表。

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 檢體數量 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| QC Strip數量 | 0.5 | 1 | 1.5 | 2 | 2.5 | 3 |
| qPCR-H2O | 43 µL | 86 µL | 129 µL | 172 µL | 215 µL | 258 µL |
| 2×Reaction buffer | 50 µL | 100 µL | 150 µL | 200 µL | 250 µL | 300 µL |
| RT-Mix | 2 µL | 4 µL | 6 µL | 8 µL | 10 µL | 12 µL |

* + 將配製好的PCR混合液混合均勻，接著取85.5µL的PCR混合液跟4.5µL檢體DNA混合均勻。
  + 接著取20µL 混合物加到QC Strip的well中，每一個檢體需要加四個well，1個strip可以加2個檢體。



* + 將QC Strip蓋上蓋子，離心450 g、5分鐘，接著上機，依照「Aglient MX3005P QPCR作業標準書FA01-010」進行資料分析，確認每一個檢體的HBB和RPL37A的Ct值。

1. QC結果﹕
   1. HBB的Ct值須大於38，如果小於38，表示檢體有殘留DNA，必須再做一次DNA切割。
   2. 在使用1倍RNA樣品進行測試的狀況下，RPL37A的Ct值必須小於24，在雙倍RNA進行測試的狀況下，RPL37A的Ct值必須介於24-26，在三倍RNA進行測試的狀況下，RPL37A的Ct值必須介於26-27。

□可接受 □不可接受，\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_。

醫檢師﹕\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ 日期﹕\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_