

M5 EASYspin 固定包埋组织 microRNA 快速提取试剂盒使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 EASYspin 固定包埋组织 microRNA 快速提取试剂盒	50T	MF149-01

【储存条件】

1. 所有溶液应该是澄清的，如果环境温度低时溶液可能形成沉淀，此时不能直接使用，请在 37°C 水浴加热几分钟，恢复澄清后使用。
2. 不合适的储存于低温（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. Wash Solution 2/3 可能加入乙醇使用几天后出现沉淀晶体，并不影响使用，直接不吸晶体，吸上清使用就可以。
4. 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。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°C 保存。
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。

【产品简介】

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。

【产品组份】

	储存温度	50T	注意事项
裂解液 PKD	室温	15 ml	
结合液 RBC	室温	25 ml	
漂洗液 RW	室温	10ml	第一次使用前按说明加指定量乙醇
蛋白酶 K 粉（可选）40mg/ml	-20°C	20mg	
RNase-free H ₂ O	室温	10 ml	
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	

【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 10µm 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°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°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 (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 (提取包含 microRNA 的总 RNA)】

<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

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 分钟溶解石蜡, 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。

6. 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。

7. 加入 1ml 无水乙醇，重复步骤 6 一遍，尽可能吸弃所有乙醇。

8. 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。

9. 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。

10. 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。

11. 加入 320µl 500µl 结合液 RBC，充分吹打混匀调节结合条件。

12. 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）。应避免吸到可能的较大的未消化完全的絮团物质上柱子，以免堵塞离心柱。

13. 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。

14. 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。

15. 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。

16. 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。

17. 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。

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。