



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 microRNA 快速提取试剂盒**
 - ◆ 目录号 1131
 - ◆ 使用手册
 - ◆ 实验室使用，仅用于体外
-

HiFi 石蜡包埋组织 microRNA 快速提取试剂盒

目录号: 1131

❖ **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(113101)
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 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℃ 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 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 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 10-20 μm 厚切片。

切片厚度必须 $\geq 10\mu\text{m}$ ，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 μ l ▲1750 μ l 无水乙醇到滤过液中，立即吹打混匀，不要离心。

如果加 1750 μ l 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 μ l，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。