



FFPE sample miRNA Extraction Kit

石蜡包埋样品小 RNA 抽提试剂盒

说明书

【产品简介】

福尔马林固定，石蜡包被（FFPE）组织样品是人们诊断和预测疾病的主要组织来源，也同时用作分子及遗传研究。但是和新鲜组织样品不同，石蜡包埋样品中大多数 DNA 和 RNA 分子在固定时以及长期储存的过程中，降解为小片段，更进一步的是福尔马林诱导的核酸和蛋白交联限制了 DNA 或者 RNA 从被固定的细胞中释放，然而随着技术的发展，现在已经能够从石蜡包埋样品中提取到高质量的 DNA 和 RNA。

石蜡包埋样品总 RNA 抽提试剂采用独特的配方，能高效的进行石蜡样品脱蜡前处理，裂解组织及其细胞，甚至是用于富含脂肪的组织，另外本试剂还可以有效地抑制各种外源性和内源性的 RNA 酶，同时结合特制的纯化柱，并采用独特的配方和添加剂，能高效的裂解细胞和组织，有效的去除大片段 RNA，富集纯化 200bp 以下的小 RNA。另外本试剂还可以有效地抑制各种外源性和内源性的核酸酶，同时结合特制的纯化柱，能最大限度的保持核酸的完整性、高得率以及纯度。

【试剂盒组成】

试剂盒组成	LN-0114A(50 次)	LN-0114B (100 次)
裂解液 LZ	60ml	120ml
缓冲液 PDB	18ml	36ml
蛋白酶 K	900 μ l	1.8ml
漂洗液 WB1	22ml	44ml
漂洗液 WB2	18ml	36ml
洗脱液 EB	2 \times 2ml	4 \times 2ml
miRNA 离心纯化柱	50 个	100 个
RNA 分离柱	50 个	100 个
说明书	1 份	1 份

【运输及储存条件】

常温运输。裂解液LZ须置4℃保存，蛋白酶K须置-20℃保存，其余组分可室温保存。本试剂盒有效期为12个月，在有效期内使用。

【操作步骤】

- 切下 5 片厚度约为 10 μ m（重约 10mg）的组织块，尽量切去石蜡部分，置于 1.5ml 的离心管中。
注意：该实验流程只适用于在 10mg 左右的组织样品中抽提总 RNA，样品不宜过多，否则消化组织是非常困难的。
- 加入 1ml 二甲苯，并振荡 30s，然后室温放置 5 分钟。
- 室温，14000 x g 离心 3 min，用移液器移尽上清，并加入 1ml 无水乙醇。
- 振荡离心管 20s，然后室温，14000 x g 离心 3 min。
- 用移液器移去上清，室温干燥组织沉淀 15min。
注意：任何残留的乙醇可能会影响蛋白酶K的消化以及减少核酸的得率。
- 加入 290 μ l 的 PDB 缓冲液重悬沉淀，并加入 10 μ l 蛋白酶 K（30mg/ml）溶液，振荡混匀。
- 将离心管置于 50℃ 温浴 3 hours，然后置于 70℃ 20min。
- 往离心管中加入 1 ml 裂解液 LZ，振荡混匀 30s。
- 将离心管置于室温 5min 后，加入 0.2ml 三氯甲烷，小心盖上盖子，剧烈摇动 15s。
注意：不要振荡离心管，从而造成 DNA 对 RNA 的污染。
- 将离心管置于室温 2-3min，4℃，12000 x g 离心 15min。
注意：离心会使溶液分为三相，含有 RNA 的水相上清液，包含蛋白和 DNA 的中层以及包含 DNA 的下层有机相。在 4℃ 离心对于溶液的分层是非常关键的。



11. 将450 μ l上清水相转移至另一新的无RNA酶离心管中, 并加入等体积的60%无水乙醇, 漩涡振荡混匀5s。**注意:** 上清体积吸取450 μ l为宜, 吸取过多上清会造成基因组污染。需要自行配置60%无水乙醇溶液。
12. 立即吸取500 μ l样品以及有可能形成的沉淀, 加入带有2ml收集管的RNA分离柱。轻盖盖子, 10,000 x g, 室温离心15s, 收集流穿液于另一干净的1.5ml离心管中。
13. 将剩余的样品转移至RNA分离柱, 收集流穿液于另一干净的1.5ml离心管中, 重复第12步。
14. 向收集的两管流穿液中分别加入1.5倍体积的无水乙醇, 漩涡振荡混匀后立即吸取700 μ l样品以及有可能形成的沉淀, 加入带有2ml收集管的miRNA离心纯化柱。轻盖盖子, 10,000 x g, 室温离心15s, 弃尽废液。
15. 往miRNA离心纯化柱中加入700 μ l漂洗液WB1, 轻盖盖子, 10,000 x g, 室温离心15s, 弃尽废液。
注意: 第一次使用前请确认是否已经往漂洗液WB1中加入适量 无水乙醇。
16. 往miRNA离心纯化柱中加入500 μ l漂洗液WB2, 轻盖盖子, 10,000 x g, 室温离心15s, 弃尽废液, 重复一次, 最后一次洗涤后, 10,000 x g离心空柱2min干燥硅胶膜。
注意: 第一次使用前请确认是否已经往漂洗液WB2加入适量无水乙醇。完全去除洗液对最后溶解是非常重要的, 洗液的残留会影响最终的洗脱。
17. 将miRNA离心纯化柱转移至一新的无RNA酶的1.5ml离心管中, 往硅胶膜中央滴加50 μ l洗脱液EB, 轻盖管盖, 室温静置2-5min, 10,000 x g 离心1min洗脱RNA。
注意: 洗脱体积不宜小于30 μ l, 否则会影响洗脱效果。
18. 把洗脱液滴加回硅胶膜重复第17步洗脱。
19. 如需后续操作, 请始终将溶解的RNA至于冰上, 保存请置于-80 $^{\circ}$ C。

【RNA质量判定】

实例: 用常规比色皿测量RNA浓度。

RNA样品总体积: 50 μ l

稀释因子, 1:100 (10 μ l RNA样品+990 μ l无RNA酶高压灭菌水)

A260读值: 0.20 (在1ml比色皿中测量)

因此, RNA样品浓度= $40 \times A_{260} \times \text{稀释因子} = 40 \times 0.20 \times 100 = 800 \mu\text{g/ml}$

RNA样品的得率= $800 \times 0.05 = 40 \mu\text{g}$

实例: 用超微量比色皿测量 RNA浓度。

RNA样品总体积: 50 μ l

稀释因子, 1:100 (1 μ l RNA样品+99 μ l无RNA酶高压灭菌水)

A260读值: 0.20 (在超微量比色皿中测量)

因此, RNA样品浓度= $40 \times A_{260} \times \text{稀释因子} = 40 \times 0.20 \times 100 = 800 \mu\text{g/ml}$

RNA样品的得率= $800 \times 0.05 = 40 \mu\text{g}$

注: 本产品仅供科研使用。请勿用于医药、临床治疗、食品及化妆品等用途。