

FFPE RNA Extraction Mini Kit

石蜡组织 RNA 小提试剂盒

本产品适合于从石蜡切片或包埋组织样品中提取 RNA。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。得到的 RNA 可直接用于 RT-PCR, Northern Blot 等实验。

产品组份

产品编号	RNF422-01	RNF422-02	RNF422-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
RNA Extraction Micro Columns	10	50	250
2ml Collection Tubes	10	50	250
Buffer DP	8 ml	35 ml	160 ml
Buffer FTL	3 ml	15 ml	70 ml
Buffer FPL	3 ml	15 ml	70 ml
Buffer W1R	12 ml	30 ml	150 ml
Buffer W2R	5 ml	20 ml	2 x 40 ml
Proteinase K	220 μ l	1.1 ml	5.5 ml
DNase I	110 μ l	550 μ l	3 ml
DNase Buffer	1 ml	5 ml	25 ml
Nuclease Free Water	1.5 ml	10 ml	30 ml

保存条件

本产品可在室温(15~25 $^{\circ}$ C)保存 12 个月。低温下，Buffer FTL 可能会有沉淀形成，需 55 $^{\circ}$ C 水浴让沉淀完全溶解。

准备事项

- 水浴锅
- Buffer W2R 使用前，须按瓶子标签所示，加入无水乙醇进行稀释。

实验步骤

1. 用手术剪刀和镊子去除石埋包埋组织中的多余的石蜡。用切片机切出 1~5 片 10 μ m 的切片，并转移至 1.5ml 离心管中。
2. 加入 600 μ l Buffer DP 至样品中，涡旋混匀 15 秒。56 $^{\circ}$ C 水浴 5 分钟，涡旋混匀 15 秒。
3. 加入 20 μ l Proteinase K 和 220 μ l Buffer FTL 至样品中，涡旋或吸打混匀几次使之重悬。
4. 56 $^{\circ}$ C 温育 15 分钟。80 $^{\circ}$ C 温育 15 分钟。
5. 13,000 x g 离心 1 分钟，小心转移下层液体至新的离心管中。

上层液体为脱蜡液，避免转移以免影响纯度。

6. 加入 250 μ l Buffer FPL 至样品中，高速涡旋混匀 30 秒。

过柱纯化

7. 加入 1000 μ l 无水乙醇至消化液中，涡旋混匀 15 秒。
8. 把 RNA Extraction Micro Columns 装在 2ml 收集管中。转移第 8 步获得的混合液(包括沉淀)至柱子中。13,000 x g 离心 1 分钟。重复该步骤直至混合液完全过柱。
若柱子出现堵塞，14,000 x g 离心 3~5 分钟。混合液超过 750 μ l，分次过柱。
9. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 500 μ l Buffer W1R 至柱子中。13,000 x g 离心 1 分钟。
10. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中，加入 70 μ l 配置好的 DNase I 溶液至柱子膜中央[DNase I 溶液：10 μ l DNase I+60 μ l DNase Buffer,轻轻吹打混匀]。室温放置 15 分钟。之后加入 500 μ l Buffer W1R，室温静置 1 分钟，13,000 x g 离心 1 分钟。

11. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 600 μ l Buffer W2R 至柱子中。13,000 \times g 离心 10 秒。
12. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 600 μ l Buffer W2R 至柱子中。13,000 \times g 离心 10 秒。
13. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。13,000 \times g 离心 2 分钟。

该步骤去除 RNA 柱中残留的乙醇，乙醇残留会影响后续的酶促反应。当洗脱体积低于 50 μ l 时，该步骤结束后应打开 RNA 柱盖子于室温空气干燥 10 分钟后再进行洗脱，避免乙醇残留对酶促反应的影响。
14. 将柱子装在新的 1.5ml 离心管中。加入 20~50 μ l Nuclease Free Water 至柱子的膜中央。放置 3 分钟。13,000 \times g 离心 1 分钟。

柱子最小的洗脱体积是 20 μ l，若对产量要求较高，推荐进行第二次洗脱，将洗脱液重新加至柱子膜中央，室温静置 3 分钟，13,000 \times g 离心 1 分钟。
15. 丢弃 RNA 结合柱，把 RNA 保存 2-8 $^{\circ}$ C，长期保存需放置于-20 $^{\circ}$ C。

常见问题

1. 柱子堵塞

- **样品用量太多：**减少样品量。切片数量不能加入过多。
- **样品消化不充分：**消化过程中建议颠倒混匀数次或振荡温浴。
- **样品裂解不充分：**样品与 Buffer FPL 混匀不充分。重新提取，加入 Buffer FPL 后先颠倒混匀 3~5 次，然后以最高速度涡旋让样品与 Buffer FPL 充分混匀。
- **消化液存在不溶解的物质：**若样品消化后仍存在明显的颗粒，于 13,000 x g 离心 3 分钟去除未消化的物质。

2. RNA 产量低

- 参考柱子堵塞部分。
- Buffer W2R 没有加入乙醇稀释。
- 加入乙醇后有沉淀析出时，用移液枪吸打几次打散沉淀有利于提高产量。
- **洗脱不充分：**洗脱液需加到膜中央，增加洗脱体积或次数。