

## RNAeasy™石蜡包埋组织RNA抽提试剂盒(离心柱式)

产品编号	产品名称	包装
R0033S	RNAeasy™石蜡包埋组织RNA抽提试剂盒(离心柱式)	50次

### 产品简介:

- 碧云天研发生产的RNAeasy™石蜡包埋组织RNA抽提试剂盒(离心柱式) (RNAeasy™ Paraffin-embedded Tissue RNA Purification Spin Kit), 也称石蜡包埋组织RNA提取试剂盒、石蜡包埋组织RNA抽提试剂盒、FFPE组织RNA抽提试剂盒等, 是一种采用环保脱蜡方式去除石蜡后抽提切片样品中RNA的试剂盒。抽提获得的RNA长度通常大于200个核苷酸(nucleotide, nt), 可以应用于反转录、RT-PCR、qRT-PCR或转录组测序等下游实验。
- 本试剂盒也可以用于福尔马林、多聚甲醛等固定的组织的RNA抽提。
- 福尔马林固定石蜡包埋(Formalin fixation and paraffin embedding, FFPE), 常应用于癌症等疾病研究中保存离体组织的形态学和组织学结构, 以便于运输和储存, 是病理样品长期保存的主要方法之一[1]。组织样品经福尔马林固定时, 组织内细胞中的核酸和蛋白质等分子间随机交联, 核酸出现片段化, 因此难以获得高质量核酸。本试剂盒采用环保脱蜡法去除石蜡, 以特殊的裂解条件释放FFPE组织样本中的RNA分子, 最大程度地降低了福尔马林固定时组织内细胞中RNA与其它分子交联的不利影响, 经本试剂盒抽提获得的RNA纯度高、完整性好、质量稳定。
- 本试剂盒抽提RNA的实验流程如图1所示。首先使用环保的脱蜡剂和蛋白酶K将FFPE样品脱蜡、消化, 随后加入适合RNA结合到纯化柱上的缓冲液, 然后加入到纯化柱内。通过高速离心, 使RNA在穿过纯化柱的瞬间, 结合到纯化柱上, 随后通过四次洗涤去除各种杂质, 最后通过洗脱液把RNA洗脱下来。

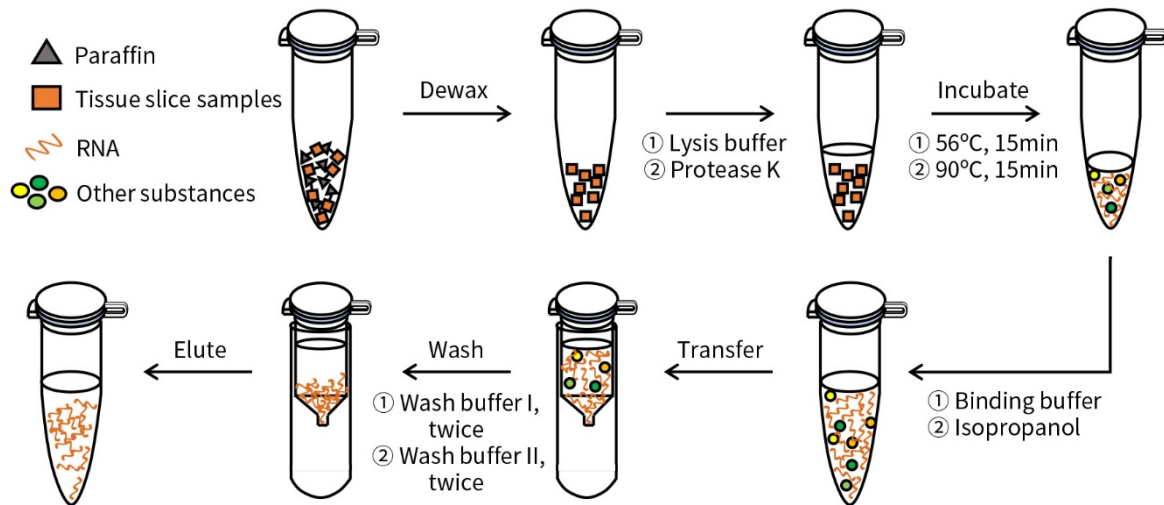


图1. 碧云天RNAeasy™石蜡包埋组织RNA抽提试剂盒(离心柱式) (R0033)的实验流程图。

- 本试剂盒抽提获得的石蜡包埋组织样品RNA纯度高。抽提获得的RNA A260/A280的范围通常在1.8-1.9之间。本试剂盒与C品牌同类产品的抽提效果对比图参见图2。

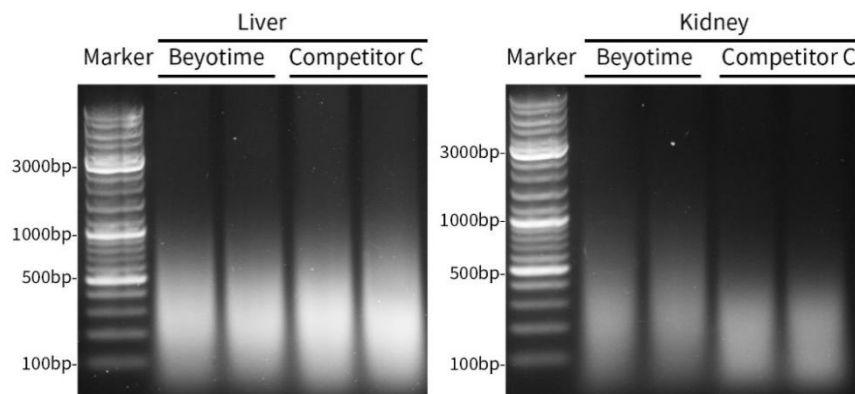


图2. 碧云天RNAeasy™石蜡包埋组织RNA抽提试剂盒(离心柱式) (R0033)与同类产品(Competitor C)的RNA抽提效果对比图。样品为小鼠肝脏和肾脏组织石蜡切片, 样品用量为6片10μm厚切片。抽提后洗脱体积均为100μl, 取10μl的洗脱样品与2μl BeyoRed DNA上样缓冲液(6X) (D0072)混合均匀后, 在1%琼脂糖凝胶中电泳30分钟后拍照。如图所示, 本试剂盒用于抽提小鼠肝脏、肾脏FFPE样品的RNA时, 抽提得到的RNA的量与C品牌的同类试剂盒基本一致或略好。注: 抽提得到的RNA经DNase I处理。实际结果会因样品、实验条件、检测仪器等的不同而存在差异, 图中数据仅供参考。

- **本试剂盒使用安全、高效。**本试剂盒通过特殊的柱纯化介质进行RNA分离纯化, 能有效避免常规方法抽提RNA时使用的酚、氯仿等有毒有害有机试剂。
- **本试剂盒操作快速、便捷。**本试剂盒采用柱纯化, 无需繁琐的RNA沉淀步骤, 纯化RNA操作过程仅需约15分钟即可完成。和国外同类柱纯化产品相比, 所需操作步骤和操作时间基本一致。碧云天同时提供更加便捷的BeyoMag™石蜡包埋组织RNA抽提试剂盒(磁珠法) (R0085), 且磁珠法抽提得到的RNA包含<200nt的小RNA或部分降解、断裂RNA, 抽提更完全。
- 本试剂盒的标准操作步骤抽提得到的RNA含有少量DNA, 但如果按照可选步骤加入DNase I, 就可以获得不含DNA的高纯度RNA。
- 本试剂盒小包装可用于50个样品的RNA抽提。

#### 包装清单:

产品编号	产品名称	包装
R0033S-1	脱蜡剂	50ml
R0033S-2	裂解液	10ml
R0033S-3	结合液	15ml
R0033S-4	洗涤液I (首次使用前加9ml无水乙醇)	51ml (+9ml)
R0033S-5	洗涤液II (首次使用前加48ml无水乙醇)	16ml (+48ml)
R0033S-6	洗脱液	12ml
R0033S-7	蛋白酶K	0.6ml
R0033S-8	RNA纯化柱及废液收集管	50套
R0033S-9	RNA洗脱管	50个
—	说明书	1份

#### 保存条件:

蛋白酶K -20°C保存, 其余均室温保存, 一年有效。蛋白酶K室温(15-25°C)存放一周, 活力无明显下降。

#### 注意事项:

- 如果希望获得更高质量的RNA, 宜尽量使用新鲜固定和包埋的组织样品。拿到组织样品后尽快在4-10%福尔马林中固定, 固定时间最好在8-24小时之间或更短时间, 长时间固定会使RNA断裂更为严重。
- 样品包埋前应确保彻底脱水, 残留的甲醛可能抑制蛋白酶K的消化等相关实验步骤。
- 本试剂盒抽提RNA依赖于样品类型、储存时间以及固定条件。样品固定时间和保存时间过长(>1年)易破坏RNA完整性, 无法抽提出长片段。
- 石蜡包埋组织抽提得到的RNA, 由于样品的特殊性, 存在可能的断裂或降解, 通常不建议用于需要全长RNA的下游应用。
- 如需制备不含DNA的高纯度RNA, 需自备DNase I, 推荐使用碧云天的DNase I (D7073/D7076)。
- 温度较低时裂解液或结合液中可能会有沉淀产生, 属正常现象。使用前必须检查一遍, 如有沉淀, 55°C水浴孵育使沉淀溶解, 混匀后使用。
- **第一次使用前小包装洗涤液I需添加9ml无水乙醇, 洗涤液II需添加48ml无水乙醇, 混匀, 并在瓶上做好标记。**
- 本试剂盒须将FFPE样品56°C和80°C孵育, 推荐使用碧云天的BeyoBath™干式恒温金属浴(1.5/2ml×40) (E6662)。
- 使用本试剂盒须提前备好无水乙醇和异丙醇。
- 除特别说明外, 每次Vortex应控制在5-10秒左右, 推荐使用碧云天的BeyoVortex™调速式涡旋混匀仪(E6699)或BeyoVortex™基础型涡旋混匀仪(E6788)。
- 本试剂盒所有操作均在室温进行, 操作时无需冰浴。所有离心也均在室温进行。
- 废液收集管在一次抽提中需多次使用, 切勿中途丢弃。
- 脱蜡剂和蛋白酶K对人体有呼吸道、生殖等特定器官毒性, 或致畸致癌毒性, 操作时请特别小心, 并注意有效防护以避免直接接触人体或吸入体内。
- 洗涤液I对人体有害或有刺激性, 操作时请小心, 并注意有效防护以避免直接接触人体或吸入体内。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

#### 使用说明:

##### 1. 样品处理。

a. 石蜡包埋组织切片: 取2-8张的石蜡切片(5-10μm厚, 表面积小于1×1cm<sup>2</sup>)。

如果样品表面暴露于空气中, 尽量避免使用。

- b. 福尔马林固定组织：取10-25mg福尔马林固定液中的组织，用手术刀充分切碎后，置于1.5ml离心管中，加入500μl的PBS, pH7.4 (DNase, RNase & Protease free, Sterile) (ST478), Vortex震荡混匀，12,000×g离心1分钟后充分去除上清，再重复清洗2次，然后从步骤2h开始操作。

## 2. 脱蜡和裂解。

- a. 将石蜡切片置于1.5ml离心管中，加入600μl的脱蜡剂，剧烈Vortex 30秒，以充分脱蜡。  
福尔马林固定液中的组织样品无需加脱蜡剂，直接转入步骤2h开始操作；如果石蜡样品过多，可以将脱蜡剂用量增加至1ml。
- b. 室温，≥14,000×g离心5分钟。
- c. 使用吸头小心吸去上清，注意不要碰到沉淀。
- d. 加入1ml无水乙醇，Vortex混匀。
- e. 室温，≥14,000×g离心5分钟。
- f. 使用吸头小心吸去上清，注意不要碰到沉淀。  
可以用新的10μl吸头小心吸去残留的乙醇，有利于乙醇挥发。
- g. 打开管盖，室温放置5-10分钟直至残留的乙醇完全挥发。  
残留的乙醇会对RNA产生影响，可以将离心管置于37°C环境下挥发乙醇。
- h. 加入150μl裂解液和10μl蛋白酶K，Vortex混匀，56°C金属浴或水浴孵育15分钟或直至样品完全裂解。
- i. 将完全裂解的组织样本置于80°C孵育15分钟，之后短暂离心使管盖上的蒸发液体回到管中。  
80°C孵育对修复RNA变性解交联至关重要，但是必须严格控制孵育的温度和时间，否则可能产生更多的RNA碎片，因此应先将金属浴或水浴加温至80°C再放入样本进行孵育。
- j. 室温，14,000×g离心5分钟，转移上清液(约150μl)至新的离心管中，注意不要碰到沉淀。
- k. 向上述新的离心管中加入290μl结合液，Vortex混匀；再加入670μl异丙醇，Vortex混匀。  
加入结合液和异丙醇后可能会产生白色沉淀，需立即Vortex混匀彻底混匀，但不会干扰后续实验。

## 3. 纯化RNA。

- a. 将600μl步骤2k中的混合溶液加入到RNA纯化柱内。≥6000×g离心1分钟。倒弃废液收集管内液体。  
进行本步骤前需将纯化柱置于废液收集管上。倒弃废液后回收废液收集管。
- b. 将剩余的步骤2k中的混合溶液加入到RNA纯化柱内。≥6000×g离心1分钟。倒弃废液收集管内液体。  
进行本步骤前需将纯化柱置于废液收集管上。倒弃废液后回收废液收集管。
- c. 向纯化柱中加入500μl洗涤液I，≥6000×g离心1分钟。倒弃废液收集管内液体。  
进行本步骤前需将纯化柱置于废液收集管上。倒弃废液后回收废液收集管。
- d. 清除DNA(可选做)。如果希望获得不含DNA的高纯度RNA，可向RNA纯化柱中央加入80μl含有10U DNase I的酶溶液，室温放置消化15分钟。  
推荐使用碧云天的RNase free的DNase I (D7073/D7076)，每80μl酶溶液按照71.8μl超纯水加8μl Reaction Buffer (10X)再加0.2μl 50U/μl DNase I混合配制而成。消化结束后，不需要进行离心等任何额外的操作，直接进入步骤3e。
- e. 向纯化柱中加入500μl洗涤液I，≥6000×g离心1分钟。倒弃废液收集管内液体。  
进行本步骤前需将纯化柱置于废液收集管上。倒弃废液后回收废液收集管。
- f. 向纯化柱中加入600μl洗涤液II，≥14,000×g离心1分钟。倒弃废液收集管内液体。  
进行本步骤前需将纯化柱置于废液收集管上。倒弃废液后回收废液收集管。
- g. 重复步骤3f一次。
- h. 再≥14,000×g离心1分钟，以去除残留的乙醇。  
不可把步骤3g的离心时间延长而省略本步骤，倒弃废液后再离心可以确保充分去除残留的乙醇。
- i. 将RNA纯化柱置于一洁净的1.5ml离心管上，加入30-100μl洗脱液。室温放置1-3分钟。≥14,000×g离心1分钟。所得液体即为纯化得到的RNA。  
洗脱液需要直接加至纯化柱管内柱面中央，使液体被纯化柱吸收。如果有必要，可以使用去离子水。使用较小体积的洗脱液可以使获得的RNA的浓度较高，但洗脱下来的RNA量相对较少。洗脱液的pH对洗脱效率有很大影响，使用去离子水洗脱时应保证其pH值在7.0-8.5之间。如果对于获得较多量的RNA非常重要，可以在第一次洗脱后，再用同体积洗脱液重复洗脱一次。第二次洗脱可增加RNA洗脱量，但会降低洗脱RNA的浓度。经65°C预热过的洗脱液可增加RNA的洗脱量。

## 参考文献：

1. Lee H, Ryu HS, Park HC, et al. Int J Mol Sci. 2022. 23(21):12923.

## 相关产品：

产品编号	产品名称	包装
R0024	RNAeasy™动物RNA抽提试剂盒(离心柱式)	12次
R0026	RNAeasy™动物RNA抽提试剂盒(离心柱式)	50次
R0027	RNAeasy™动物RNA抽提试剂盒(离心柱式)	200次
R0028	RNAeasy™动物小RNA抽提试剂盒(离心柱式)	50次
R0032	RNAeasy™ Plus动物RNA抽提试剂盒(离心柱式)	50次
R0033S	RNAeasy™石蜡包埋组织RNA抽提试剂盒(离心柱式)	50次

R0035	RNAeasy™病毒RNA抽提试剂盒(离心柱式)	12次/50次/200次
R0077	BeyoMag™磁珠法动物RNA抽提试剂盒	10次/50次/200次
R0091	RNAeasy™血液RNA抽提试剂盒(离心柱式)	12次/50次/200次
R0073	BeyoMag™磁珠法动物mRNA抽提试剂盒	50次/200次/800次
R0083	BeyoMag™磁珠法病毒RNA/DNA抽提试剂盒	10次/50次/200次
R0085S	BeyoMag™石蜡包埋组织RNA抽提试剂盒(磁珠法)	50次
ST533	Proteinase K (20mg/ml)	0.2ml/1ml/5ml
ST535	Proteinase K	100mg/500mg/2g
D7073	DNase I	200U
D7076	DNase I	1000U
ST975	环保脱蜡剂(二甲苯替代品)	50ml/250ml/1L
FMS012	BeyoMag™磁分离架(12孔)	1个/袋
FMS024	BeyoMag™磁分离架(24孔)	1个/袋
FMS004	BeyoMag™磁分离架(4孔, 1.5ml/2ml, 蓝)	1个/盒
FMS008	BeyoMag™磁分离架(8孔, 1.5ml/2ml, 蓝)	1个/盒
FMS016	BeyoMag™磁分离架(16孔, 1.5ml/2ml, 蓝)	1个/盒
FMS009	BeyoMag™磁分离架(8孔, 1.5ml/2ml, 铝合金)	1个/盒
FMS015	BeyoMag™磁分离架(16孔, 1.5ml/2ml, 铝合金)	1个/盒
FMS025	BeyoMag™磁分离架(24孔, 1.5ml/2ml, 铝合金)	1个/盒

Version 2024.10.22