

RaPure FFPE RNA Kit

总 RNA 快提试剂盒(单柱型)

产品简介

HiPure FFPE RNA Kits 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。

产品组份

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 DPS (脱蜡液)	12 ml	60 ml	300 ml
Buffer FRL	5 ml	15 ml	60 ml
Buffer AL	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	120 μ l	600 μ l	5 x 600 μ l
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

版本号：202401

保存条件

HiPure FFPE RNA Kits 可在室温下(15-25°C)干燥保存 18 个月。收到产品后，把 Proteinase K 和 DNase I 保存于-20°C。

准备事项

- 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℃。
- 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。
- 福尔马林固定以及石蜡包埋程序会造成核酸的片段化, 为了尽量降低 DNA/RNA 片段化的可能性, 组织切除后应尽快浸入 4%-10%的福尔马林溶液中, 固定时间最好为 14-24h, 样本包被之前必须彻底脱水。切片厚度不超过 20 μm , 切片数应不超过 8 片, 表面积应不超过 250 mm^2 。初次实验时, 用的切片数应不超过 3 片, 然后根据 RNA 的得率和纯度, 下次制备采用的切片数可以进行调整, 但应不超过 5 片。
- 福尔马林固定组织: 由于福尔马林固定会造成核酸的片段化, 为了尽量降低 RNA 片段化的可能性, 组织切除后应尽快浸入 4%-10%的福尔马林溶液中, 固定时间最好为 14-24h。固定后用无水乙醇清洗数次去除甲醛, 浸泡于 75%乙醇室温保存。提取时, 用生理盐水或 PBS 清洗去除乙醇, 按操作步骤 A 的第 4 步进行操作。

实验步骤 A (除脱蜡)

1. 用干净刀片去除多余石蜡。把样品切成厚度为 5-20 μm 的切片。若样品已暴露在空气中, 去除表面的 2-3 个切片。
2. 转移 2-6 个切片至 1.5ml 离心管中, 加入 1ml Buffer DPS(脱蜡液)至样品中, 颠倒 3-5 次, 56℃温育 3~5 分钟, 立即高速涡旋混匀 5-15 秒让石蜡充分溶解。
若石蜡较多时, 这一步最好把脱蜡液吸弃以简化下游操作。
当石蜡较多时, 脱蜡液与石蜡比例不够时, 常温下脱蜡液/石蜡会固化而影响操作。此时可以加入更多的脱蜡液(总体积 1.5-1.8ml), 56℃再温育 1-3 分钟充分溶解。
与石蜡去除不充分时, 吸弃脱蜡液后再重复 2-3 步进行第二次脱蜡以充分去除石蜡。
3. 13,000 \times g 离心 3 分钟收集组织切片, 小心倒弃上清液, 反扣于吸水纸上吸尽残液。残留少量的脱蜡液不影响操作。
4. 加入 200 μl Buffer FRL 和 20 μl Proteinase K 至样品中, 涡旋 5 秒。55℃水浴 30 分钟, 13,000 \times g 离心 3 分钟。
5. 小心转移上清液至新的 2ml 离心管, 80℃水浴 30 分钟, 按第 6 步进行操作。
80℃温育可以逆转被甲醛修饰的核酸。受甲醛固定时间的影响, 有部分样品可能需要延长 80℃

的温育时间至 1 小时来提高产量和扩增效率,可以根据下游应用和样品情况,延长或缩短 55°C 和 80°C 温育时间。若需要严格控制 DNA 污染水平时,建议 55°C 水浴 15 分钟,80°C 水浴 15 分钟。处理甲醛固定时间过长或一些腺体切片样品,可以尝试 55°C 水浴 60 分钟,80°C 水浴 60 分钟来提高 RNA 的产量和充分修复甲醛交联效果,但延长消化时间和修复时间也大大 DNA 的污染水平。

实验步骤 B (不除脱蜡)

1. 用干净刀片去除多余石蜡。把样品切成厚度为 5-20 μm 的切片。若样品已暴露在空气中,去除表面的 2-3 个切片。
2. 转移 1~3 个切片至 1.5ml 离心管中,加入~0.6ml Buffer DPS (脱蜡液)至样品中,涡旋混匀 5-15 秒,56°C 温育 3~5 分钟让石蜡充分溶解。
3. 13,000 \times g 离心 3 分钟让组织碎片沉淀至离心管底。
4. 加入 200 μl Buffer FRL 至离心管底部,再加入 20 μl Proteinase K 至底部,轻轻吸打 6~8 次。55°C 温育 20 分钟,80°C 温育 20 分钟。
5. 13,000 \times g 离心 3 分钟,转移下层的消化液至新的离心管中。
离心后,脱蜡液/石蜡在上层,含 RNA 的消化液在下层,转移下层消化液至新的离心管中,转移少量的脱蜡液不影响的提取。
6. 加入 20 μl DNase Booster Buffer 至样品中,涡旋 5 秒,静置 2 分钟。
7. 加入 10 μl DNase I (20Units/ μl)至样品中,吸打混匀 3-5 次,静置 20 分钟消化 DNA。
8. 加入 220 μl Buffer AL 至样品中,涡旋混匀 5 秒。
9. 加入 350 μl 无水乙醇至样品中,涡旋混匀 5~10 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 1000 μl 。
10. 把 HiPure RNA Mini Column I 装在 2ml 收集管中。转移不超过 750 μl 混合液至柱子中。10,000 \times g 离心 30-60 秒。
11. 倒弃滤液,把柱子装在收集管。转移剩余混合液至柱子。10,000 \times g 离心 30-60 秒。
12. 倒弃滤液,把柱子装在收集管中,加入 500 μl Buffer RWC(已用乙醇稀释)至柱子中。10,000 \times g 离心 30-60 秒。
Buffer RWC 在使用之前,必须按瓶子标签所示用无水乙醇进行稀释。
13. 倒弃滤液,把柱子装在收集管中,加入 500 μl Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中。10,000

× 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。

14. 倒弃滤液，把柱子装在收集管中，加入 500µl Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中。10,000 × g 离心 30-60 秒。
15. 倒弃滤液，把柱子装在收集管中。10,000 × g 离心空柱 3 分钟，以甩干柱子的基质。
16. 将柱子转移至新的 1.5ml 离心管。加入 20~100 µl RNase Free Water 至柱子的膜中央。静置 2 分钟。10,000 × g 离心 1 分钟。弃去柱子，把 RNA 保存于-80°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 10µm。
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。