

AipEasy 固定/包埋组织 RNA 快速提取试剂盒(离心柱型)

AipEasy FFPE Tissue RNA Rapid Extraction Kit(Centrifugal Column)

使用说明书

◆版本号：2311102

◆目录号：RE265

◆试剂盒组成、储存、稳定性：

试剂盒组成	保存	50 次(RE265-01)
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 溶液 (20mg/mL)	4°C或室温	1mL
RNase-free Water	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

◆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总RNA。

◆产品储存：本试剂盒在室温储存 12 个月不影响使用效果。

◆储存事项：

- 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。
- 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。
- 蛋白酶 K 保存在即用型甘油缓冲液中，常温运输。收到后，不超过 25°C 室温至少保存 6 个月，4°C 保存 12 个月，-20°C 保存 2 年。
- 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总 RNA。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 Water 将纯净 RNA 从硅基质膜上洗脱。得到的 RNA 可直接用于反转录 PCR、荧光定量 PCR 等下游实验。

◆产品特点：

1. 操作安全，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，全程操作只需 10 步，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 3×10^6 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。实验条件摸索后，可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 污染及实验前的准备：经常更换新手套。因为皮肤经常带有细菌，可能导致 RNase 污染。使用 RNase-free 的塑料制品和枪头避免交叉污染。RNA 提取过程中应使用 RNase-free 的塑料和玻璃器皿。玻璃器皿可在 150°C 烘烤 4 小时，塑料器皿可在 0.5M NaOH 中浸泡 10 分钟，然后用水彻底清洗，再灭菌，即可去除 RNase。配制溶液应使用 RNase-free 的水或 DEPC 水(DEPC 水的制备：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°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 AipEasy 固定包埋组织 RNA 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 和 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. 样本处理

福尔马林固定组织:	取 20-50mg 福尔马林固定组织样本, 用 DEPC 水充分清洗干净, 要是样本不好裂解, 在加入裂解液前需把样本充分剪碎, 或用高速微量研磨仪充分研磨粉碎。
石蜡包埋组织:	<ol style="list-style-type: none"> 修整去除过量包埋组织外石蜡, 并切片成 5-20μm 厚切片(开始的 2-3 片抛弃不用)。 收集总厚度不超过 ■ 40μm 的石蜡切片到一个 1.5-2mL 离心管(例如 2 片 20μm、4 片 10μm、8 片 5μm 的石蜡切片), 或者不超过 ▲ 80μm 的石蜡切片到一个 2mL 离心管。 注: ■ 代表处理切片总厚度 ≤ 40μm, ▲ 代表处理切片总厚度 ≤ 80μm。 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。 50℃ 水浴 3 分钟熔解石蜡, 20-25℃ 最高速离心 2 分钟,

	<p>收集组织到管底。</p> <p>5. 小心用移液器吸弃上清二甲苯，注意不要吸到沉淀。</p> <p>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。</p> <p>7. 重复上一步操作，尽可能吸弃所有乙醇。</p> <p>8. 室温或 37℃ 晾干乙醇 10 分钟或直到所有乙醇挥发。</p> <p>注：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。</p>
--	--

2. 重悬吹打或涡旋振荡充分重悬组织沉淀在 ■140μL ▲230μL 裂解液 PKD 中，短暂离心收集液体到管底，加 20μL 蛋白酶 K，吹打充分混匀。
3. 55℃ 孵育 15 分钟，然后 80℃ 孵育 15 分钟。
注：55℃ 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℃ 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。
4. 加入 ■320μL ▲500μL 结合液 RBC，充分吹打混匀调节结合条件。
5. 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 60 秒，保留滤过液(RNA 在滤过液中)。
注：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。
6. 加入 ■720μL ▲1200μL 无水乙醇到滤过液中，立即吹打混匀，不要离心。
7. 立刻将混合物(每次小于 700μL，混合物较多可以分多次加入)加入一个 RNA 吸附柱 RA 中，(吸附柱放入收集管中)13,000rpm 离心 30 秒，弃掉废液。
8. 加入 500μL 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 500μL 漂洗液 RW，重复操作一遍。
9. 将吸附柱 RA 放回空收集管中，13,000rpm 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。
10. 取出吸附柱 RA，放入一个新的 RNase-free 离心管中，根据预期 RNA 产量在吸附膜的中间部位加 30μL RNase-free Water(事先在 70-90℃ 水浴中加热可提高产量)，室温放置 1 分钟，12,000rpm 离心 1 分钟，RNA 被洗脱下来收集在离心管中。
注：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。

=====



扫码关注我们