

Imagen®

GenePure Paraffin Embedded Tissue RNA kit
GenePure 石蜡包埋组织 RNA 快速提取试剂盒

密码子生物科技有限公司
<http://www.codonx.com>

CODONX
RESEARCH & ANSWER MORE

FOR RESEARCH USE ONLY
NOT INTENDED FOR DIAGNOSTIC PURPOSES

GenePure Paraffin Embedded Tissue RNA Kit

GenePure 石蜡包埋组织 RNA 快速提取试剂盒

目录号: RE126

❖ 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, RNA可用于反转录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(RE126-01)
裂解液 PKD	室温	15 ml
结合液 RBC	室温	25 ml
漂洗液 RB	室温	10ml 第一次使用前按说明加指定量乙醇
蛋白酶 K 粉 40mg/ml	-20℃	20mg
RNase-free H ₂ O	室温	10 ml
基因组 DNA 清除柱 CC 和收集管 CT	室温	50 套
RNA 吸附柱 AC 和收 集管 CT	室温	50 套

本试剂盒在室温储存 12 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（终浓度 40mg/ml）**。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 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

- ❖ 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。
- ❖ 样品处理量绝对不要超过基因组DNA清除柱CC和RNA吸附柱AC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。将来根据样品试验情况增加或者减少处理量。

❖ 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。

❖ 预防RNase 污染，应注意以下几方面：

⇒ 经常更换新手套。因为皮肤经常带有细菌，可能导致RNase 污染。

⇒ 使用无RNase 的塑料制品和枪头避免交叉污染。

⇒ 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°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。

⇒ 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°C 放置过夜，高压灭菌。）

❖ 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GenePure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，我们建议在进行模板和引物的选择时：

⇒ 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。

⇒ 选择基因组DNA和cDNA上扩增的产物大小不一样的引物对。

❖ 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% ； $0.5 \times \text{TBE}$ 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, 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 RB 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 5-20μm 厚切片(开始的 2-3 片抛弃不用)。
2. 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。

■代表处理切片总厚度 ≤40μm, ▲代表处理切片总厚度 ≤80μm

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 分钟熔解石蜡, 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。

- 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。
- 加入 1ml 无水乙醇，重复步骤 6 一遍，**尽可能吸弃所有乙醇。**
- 室温或者 37℃ 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。

- 重悬吹打或者涡旋振荡充分重悬组织沉淀在 ■150µl ▲240µl 裂解液 PKD 中，短暂离心收集液体到管底，加 10µl 蛋白酶 K，吹打混匀。
- 55℃ 孵育 15 分钟，然后 80℃ 孵育 15 分钟。

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。

- 加入 ■320µl ▲500µl 结合液 RBC，充分吹打混匀调节结合条件。
- 立刻将混合物加入一个基因组 DNA 清除柱 CC 中，（清除柱 CC 放入收集管 CT 中）14,000 rpm 离心 60 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。

- 加入 ■720µl ▲1200µl 无水乙醇到滤过液中，立即吹打混匀，不要离心。
- 立刻将混合物(每次小于 700µl，多可以分多次加入)加入一个 RNA 吸附柱 AC 中，（吸附柱 AC 放入收集管 CT 中）13,000 rpm 离心 30 秒，弃掉废液。
- 加入 500µl 漂洗液 RB（**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 500µl 漂洗液 RB,重复一遍。
- 将吸附柱 AC 放回空收集管 CT 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。
- 取出吸附柱 AC，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 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，12,000 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 AC，再洗脱一遍。

密码子生物科技有限公司
<http://www.codonx.com/>

CodonX(China) Biotechnology Co., Ltd

Yizhuang Biomedical Park
Building 6, No.88 6th Kechuang St. Economic-Technological Development Area, Beijing, China
Tel: 010-56315162 www.codonx.com

