



北京博凌科为生物科技有限公司

Beijing BLKW Biotechnology Co., Ltd.

Tel: 010-57158602/52872342/80773165 (Fax)

[Http://www.blkwbio.com/](http://www.blkwbio.com/)

E-mail: blkwbio@blkwbio.com

- ◆ **HiFi 石蜡包埋组织 RNA 快速提取试剂盒**
- ◆ **目录号 1130**
- ◆ **使用手册**
- ◆ **实验室使用，仅用于体外**

HiFi 石蜡包埋组织 RNA 快速提取试剂盒

目录号: 1130

❖ 适用范围:

适用于快速从福尔马林固定、石蜡包埋组织样品中提取总RNA，RNA可用于反转录PCR，荧光定量PCR。

❖ 试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	50 次(113001)
裂解液 PKD	室温	15 ml
结合液 RBC	室温	25 ml
漂洗液 RW	室温	10ml <i>第一次使用前按说明加指定量乙醇</i>
蛋白酶 K 粉 (可选) 40mg/ml	-20℃	20mg
RNase-free H ₂ O	室温	10 ml
基因组 DNA 清除柱和 收集管	室温	50 套
RNA 吸附柱 RA 和收 集管	室温	50 套

本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。

储存事项:

1. 所有的溶液应该是澄清的，**如果环境温度低时溶液可能形成沉淀**，此时不应该直接使用，可在 37℃ 水浴加热几分钟，即可恢复澄清。
2. 不合适的储存于低温（4℃ 或者 -20℃）会造成溶液沉淀，影响使用效果，因此运输和储存均在室温下（15℃ - 25℃）进行。
3. 为避免降低活性，方便运输，提供**蛋白酶 K 为冻干粉状**，收到后，可短暂离心后，加入 **0.5 毫升灭菌水溶解（终浓度 40mg/ml）**。因为反复冻融可能会降低酶活性，因此溶解后立即按照每次使用量分装冻存，-20℃ 保存。
4. 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、PH 值变化，各溶液使用后应及时盖紧盖子。

❖ **产品介绍:**

本试剂盒设计用于快速从福尔马林固定、石蜡包埋组织样品中提取总RNA。独特的裂解液/蛋白酶K迅速裂解细胞释放出RNA，然后裂解混合物通过一个基因组DNA清除柱，基因组DNA被清除而RNA穿透滤过。滤过的RNA用乙醇调节结合条件后，RNA在高离子盐状态下选择性吸附于离心柱内硅基质膜，再通过一系列快速的漂洗-离心的步骤，去蛋白液和漂洗液将细胞代谢物，蛋白等杂质去除，最后低盐的RNase free H₂O将纯净RNA从硅基质膜上洗脱。得到的RNA可用于反转录PCR、荧光定量PCR等实验。

❖ **产品特点:**

1. 完全不使用有毒的苯酚，氯仿等试剂，也不需要乙醇沉淀等步骤。
2. 快速，简捷，单个样品 RNA 提取操作一般可在 1 小时内完成。
3. 试剂盒的独家基因组清除柱和配方确保有效清除基因组 DNA 残留，一般情况下得到的 RNA 不需要 DNase 消化，可直接用于反转录 PCR、荧光定量 PCR 等实验。
4. 多次柱漂洗确保 RNA 高纯度，可直接用于下游各种实验。

❖ **注意事项：**

1. **所有的离心步骤均在室温完成**，使用转速可以达到13,000 rpm的传统台式离心机，如Eppendorf 5415C 或者类似离心机。
2. **样品处理量绝对不要超过基因组DNA清除柱和RNA吸附柱RA处理能力，否则造成DNA残留或者产量降低。**不同组织细胞种类RNA/DNA相差极大，例如胸腺脾脏DNA含量丰富，超过5mg就会超过柱子处理能力。COS细胞RNA含量丰富，超过 3×10^6 细胞就会超过柱子吸附能力。**所以开始摸索实验条件时，如果不清楚样品DNA/RNA含量时宁可使用较少的样品处理量，如不超过2个10 μ m厚度石蜡切片。将来根据样品试验情况增加或者减少处理量。**
3. 裂解液PKD、结合液RBC中含有刺激性化合物，操作时要戴乳胶手套，**避免沾染皮肤，眼睛和衣服。若沾染皮肤、眼睛时，要用大量清水或者生理盐水冲洗。**
4. 预防RNase 污染，应注意以下几方面：
 - 1) 经常更换新手套。因为皮肤经常带有细菌，可能导致RNase 污染。
 - 2) 使用无RNase 的塑料制品和枪头避免交叉污染。
 - 3) RNA提取过程中应使用不含RNase 的塑料和玻璃器皿。玻璃器皿可在150 $^{\circ}$ C烘烤4小时，塑料器皿可在0.5 M NaOH 中浸泡10 分钟，然后用水彻底清洗，再灭菌，即可去除RNase。
 - 4) 配制溶液应使用无 RNase 的水。（将水加入到干净的玻璃瓶中，加入 DEPC 至终浓度 0.1%(v/v)，37 $^{\circ}$ C放置过夜，高压灭菌。）
5. 关于DNA 的微量残留：

一般说来任何总 RNA 提取试剂在提取过程中无法完全避免 DNA 的微量残留（DNase 消化也无法做到 100%无残留），本公司的 HiFi 固定包埋组织 RNA 快速提取试剂盒，由于采取了本公司独特的缓冲体系和基因组 DNA 清除柱技术，绝大多数 DNA 已经被清除，可直接用于反转录 PCR 和荧光定量 PCR。个别特殊情

况如 DNA 含量过于丰富造成残留或者要进行严格的 mRNA 表达量分析荧光定量 PCR, 我们建议在进行模板和引物的选择时:

- 1) 选用跨内含子的引物,以穿过 mRNA 中的连接区,这样 DNA 就不能作为模板参与扩增反应。
 - 2) 选择基因组 DNA 和 cDNA 上扩增的产物大小不一样的引物对。
6. RNA 纯度及浓度检测:

完整性: RNA 可用普通琼脂糖凝胶电泳 (电泳条件: 胶浓度 1.2%; 0.5×TBE 电泳缓冲液; 150v, 15 分钟)检测完整性。由于石蜡包埋组织福尔马林固定和包埋过程中一般由于 RNA 与蛋白反应交联会导致 RNA 断裂或者降解, 一般电泳后 UV 下只能看到模糊弥散 (smear) 带型, 随着储存的时间越长, 降解断裂越严重, 甚至只能看到峰值仅仅在 100bp 左右的模糊条带。这都属于 RNA 提取正常情况。

纯度: OD260/OD280 比值是衡量蛋白质污染程度的参考指标。高质量的 RNA, OD260/OD280 读数 (10mM Tris, pH7.5) 在 1.8-2.1 之间。OD260/OD280 读数受测定所用溶液的 pH 值影响。同一个 RNA 样品, 假定在 10mM Tris, pH7.5 溶液中测出的 OD260/OD280 读数 1.8-2.1 之间, 在水溶液中所测读数则可能在 1.5-1.9 之间, 但这并不表示 RNA 不纯。

浓度: 取一定量的 RNA 提取物, 用 RNase-free 水稀释 n 倍, 用 RNase-free 水将分光光度计调零, 取稀释液进行 OD260, OD280 测定, 按照以下公式进行 RNA 浓度的计算: 终浓度 (ng/μl) = (OD260) × (稀释倍数 n) × 40。

❖ **操作步骤：**（实验前请先阅读注意事项）

提示：

⇒ 第一次使用前请先在漂洗液 RW 瓶中加入指定量无水乙醇！

1. 修整去除过量包埋组织外石蜡，并切片成 5-20 μm 厚切片（开始的 2-3 片抛弃不用）。
2. 收集总厚度不超过 ■40 μm 的石蜡切片到一个 1.5-2ml 离心管（例如 2 片 20 μm 、4 片 10 μm 、8 片 5 μm 的石蜡切片），或者不超过 ▲80 μm 的石蜡切片到一个 2ml 离心管。

■代表处理切片总厚度 \leq 40 μm ，▲代表处理切片总厚度 \leq 80 μm

3. 加入 1ml 100%二甲苯，涡旋振荡 10 秒。瞬间离心把组织全部浸入到二甲苯。
4. 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 3 分钟熔解石蜡，20-25 $^{\circ}\text{C}$ 最高速离心 2 分钟，收集组织到管底。
5. 小心用移液器吸弃上清二甲苯，注意不要吸到沉淀。
6. 加入 1ml 无水乙醇，涡旋振荡，最高速离心 2 分钟，小心吸弃上清乙醇。
7. 加入 1ml 无水乙醇，重复步骤 6 一遍，**尽可能吸弃所有乙醇。**
8. 室温或者 37 $^{\circ}\text{C}$ 晾干乙醇 10 分钟或直到所有乙醇挥发干。

乙醇完全晾干非常重要，微量的乙醇残留也会导致 RNA 产量降低。

9. 重悬吹打或者涡旋振荡充分重悬组织沉淀在 ■150 μl ▲240 μl 裂解液 PKD 中，短暂离心收集液体到管底，加 10 μl 蛋白酶 K，吹打混匀。
10. 55 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 分钟，然后 80 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 分钟。

55 $^{\circ}\text{C}$ 孵育后，可以将离心管取出放置在室温，等水浴锅温度升到 80 $^{\circ}\text{C}$ 后再放入水浴锅，精确的孵育 15 分钟。即使 2 分钟的延长也可能导致 RNA 的部分降解。

11. 加入 ■320 μl ▲500 μl 结合液 RBC，充分吹打混匀调节结合条件。
12. 立刻将混合物加入一个基因组 DNA 清除柱中，（清除柱放入收集管中）14,000 rpm

离心 60 秒，保留滤过液（RNA 在滤过液中）。

应避免吸到可能有的较大的未消化完全的絮团物质上柱子，以免堵塞离心柱。

13. 加入 ■720μl ▲1200μl 无水乙醇到滤过液中，立即吹打混匀，不要离心。
14. 立刻将混合物(每次小于 700μl，多可以分多次加入)加入一个 RNA 吸附柱 RA 中，（吸附柱放入收集管中）13,000 rpm 离心 30 秒，弃掉废液。
15. 加入 500μl 漂洗液 RW(请先检查是否已加入无水乙醇!)，12,000 rpm 离心 30 秒，弃掉废液。加入 500μl 漂洗液 RW,重复一遍。
16. 将吸附柱 RA 放回空收集管中，13,000 rpm 离心 2 分钟，尽量除去漂洗液，以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
17. 取出吸附柱 RA，放入一个 RNase free 离心管中，根据预期 RNA 产量**在吸附膜的中间部位**加 30μl RNase free water（事先在 70-90℃水浴中加热可提高产量），室温放置 1 分钟，12,000 rpm 离心 1 分钟。

洗脱体积越大，洗脱效率越高，如果需要 RNA 浓度较高，可以适当减少洗脱体积，如果需要 RNA 浓度高，可以将洗脱液放回吸附柱 RA，再洗脱一遍。