

## 石蜡包埋组织 RNA 提取试剂盒 (离心柱式, > 200 nt)

### HX3021

#### 产品简介

石蜡包埋组织 RNA 提取试剂盒 (离心柱式, > 200 nt) 是一种采用环保脱蜡方式去除石蜡后抽提切片样品中 RNA 的试剂盒。提取获得的 RNA 长度通常大于 200 个核苷酸 (nucleotide, nt), 可以应用于反转录、RT-PCR、qRT-PCR 或转录组测序等下游实验, 也可以用于福尔马林、多聚甲醛等固定的组织的 RNA 抽提。福尔马林固定石蜡包埋 (Formalin fixation and paraffin embedding, FFPE), 常应用于癌症等疾病研究中保存离体组织的形态学和组织学结构, 以便于运输和储存, 是病理样品长期保存的主要方法之一。组织样品经福尔马林固定时, 组织内细胞中的核酸和蛋白质等分子间随机交联, 核酸出现片段化, 因此难以获得高质量核酸。本试剂盒采用环保脱蜡法去除石蜡, 以特殊的裂解条件释放 FFPE 组织样本中的 RNA 分子, 最大程度地降低了福尔马林固定时组织内细胞中 RNA 与其它分子交联的不利影响, 提取获得的 RNA 纯度高、完整性好、质量稳定。首先使用环保的脱蜡剂和蛋白酶 K 将 FFPE 样品脱蜡、消化, 随后加入适合 RNA 结合到纯化柱上的缓冲液, 然后加入到纯化柱内。通过高速离心, 使 RNA 在穿过纯化柱的瞬间, 结合到纯化柱上, 随后通过四次洗涤去除各种杂质, 最后通过洗脱液把 RNA 洗脱下来。提取获得的石蜡包埋组织样品 RNA 纯度高, RNA A260/A280 的范围通常在 1.8-1.9 之间; 使用安全、高效, 通过特殊的柱纯化介质进行 RNA 分离纯化, 能有效避免常规方法抽提 RNA 时使用的酚、氯仿等有毒有害有机试剂; 操作快速、便捷, 采用柱纯化, 无需繁琐的 RNA 沉淀步骤, 纯化 RNA 操作过程仅需约 15 min 即可完成。标准操作步骤抽提得到的 RNA 含有少量 DNA, 但如果按照可选步骤加入 DNase I, 就可以获得不含 DNA 的高纯度 RNA。

#### 产品应用

采用环保脱蜡方式去除石蜡后提取切片样品中 RNA, 提取获得的 RNA 长度通常大于 200 个核苷酸 (nucleotide, nt), 可以应用于反转录、RT-PCR、qRT-PCR 或转录组测序等下游实验, 也可以用于福尔马林、多聚甲醛等固定的组织的 RNA 抽提。

#### 储存条件

Proteinase K -20°C 保存, 其余均室温保存, 一年有效。Proteinase K 室温 (15-25°C) 存放一周, 活力无明显下降。

## 产品信息

组分编号	组分名称	规格
		50 T
HX3021-1	Buffer S1 (脱蜡剂)	50 ml
HX3021-2	Buffer P1 (裂解液)	10 ml
HX3021-3	Buffer P2 (结合液)	15 ml
HX3021-4	Buffer WB1 (洗涤液 I, 首次使用前加 9 ml 无水乙醇)	51 ml
HX3021-5	Buffer WB2 (洗涤液 II, 首次使用前加 48 ml 无水乙醇)	16 ml
HX3021-6	Buffer EB (洗脱液)	12 ml
HX3021-7	Proteinase K (蛋白酶 K)	0.6 ml
HX3021-8	RNA 纯化柱及废液收集管	50 套
HX3021-9	RNA 洗脱管	50 个

## 注意事项

1. 如果希望获得更高质量的 RNA, 宜尽量使用新鲜固定和包埋的组织样品。拿到组织样品后尽快在 4-10% 福尔马林中固定, 固定时间最好在 8-24 h 之间或更短时间, 长时间固定会使 RNA 断裂更为严重。样品包埋前应确保彻底脱水, 残留的甲醛可能抑制 Proteinase K 的消化等相关实验步骤。
2. 本试剂盒提取 RNA 依赖于样品类型、储存时间以及固定条件。样品固定时间和保存时间过长 (> 1 年) 易破坏 RNA 完整性, 无法抽提出长片段。石蜡包埋组织抽提得到的 RNA, 由于样品的特殊性, 存在可能的断裂或降解, 通常不建议用于需要全长 RNA 的下游应用。
3. 如需制备不含 DNA 的高纯度 RNA, 需自备 DNase I。须提前备好无水乙醇和异丙醇。
4. FFPE 样品 56°C 和 80°C 孵育, 须提前做好准备。
5. 除特别说明外, 每次 Vortex 应控制在 5-10 sec 左右。
6. 温度较低时 Buffer P1 或 Buffer P2 中可能会有沉淀产生, 属正常现象。使用前必须检查一遍, 如有沉淀, 55°C 水浴孵育使沉淀溶解, 混匀后使用。
7. 所有操作均在室温进行, 操作时无需冰浴, 所有离心也均在室温进行。
8. 废液收集管在一次抽提中需多次使用, 切勿中途丢弃。Buffer S1 和 Proteinase K 对人体有呼吸道、生殖等特定器官毒性, 或致畸致癌毒性, 操作时请特别小心, 并注意有效防护以避免直接接触人体或吸入体内。
9. **第一次使用前 Buffer WB1 需添加 9 ml 无水乙醇, Buffer WB2 需添加 48 ml 无水乙醇, 混匀, 并在瓶上做好标记。**

10. Buffer WB1 对人体有害或有刺激性，操作时请小心，并注意有效防护以避免直接接触人体或吸入体内。
11. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

## 使用说明

### 1. 样品处理:

- a. 石蜡包埋组织切片：取 2-8 张的石蜡切片 (5-10  $\mu\text{m}$  厚，表面积小于  $1 \times 1 \text{ cm}^2$ )。

**注：**如果样品表面暴露于空气中，尽量避免使用。

- b. 福尔马林固定组织：取 10-25 mg 福尔马林固定液中的组织，用手术刀充分切碎后，置于 1.5 ml 离心管中，加入 500  $\mu\text{l}$  的 PBS, pH7.4 (DNase, RNase & Protease free, Sterile), Vortex 震荡混匀，12,000 $\times$ g 离心 1 min 后充分去除上清，再重复清洗 2 次，然后从步骤 2h 开始操作。

### 2. 脱蜡和裂解:

- a. 将石蜡切片置于 1.5 ml 离心管中，加入 600  $\mu\text{l}$  的 Buffer S1，剧烈 Vortex 30 sec，以充分脱蜡。福尔马林固定液中的组织样品无需加 Buffer S1，直接转入步骤 2h 开始操作；如果石蜡样品过多，可以将 Buffer S1 用量增加至 1 ml。
- b. 室温， $\geq 14,000 \times \text{g}$  离心 5 min。
- c. 小心吸去上清，注意不要碰到沉淀。
- d. 加入 1 ml 无水乙醇，Vortex 混匀。
- e. 室温， $\geq 14,000 \times \text{g}$  离心 5 min。
- f. 小心吸去上清，注意不要碰到沉淀。可以用新的 10  $\mu\text{l}$  吸头小心吸去残留的乙醇，有利于乙醇挥发。
- g. 打开管盖，室温放置 5-10 min 直至残留的乙醇完全挥发。残留的乙醇会对 RNA 产生影响，可以将离心管置于 37 $^{\circ}\text{C}$  环境下挥发乙醇。
- h. 加入 150  $\mu\text{l}$  Buffer P1 和 10  $\mu\text{l}$  Proteinase K，Vortex 混匀，56 $^{\circ}\text{C}$  金属浴或水浴孵育 15 min 或直至样品完全裂解。
- i. 将完全裂解的组织样本置于 80 $^{\circ}\text{C}$  孵育 15 min，之后短暂离心使管盖上的蒸发液体回到管中。

**注：**80 $^{\circ}\text{C}$  孵育对修复 RNA 变性解交联至关重要，但是必须严格控制孵育的温度和时间，否则可能产生更多的 RNA 碎片，因此应先先将金属浴或水浴加温至 80 $^{\circ}\text{C}$  再放入样本进行孵育。

- j. 室温，14,000 $\times$ g 离心 5 min，转移上清液 (约 150  $\mu\text{l}$ ) 至新的离心管中，注意不要碰到沉淀。
- k. 向上述新的离心管中加入 290  $\mu\text{l}$  Buffer P2，Vortex 混匀；再加入 670  $\mu\text{l}$  异丙醇，Vortex 混匀。加入结合液和异丙醇后可能会产生白色沉淀，需立即 Vortex 混匀彻底混匀，但不会干扰后续实验。

### 3. 纯化 RNA:

- a. 将 600  $\mu$ l 步骤 2k 中的混合溶液加入到 RNA 纯化柱内。 $\geq 6000\times g$  离心 1 min。倒弃废液收集管内液体。进行本步骤前需将纯化柱置于废液收集管上。倒弃废液后回收废液收集管。
- b. 将剩余的步骤 2k 中的混合溶液加入到 RNA 纯化柱内。 $\geq 6000\times g$  离心 1 min。倒弃废液收集管内液体。进行本步骤前需将纯化柱置于废液收集管上。倒弃废液后回收废液收集管。
- c. 向纯化柱中加入 500  $\mu$ l Buffer WB1,  $\geq 6000\times g$  离心 1 min。倒弃废液收集管内液体。进行本步骤前需将纯化柱置于废液收集管上。倒弃废液后回收废液收集管。
- d. **选做：**清除 DNA。如果希望获得不含 DNA 的高纯度 RNA，可向 RNA 纯化柱中央加入 80  $\mu$ l 含有 10U DNase I 的酶溶液，室温放置消化 15 min。**每 80  $\mu$ l 酶溶液按照 71.8  $\mu$ l 超纯水加 8  $\mu$ l Reaction Buffer (10X) 再加 0.2  $\mu$ l 50 U/ $\mu$ l DNase I 混合配制而成。**消化结束后，不需要进行离心等任何额外的操作，直接进入步骤 3e。
- e. 向纯化柱中加入 500  $\mu$ l Buffer WB1,  $\geq 6000\times g$  离心 1 min。倒弃废液收集管内液体。进行本步骤前需将纯化柱置于废液收集管上。倒弃废液后回收废液收集管。
- f. 向纯化柱中加入 600  $\mu$ l Buffer WB2,  $\geq 14,000\times g$  离心 1 min。倒弃废液收集管内液体。进行本步骤前需将纯化柱置于废液收集管上。倒弃废液后回收废液收集管。
- g. 重复步骤 3f 一次。
- h.  $\geq 14,000\times g$  离心 1 min，以去除残留的乙醇。不可把步骤 3g 的离心时间延长而省略本步骤，倒弃废液后再离心可以确保充分去除残留的乙醇。
- i. 将 RNA 纯化柱置于一洁净的 1.5 ml 离心管上，加入 30-100  $\mu$ l Buffer EB。室温放置 1-3 min。 $\geq 14,000\times g$  离心 1 min。所得液体即为纯化得到的 RNA。

**注：**Buffer EB 需要直接加至纯化柱管内柱面中央，使液体被纯化柱吸收。如果有必要，可以使用去离子水。使用较小体积的 Buffer EB 可以使获得的 RNA 的浓度较高，但洗脱下来的 RNA 量相对较少。Buffer EB 的 pH 对洗脱效率有很大影响，使用去离子水洗脱时应保证其 pH 值在 7.0-8.5 之间。如果对于获得较多量的 RNA 非常重要，可以在第一次洗脱后，再用同体积 Buffer EB 重复洗脱一次。第二次洗脱可增加 RNA 洗脱量，但会降低洗脱 RNA 的浓度。经 65 $^{\circ}$ C 预热过的 Buffer EB 可增加 RNA 的洗脱量。