



北京艾德莱生物科技有限公司

Aidlab Biotechnologies Co., Ltd

- ◆ **EASYspin** 石蜡包埋组织 **microRNA** 快速提取试剂盒
 - ◆ 目录号 **RN31**
 - ◆ 使用手册
 - ◆ 实验室使用，仅用于体外
-

EASYspin 石蜡包埋组织 microRNA 快速提取试剂盒

目录号: RN31

❖ 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RNA包括microRNA, RNA可直接用于反转录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(RN3101) |
|-----------------------------|------|-------------------------|
| 裂解液 PKD | 室温 | 15 ml |
| 结合液 RBC | 室温 | 25 ml |
| 漂洗液 RW | 室温 | 10ml 第一次使用前按说明加指定量乙醇 |
| 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9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**。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°C 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RNA包括microRNA。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 H_2O 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，**避免污染皮肤，眼睛和衣服。若污染皮肤、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℃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℃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 EASYspin 固定包埋组织 microRNA 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 10-20μm 厚切片。

切片厚度必须≥10μm, 否则太薄会切碎细胞, 造成脱蜡过程中 microRNA 丢失。

-
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 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 $\leq 40\mu\text{m}$ ，▲代表处理切片总厚度 $\leq 80\mu\text{m}$

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. 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30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■1120 μl ▲1750 μl 无水乙醇到滤过液中，立即吹打混匀，不要离心。

如果加1750 μl 无水乙醇，应先将滤过液转到容量超过3ml的离心管后再加入。

14. 立刻将混合物(每次小于700 μl ，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 500 μ l 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 500 μ l 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 30 μ l RNase free water (事先在 70-90 $^{\circ}$ C 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。