

目 录

简 介	2
原 理	2
试剂盒组成	3
保质期	3
方案 1:石蜡包埋样品总 RNA 标准提取方案	4
方案 2:石蜡包埋样品总 RNA 优化提取方案(带 DNase 酶)	6
常见问题回答	8

版本: 2018-01

简介

HiPure FFPE RNA Kits B 是专门为石蜡包埋组织 RNA 抽提而设计的。试剂盒基于硅胶柱纯化技术，提取过程中无需使用有毒的酚氯仿抽提，也无需进行耗时的醇类沉淀，整个提取过程只需 60 分钟。纯化的 RNA 可直接用于 RT-PCR、Northern blot、核酸保护和体外翻译等实验。

参数	FFPE RNA Kit	FFPE RNA Plus Kit
产品编号	R4143	R4144
脱蜡方法	无毒性的脱蜡液	无毒性的脱蜡液
DNA 去除方法	无	带 DNase 进行消化
结合力	20µg	20µg
洗脱体积(µl)	10-30µl	10-30µl

原理

HiPure 硅胶柱以高结合力的玻璃纤维滤膜为基质。滤膜在高浓度离子化剂(如盐酸胍或异硫氰酸胍)条件下，可通过氢键和静电等物理化学作用吸附核酸，而蛋白质和其它杂质则不被吸附而去除。吸附了核酸的滤膜经洗涤去除残留的蛋白质和盐，最后可以用低盐缓冲液(如 Buffer TE)或水，洗脱出滤膜上吸附的核酸。

HiPure FFPE RNA Kit 是简易型的石蜡包埋组织 RNA 抽提试剂盒。HiPure FFPE RNA Plus Kit 为优化的提取试剂盒，试剂盒采用无毒型的脱蜡试剂代替经典的二甲苯脱蜡过程，并在脱蜡过程中无需去除液体，减少微量样品丢失的风险。试剂盒还提供了独特的 DNase 处理方法，即样品经蛋白酶消化后，加入 DNase 激活液去除裂解液中 SDS 对 DNase 的抑制作用，让 DNase 能在裂解液中保持活性消化去除 DNA 的污染。

保质期

HiPure FFPE RNA Kits 除 Proteinase K 和 DNase I 外，其它组份可在室温下(15-25℃)干燥保存 18 个月。长期保存时需置于 2-8℃。收到产品后，把 Proteinase K 和 DNase I 保存于-20℃。

组 成**HiPure FFPE RNA Kit**

产品编号	R4143-01	R4143-02	R4143-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure RNA Mini Columns I	10	50	250
2ml Collection Tubes	10	50	250
Buffer FRC(脱蜡液)	12 ml	60 ml	300 ml
Buffer FRL	5 ml	15 ml	60 ml
Buffer FBD	5 ml	15 ml	60 ml
Buffer RWC*	5 ml	20 ml	80 ml
Buffer RW2*	5 ml	20 ml	2 x 50 ml
Protease Dissolve Buffer	1.8 ml	1.8 ml	15 ml
Proteinase K	6 mg	24 mg	120 mg
RNase Free WWater	1.8 ml	10 ml	30 ml
说明书	1	1	1

HiPure FFPE RNA Plus Kit

产品编号	R4144-01	R4144-02	R4144-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure RNA Mini Columns I	10	50	250
2ml Collection Tubes	10	50	250
Buffer FRC(脱蜡液)	12 ml	60 ml	300 ml
Buffer FRL	5 ml	15 ml	60 ml
Buffer FBD	5 ml	15 ml	60 ml
Buffer RWC*	5 ml	20 ml	80 ml
Buffer RW2*	5 ml	20 ml	2 x 50 ml
DNase Booster Buffer	0.3 ml	1.2ml	6 ml
DNase I(20 Units)	120 µl	10mg	5 x 10mg
Protease Dissolve Buffer	1.8 ml	1.8 ml	15 ml
Proteinase K	6 mg	24 mg	120 mg
RNase Free Water	1.8 ml	10 ml	30 ml
说明书	1	1	1

方案 1. 石蜡包埋组织样品总 RNA 抽提的标准流程 (R4143)

该方案适合于从各种石蜡包埋组织样品中提取总 RNA。该方案先采用二甲苯脱除样品中的石蜡, 然后再采用蛋白酶消化来释放 RNA。以下离心条件均在室温下进行。

需要准备材料和工具

- 无水乙醇(96-100%)和异丙醇
 - 溶解 Proteinase K (20mg/ml): 加入 Protease Dissolve Buffer 溶解 Proteinase K 至浓度为 20mg/ml。轻轻振荡使之溶解, 分装保存于-20℃。
 - Buffer RWC 使用前, 须按瓶子标签所示用无水乙醇进行稀释。
 - Buffer RW2 使用前, 须按瓶子标签所示用无水乙醇进行稀释。
1. 用干净刀片去除多余石蜡。把样品切成厚度为 5-20 μ m 的切片。若样品已曝露在空气中, 去除表面的 2-3 个切片。
 2. **加入 1ml Buffer FRC(脱蜡液)至样品中, 涡旋混匀。**短暂离心确定样品浸泡到 Buffer FRC 中, 56℃温育 3 分钟。其间涡旋混匀 1~3 次, 让石蜡充分溶解。
 3. 14,000 \times g 离心 2 分钟。小心吸弃上清液, 不要吸到沉淀。
 4. 短暂离心, 吸尽残液。
 5. **加入 200 μ l Buffer FRL 和 20 μ l Proteinase K 至样品中, 涡旋重悬样品。**
 6. 55℃水浴 15~30 分钟, 然后于 80℃水浴 15 分钟。
80℃处理可以逆转被甲醛修饰的核酸。延长时间会引起的 RNA 的降解。
 7. **短暂离心, 加入 200 μ l Buffer FBD 至样品中, 涡旋混匀 10 秒。**
 8. **加入 600 μ l 无水乙醇至样品中, 涡旋混匀 10 秒。**
若抽提的 RNA 含有小片段的 micro RNA 或其它 small RNA, 加入无水乙醇为 1100 μ l。
 9. **把 HiPure RNA Mini Column I 装在 2ml 收集管中。转移一半体积的混合液至柱子中。**8,000 \times g 离心 30-60 秒。
 10. 倒弃流出液, 把柱子装在收集管中。转移剩余混合液至柱子中。8,000 \times g 离心 30-60 秒。
 11. 倒弃流出液, 把柱子装在收集管中。**加入 500 μ l Buffer RWC(已用乙醇稀释)至柱**

子中。 $8,000 \times g$ 离心 30-60 秒。

Buffer RWC 在使用之前，必须按瓶子标签所示用异丙醇进行稀释。

12. 倒弃流出液，把柱子装在收集管中。**加入 500 μ l Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中。** $8,000 \times g$ 离心 30-60 秒。

Buffer RW2 在使用之前，必须按瓶子标签所示用无水乙醇进行稀释。

13. 倒弃流出液，把柱子装在收集管中。**加入 500 μ l Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中。** $8,000 \times g$ 离心 30-60 秒。

14. 倒弃流出液，把柱子装在收集管中。 $13,000 \times g$ 离心空柱 3 分钟，以甩干柱子的基质。

15. 将柱子转移至新的 1.5ml 离心管。**加入 15~50 μ l RNase Free Water 至柱子的膜中央。** 静置 2 分钟。 $13,000 \times g$ 离心 1 分钟。

16. 弃去柱子，把 RNA 保存于 -80°C 。

方案 2. 石蜡包埋组织样品总 RNA 抽提的优化流程 (R4144)

该方案适合于从各种石蜡包埋组织样品中提取总 RNA。该方案先采用无毒性脱蜡液去除样品中的石蜡，用蛋白酶消化来释放 RNA，再用特独的 DNase 激活液和 DNase 消化去除裂解液中的 DNA，最后再过柱纯化得到 RNA。以下离心条件均在室温下进行。

需要准备材料和工具

- 无水乙醇(96-100%)和异丙醇
 - 溶解 Proteinase K (20mg/ml): 加入 Protease Dissolve Buffer 溶解 Proteinase K 至终浓度为 20mg/ml。轻轻振荡使之溶解，分装保存于-20℃。
 - 溶解 DNase I: 加入 650ul 的 Protease Dissolve Buffer 溶解 DNase I，颠倒混匀让 DNase I 充分溶解，溶解的 DNase I 须保存于-20~8℃。
 - Buffer RWC 使用前，须按瓶子标签所示用无水乙醇进行稀释。
 - Buffer RW2 使用前，必须按瓶子标签所示用无水乙醇进行稀释。
1. 用干净刀片去除多余石蜡。把样品切成厚度为 5-20 μ m 的切片。若样品已暴露在空气中，去除表面的 2-3 个切片。
 2. **加入 1ml Buffer FRC(脱蜡液)至样品中，涡旋混匀。**短暂离心确定样品浸泡到 Buffer FRC 中，56℃温育 3 分钟。其间涡旋混匀 1~3 次，让石蜡充分溶解。
 3. 14,000 \times g 离心 2 分钟。小心吸弃上清液，不要吸到沉淀。
 4. **加入 1ml 无水乙醇，涡旋混匀 15 秒**，14,000 \times g 离心 2 分钟。小心彻底吸弃上清液，不要吸到沉淀。
 5. 打开管盖，室温（15~25℃）干燥 15 分钟以彻底去除残留的乙醇。
充分干燥去除乙醇非常重要。乙醇会影响到 RNA 的抽提效率。
 6. **加入 200 μ l Buffer FRL 和 20 μ l Proteinase K 至样品中，涡旋重悬样品。**
 7. 55℃水浴 15~30 分钟，然后于 80℃水浴 15 分钟。
80℃处理可以逆转被甲醛修饰的核酸。延长会引起 RNA 的降解。
 9. 冰上放置 3 分钟。
 10. 4℃, 15,000 \times g 离心 3 分钟，小心转移上清液至新的 2ml 离心管。

11. 加入 20 μ l DNase Booster Buffer 至上清液中。涡旋混匀 10 秒，静置 2 分钟。
12. 加入 10 μ l DNase I (20Units/ μ l)至上清液中。轻轻振荡混匀，静置 20 分钟。
13. **加入 200 μ l Buffer FBD 至样品中**，涡旋混匀 10 秒。室温静置 10 分钟。
14. **加入 600 μ l 无水乙醇至上清液中**。涡旋混匀 10 秒。
抽提的 RNA 含有小片段的 micro RNA 或其它 small RNA，加入无水乙醇为 1100 μ l。
15. 把 HiPure RNA Mini Column I 装在 2ml 收集管中。**转移一半体积的混合液至柱子中**。8,000 \times g 离心 30~60 秒。
16. 倒弃流出液，把柱子装在收集管中。转移剩余混合液至柱子中。8,000 \times g 离心 30~60 秒。
17. 倒弃流出液，把柱子装在收集管中。**加入 500 μ l Buffer RWC(已用乙醇稀释)至柱子中**。8,000 \times g 离心 30~60 秒。
Buffer RWC 在使用之前，须按瓶子标签所示用无水乙醇进行稀释。
18. 倒弃流出液，把柱子装在收集管中。**加入 500 μ l Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中**。8,000 \times g 离心 30~60 秒。
Buffer RW2 在使用之前，必须按瓶子标签所示用无水乙醇进行稀释。
19. 倒弃流出液，把柱子重新装回收集管中。**加入 500 μ l Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中**。8,000 \times g 离心 30~60 秒。
20. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。13,000 \times g 离心空柱 3 分钟甩干柱子。
21. 将柱子转移至新的 1.5ml 离心管。**加入 15~50 μ l RNase Free Water 至柱子的膜中央**。静置 2 分钟。13,000 \times g 离心 1 分钟。
22. 弃去柱子，把 RNA 保存于-80 $^{\circ}$ C。

常见问题回答

该列表可能有利于您解决在提取过程中所碰到的问题。Magen 的技术人员可以随时为您提供咨询服务，若您对试剂盒存在疑问或有良好的建议，又或者您在分子生物学实验中碰到问题，都请您联系我们。我们将竭尽所能为您排忧解难。

现象	原因及解决方法
RNA 产量低	
样品的起始用量太多	参照上面
乙醇残留	脱蜡时，干燥时间不够，有乙醇残留。
切片太厚	石蜡组织切片太厚，不要超过 10 μ m。
石蜡残留	二甲苯去除石蜡不彻底。
RNA 降解	
样品中 RNA 已经降解	石蜡包埋组织 RNA 在固定，包埋及保存过程都会发生降解。
RNA 酶污染	操作过程引入 RNA 酶的污染。
下游实验结果不理想	
盐分污染	加入 Buffer RW2 后，静置 5 分钟后，再离心。
乙醇污染	确保空柱离心速度高于或等于 12,000xg，离心时间为 2 分钟。
膜材料脱落	硅胶膜在离心过程中可能会发生脱落。脱落到质粒中硅胶膜是不溶解的，可能过 12,000xg 离心 2 分钟去除。

若以上的解答还是无法解决您的问题，请您联系我们。