



武汉楚诚生物

武汉楚诚正茂科技工程有限公司  
电话(传真): 027-87388389  
400 电话: 400-6345-876  
地址: 武汉市华大家园 A04-1-602  
网址: <http://www.chuchengkj.com>

## EASYspin 石蜡包埋组织 microRNA 快速提取试剂盒

产品编号: CC9748

**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
裂解液 PKD	室温	15ml
结合液 RBC	室温	25ml
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 <sub>2</sub> O	室温	10ml
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°C 水浴加热几分钟，即可恢复澄清。
2. 不合适的储存于低温（4°C 或者 -20°C）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°C—25°C）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 在高离序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<sub>2</sub>O 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 13,000rpm 的传统台式离心机。

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  $3 \times 10^6$  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  $10 \mu\text{m}$  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  $150^\circ\text{C}$  烘烤 4 小时，塑料器皿可在  $0.5\text{M NaOH}$  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  $0.1\%(\text{v/v})$ ， $37^\circ\text{C}$  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 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（10mMTris, 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  $\mu\text{m}$  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  $\mu\text{m}$  的石蜡切片到一个 1.5–2ml 离心管（例如 2 片 20  $\mu\text{m}$ 、4 片 10  $\mu\text{m}$  的石蜡切片），或者不超过 **▲**80  $\mu\text{m}$  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°C 水浴 3 分钟溶解石蜡，20–25°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°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  $\mu\text{l}$  **▲**240  $\mu\text{l}$  裂解液 PKD 中，短暂离心收集液体到管底，加 10  $\mu\text{l}$  蛋白酶 K，吹打混匀。

10. 55°C 孵育 15 分钟，然后 80°C 孵育 15 分钟。

**55°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°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  $\mu\text{l}$  **▲**500  $\mu\text{l}$  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）14,000rpm

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  $\mu$  l ▲1750  $\mu$  l 无水乙醇到滤过液中，立即吹打混匀，不要离心。

如果加 1750  $\mu$  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  $\mu$  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  $\mu$  l 漂洗液 RW(请先检查是否已加入无水乙醇!), 12,000rpm 离心 30 秒，  
弃掉废液。加入 500  $\mu$  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  $\mu$  l RNase free water (事先在 70-90°C 水浴中加热可提高产量)，室  
温放置 1 分钟，12,000rpm 离心 1 分钟。

洗脱体积越大，洗脱效率越高，如果需要 RRNANA 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。