

石蜡包埋组织 microRNA 快速提取试剂

KR206 50 次

试剂盒组成、储存、稳定性:

| | | |
|-----------------------------|---------|-----------------------------|
| 试剂盒组成 | 保存 | 50 次 |
| 裂解液 PKD | 室温 | 15 ml |
| 结合液 RBC | 室温 | 25 ml |
| 漂洗液 RW | 室温 | 10 ml 第一次使用前加入 42ml 无水乙醇 |
| 蛋白酶 K 溶液 20mg/ml | 4°C或者室温 | 1ml |
| RNase-free H ₂ O | 室温 | 5ml |
| 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 |

本试剂盒在室温储存 9 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°C 水浴加热几分钟, 即可恢复澄清。
2. 不合适的低温 (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。
3. 漂洗液 RW 加入乙醇使用几天后可能出现沉淀晶体, 并不影响使用, 直接不吸晶体, 吸上清使用就可以。
4. **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。
5. 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RNA包括microRNA。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:

1. **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, 如 Eppendorf 5415C 或者类似离心机。
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 3x10⁶ 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 μ 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。**
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, 应注意以下几方面:
 - 1) 经常更换新手套。因为皮肤经常带有细菌, 可能导致 RNase 污染。
 - 2) 使用无 RNase 的塑料制品和枪头避免交叉污染。
 - 3) 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 $^{\circ}$ 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。
 - 4) 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%(v/v), 37 $^{\circ}$ 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 EASYspin 固定包埋组织 microRNA 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:

- 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 (10mMTris, 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 RW 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 10-20μm 厚切片。

切片厚度必须≥10μm, 否则太薄会切碎细胞, 造成脱蜡过程中 microRNA 丢失。

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 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

- 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°C水浴 3 分钟溶解石蜡, 20-25°C最高速离心 2 分钟, 收集组织到管底。
- 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°C 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。

- 吹打或者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, 吹打混匀。
- 55°C孵育 15 分钟, 然后 80 °C孵育 15 分钟。

55°C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°C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 清除柱中, (清除柱放入收集管中) 14,000 rpm 离心 30 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■1120μl ▲1750μl 无水乙醇到滤过液中, 立即吹打混匀, 不要离心。

如果加 1750μl 无水乙醇, 应先将滤过液转到容量超过 3ml 的离心管后再加入。

- 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 RA 中, (吸附柱放入收集管中) 13,000 rpm 离心 30 秒, 弃掉废液。
- 加入 500μl 漂洗液 RW (**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 RW,重复一遍。
- 将吸附柱 RA 放回空收集管中, 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 RA, 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°C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 RA, 再洗脱一遍。