

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 离心管 | 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

1. 蛋白酶 K 贮存液请置于 -20 $^{\circ}$ C 贮存。
2. 其他试剂与物品如果储存于常温 (0~30 $^{\circ}$ C)，可在两年内保持使用性能无明显变化；如果将产品贮存于 2~8 $^{\circ}$ C，可延长产品的有效期至两年以上。

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 抑制剂则过滤除去，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. 台式少量离心机 (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 $^{\circ}$ C。
2. 将水浴锅温度设置到 56 $^{\circ}$ C 和 80 $^{\circ}$ C，将 Buffer AT 和 RNase-free Water 温育至 56 $^{\circ}$ C。
3. 根据试剂瓶标签上的指示在 Buffer WBR 中加入无水乙醇，并在标签的方框中勾选做好“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离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到2 ml离心管中，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，如果要避免粘附在离心管管口的滤液对离心机的污染，可将2 ml离心管在纸巾上倒扣拍击一次。

12. 弃2 ml离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到2 ml离心管中，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离心管中的滤液，将核酸纯化柱置回到2 ml离心管中，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离心管，将核酸纯化柱置于一个RNase-free的1.5 ml离心管中，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扩增片段不应大于200 bp。