

石蜡包埋组织总 RNA 提取试剂盒 (磁珠法)

HX3020

产品简介

石蜡包埋组织总 RNA 提取试剂盒(磁珠法)是一种采用环保脱蜡方式去除石蜡后提取切片中总 RNA 的试剂盒。提取获得的 RNA 包含大分子量 RNA 和小 RNA (<200 nt), 也常被称为总 RNA (Total RNA), 可用于反转录、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, 释放出来的 RNA 在特定条件下与磁珠特异性结合。在外界磁场 (如磁分离架) 的作用下, 磁珠与相应溶液可以快速高效地分离。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总 RNA 纯度高, RNA A260/A280 的范围通常在 1.7-1.9 之间; 使用安全、高效, 通过特殊的磁珠进行 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, 采用磁珠纯化, 无需繁琐的 RNA 沉淀步骤, 纯化 RNA 操作过程仅需约 15-20 min 即可完成。标准操作步骤抽提得到的总 RNA 含有少量 DNA, 但如果按照可选步骤加入 DNase, 就可以获得不含 DNA 的高纯度总 RNA。

产品应用

采用环保脱蜡方式去除石蜡后提取切片中总 RNA, 提取获得的 RNA 包含大分子量 RNA 和小 RNA (<200 nt), 也常被称为总 RNA (Total RNA), 可用于反转录、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 提取。

储存条件

Proteinase K、DNase 和 Reaction Buffer (10X) -20°C 保存, 其余均室温保存, 一年有效。其中, Buffer Beads 长期不使用时 4°C 保存, 可以保存更长时间, 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
HX3020-1	Buffer S1 (脱蜡剂)	50 ml
HX3020-2	Buffer P1 (裂解液)	10 ml
HX3020-3	Buffer P2 (结合液)	11 ml
HX3020-4	Buffer WB1 (洗涤液 I, 首次使用前加 34 ml 无水乙醇)	26 ml
HX3020-5	Buffer WB2 (洗涤液 II, 首次使用前加 39 ml 无水乙醇)	26 ml
HX3020-6	Buffer EB (洗脱液)	12 ml
HX3020-7	Proteinase K (蛋白酶 K)	600 μ l
HX3020-8	Buffer Beads (RNA 磁珠悬浮液)	1 ml
HX3020-9	DNase	100 μ l
HX3020-10	Reaction Buffer (10X)	500 μ l

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. 本试剂盒抽提 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。
3. 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。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。
4. 本试剂盒须将 FFPE 样品 56°C 和 80°C 孵育, 使用本试剂盒须提前备好无水乙醇和异丙醇。
5. 如果不使用试剂盒提供的 DNase 进行处理, 本试剂盒抽提得到的 RNA 会含有少量 DNA。后续如进行某些对 DNA 残留敏感的实验时, 需要在使用说明步骤 3b 后, 在磁珠中加入适量 DNase 进行消化, 具体请参考使用说明。如果基因组 DNA 消化不充分, 可以加大 DNase 的用量或延长孵育时间。
6. 本试剂盒提供的所有试剂都是 RNase-free, 操作时应小心, 避免被 RNase 污染。所有自行准备的试剂和耗材也都应是 RNase-free。如果耗材可能有 RNase 污染, 可考虑用 0.01% 的 DEPC 水浸泡过夜, 然后高温高压灭菌烘干。操作时应避免对着样品或所使用的试剂盒耗材呼气或说话, 以防 RNase 污染。建议戴一次性口罩。

7. 本试剂盒所有操作均在室温进行, 操作时无需冰浴。除特别说明外, 每次 Vortex 应控制在 5-10 sec 左右。
8. 本试剂盒需自备磁分离装置, 磁珠在静置后会发生沉降, 使用前一定要适当涡旋震荡或颠倒数次至充分混匀。磁分离前应适度震荡离心管使磁珠充分分散后再靠近磁场。如果出现磁珠挂壁现象, 可以在磁珠聚集后晃动管内液体, 使挂壁的磁珠流下。请使用推荐的样品量。如果样品量过大, 可能造成磁珠聚集, 会影响洗涤进而影响抽提获得的 RNA 纯度。发生磁珠聚集时, 洗涤时需尽量分散磁珠, 这样可有效改善抽提效果。如果发生磁珠聚集现象, 建议在后续实验中适当减少样品用量。
9. **第一次使用前 Buffer WB1 需添加 34 ml 无水乙醇, Buffer WB2 需添加 39 ml 无水乙醇, 混匀, 并在瓶上做好标记。**
10. 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 μm 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 μl 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 μl 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, $\geq 14,000 \times g$ 离心 5 min。
- c. 使用吸头小心吸去上清, 注意不要碰到沉淀。
- d. 加入 1 ml 无水乙醇, Vortex 混匀。
- e. 室温, $\geq 14,000 \times g$ 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 μl 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°C 环境下挥发乙醇。
- h. 加入 150 μl Buffer P1 和 10 μl Proteinase K, Vortex 混匀, 56°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°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°C 孵育对修复 RNA 变形解交联至关重要，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，因此应先将金属浴或水浴加温至 80°C 再放入样本进行孵育。

j. 室温，14,000×g 离心 5 min，转移上清液（150 μl）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 200 μl Buffer P2，Vortex 混匀，再加入 300 μl 异丙醇，Vortex 混匀。

注：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. 向步骤 2k 中的混合物加入 20 μl Buffer Beads（使用前务必混匀），轻柔混匀后，室温放置 3-5 min。将离心管置于磁力架的磁场中，待磁珠完全聚集后，小心吸除残液。磁珠在使用前一定要涡旋或震荡混匀。如有必要，可适当增加磁珠用量，延长结合时间以提高得率。

b. 加入 500 μl Buffer WB1，轻柔震荡使磁珠分散开，颠倒两次后将离心管置于磁力架的磁场中，待磁珠完全聚集后，尽量吸净残液。

c. **选做：**如果略去本步骤，抽提得到的 RNA 会含有少量基因组 DNA。后续如进行某些对基因组 DNA 残留较敏感的实验时，可在上一步骤洗涤后，在磁珠中加入 80 μl 含 2 μl DNase 的酶溶液（**每 80 μl 酶溶液按照 70 μl 水加 8 μl Reaction Buffer (10X) 再加 2 μl DNase 混合配制而成**），37°C 震荡消化 15 min。消化结束后，不需要任何额外操作，直接进入步骤 3d。

d. 加入 500 μl Buffer WB1，轻柔震荡使磁珠分散开，颠倒两次后将离心管置于磁力架的磁场中，待磁珠完全聚集后，尽量吸净残液。

e. 加入 600 μl Buffer WB2，轻柔震荡使磁珠分散开，颠倒两次后将离心管置于磁力架的磁场中，待磁珠完全聚集后，尽量吸净残液。

f. 重复步骤 3e 一次。

g. 将离心管室温放置 5-10 min，或置于 37°C 烘箱 5 min，确保残留的乙醇等微量液体完全挥发。

h. 加入 50-100 μl Buffer EB，轻柔震荡使磁珠悬于溶液中，室温孵育 3-5 min，其间甩动离心管 1-2 次。将离心管置于磁场中，待磁珠完全聚集后，小心吸取溶液至新离心管中，置于 -20°C 保存。所得溶液即为纯化的总 RNA。

注：如果有必要，可以使用超纯水洗脱 RNA，Buffer EB 的 pH 值对洗脱效率有很大影响，使用超纯水洗脱时应保证其 pH 值在 7.0-8.5 之间。如需获得更高浓度的样品，可把 Buffer EB 的体积减小至 20 μl，但洗脱下来的 RNA 量会相对减少。室温较低时，Buffer EB 在 37°C 预热片刻对得率有所帮助。此外，洗脱后的溶液再次加回到原磁珠再洗脱一次，可提高得率约 10-30%；或者在第一次洗脱后使用新的 Buffer EB 再洗脱一次，会获得约为第一次洗脱量 15-40% 的 RNA。