

石蜡组织总 RNA 试剂盒说明书

产品组成

石蜡组织总 RNA 试剂盒	5 次样品	50 次制备
Cat. No.	5009005	5009050
核酸纯化柱	5 个	50 个
2 ml 收集管	5 个	50 个
RNase-free 1.5 ml 收集管	5 个	50 个
蛋白酶 K 贮存液	120 μ l	1.2 ml
Buffer AT	1.5 ml	15 ml
Buffer SL	1.5 ml	15 ml
Buffer WBR（浓缩液）	1.5 ml	12.5 ml
RNase-free Water	1.5 ml	2 ml $\times$ 3
说明书	1 份	1 份

产品储存与有效期

蛋白酶 K 贮存液可室温运输，收到后请置于 - 20℃ 储存，其他试剂与物品储存于常温（0~30℃），可在两年内保持使用性能无明显变化。

技术支持

杭州新景生物试剂开发有限公司研发部：e-mail: technical@simgen.cn, 电话：400-0099-857。

产品介绍

本产品适合从 3-8 片（面积小于 250 mm²）10 μ m 的组织切片中分离纯化总 RNA。被溶解的动物组织经蛋白酶 K 消化后，游离的 RNA 将结合到纯化柱上，降解的蛋白与 PCR 抑制物则过滤除去，RNA 经 Buffer WBR 洗涤后，用 RNase-free Water 洗脱，即可用于各种分子生物学实验。

用户需自备的试剂与物品

1. 二甲苯、无水乙醇
2. RNase-free 1.5 ml 离心管
3. 移液器及吸头
4. 一次性手套及防护用品和纸巾
5. 台式小量离心机（可配离心 1.5 ml 离心管和 2 ml 离心管的转子）
6. 水浴锅和旋涡振荡器

使用前准备

1. 如果离心机有制冷功能，请将温度设置到 25℃。
2. 将水浴锅温度设置到 56℃ 和 80℃，将 Buffer AT 和 RNase-free Water 温育至 56℃。
注意：当室温低于 15℃ 时，Buffer AT 可能会有沉淀析出，温育后请仔细观察沉淀是否完全溶解，并颠倒混匀后再使用。
3. 根据试剂瓶标签上的指示在 Buffer WBR 中加入无水乙醇，并在标签的方框中打勾做好“乙醇已加”的标记。

操作步骤：

1. 用手术刀切除石蜡组织标本上多余的石蜡块，将组织块切成 5-10 μm 的薄片。

* 如果组织表面暴露在空气中，弃表面的 2-3 层薄片。

* RNA 极易降解，最佳的样本应该是新鲜制作（不超过 24 小时）成的石蜡组织；制作完成超过半年以上的石蜡组织中的 RNA 大部分已经降解成 100-200 nt 的片段，严重影响检测的敏感性。

2. 立即收集 3-8 片组织切片装入一个 RNase-free 1.5 ml 离心管中，加入 1 ml 二甲苯，盖上管盖，剧烈地旋涡振荡 10 秒钟溶解石蜡。

3. 13000 rpm 离心 2 分钟。吸弃上清，保留管底沉淀。

4. 加入 1 ml 无水乙醇，旋涡振荡数秒悬浮沉淀，13000 rpm 离心 2 分钟。

* 乙醇将洗去残留的二甲苯。

5. 吸弃上清，保留管底沉淀。开盖室温放置 10 分钟或直至乙醇挥发干净。

6. 加入 180 μl Buffer AT 和 20 μl 蛋白酶 K 贮存液，旋涡振荡混匀。

7. 56°C 水浴 15 分钟，然后再 80°C 水浴 15 分钟。

* 如果只有一个水浴锅，请将离心管取出室温放置，待水浴锅升至 80°C 再将离心管放入进行水浴。

8. 加入 200 μl Buffer SL，温和地翻转 4-6 次混合均匀。12000 rpm 离心 5 分钟。

9. 将离心上清转移到一个洁净的 RNase-free 1.5 ml 离心管中，加入 660 μl 无水乙醇，温和地翻转 4-6 次混合均匀。低速离心数秒使管盖上的溶液沉降到管底。

10. 吸取 600 μl 步骤 9 中的溶液加入到核酸纯化柱（核酸纯化柱置于 2 ml 收集管中）中，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。

* 注意不要将溶液沾到纯化柱管口的边缘上，以免后续的洗涤步骤不能洗净纯化柱。

11. 弃 2 ml 收集管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 收集管中，重复步骤 10 使剩余的步骤 9 中的溶液全部滤过纯化柱。

* 滤液无须彻底弃尽，如果要避免粘附在收集管管口的滤液对离心机的污染，可将 2 ml 收集管在纸巾上倒扣拍击一次。

12. 弃 2 ml 收集管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 收集管中，在核酸纯化柱中加入 600 μl Buffer WBR，盖上管盖，12000 rpm 离心 30 秒。

* 确认在 Buffer WBR 中已经加入无水乙醇。

13. 重复步骤 12 一次。

14. 弃 2 ml 收集管中的滤液，将核酸纯化柱置回到 2 ml 收集管中，14000 rpm 离心 1 分钟。

* 如果离心机的离心速度达不到 14000 rpm，则用最高速离心 2 分钟。

* 请勿省略该步骤，否则可能因所纯化的核酸中混有乙醇而影响后续的 PCR 效果。

15. 弃 2 ml 收集管，将核酸纯化柱置于一个新的 RNase-free 1.5 ml 收集管中，在纯化柱中加入 50-100 μl 56°C 温育的 RNase-free Water，盖上管盖，室温静置 1 分钟，12000 rpm 离心 30 秒。

* 如果离心机没有防泄漏的盖子，请将离心条件改为 8000 rpm 离心 1 分钟，以免 1.5 ml 离心管管盖脱落而损伤离心机。

16. 弃纯化柱，洗脱的 RNA 可立即用于各种分子生物学实验；或者将 RNA 储存于 -70°C 以下备用。

* 石蜡组织中提取的 RNA 通常混有一定数量降解成小片段的基因组 DNA，如需要彻底除去 DNA，请用 DNase I 消化残留的 DNA。

* 放置半年以上的石蜡组织中的 RNA 降解非常严重，如果用于检测，设计的 RT-PCR 扩增片段长度不应大于 200 bp。