

目 录

简 介	2
原 理	2
试剂盒组成	3
保质期	3
方案 1:石蜡包埋样品总 RNA(包括小分子 RNA)标准提取方案	4
方案 2:石蜡包埋样品 miRNA 富集方案	6
常见问题回答	8

版本: 2018-01

简介

HiPure FFPE miRNA Kits 是专门为石蜡包埋组织 miRNA 抽提而设计的。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，整个提取过程只需 60 分钟。纯化的 RNA 可直接用于 RT-PCR、Northern blot、核酸保护和体外翻译等实验。

原理

HiPure 硅胶柱以高结合力的玻璃纤维滤膜为基质。滤膜在高浓度离子化剂(如盐酸胍或异硫氰酸胍)条件下，可通过氢键和静电等物理化学作用吸附核酸，而蛋白质和其它杂质则不被吸附而去除。吸附了核酸的滤膜经洗涤去除残留的蛋白质和盐，最后可以用低盐缓冲液(如 Buffer TE)或水，洗脱出滤膜上吸附的核酸。

保质期

HiPure FFPE miRNA Kits 除 Proteinase K 外，其它组份可在室温下(15-25℃)干燥保存 18 个月。长期保存时需置于 -2-8℃。收到产品后，把 Proteinase K 和 DNase I 保存于 -20℃。

组 成

HiPure FFPE RNA Kit

产品编号	R4313-01	R4313-02	R4313-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure RNA Mini Columns I	20	100	2 x 250
2ml Collection Tubes	20	100	500
Buffer FRL	5 ml	15 ml	60 ml
Buffer FBD	5 ml	15 ml	60 ml
Buffer RWC*	5 ml	10 ml	40 ml
Buffer RW2*	5 ml	20 ml	2 x 50 ml
Protease Dissolve Buffer	1.8 ml	1.8 ml	10 ml
Proteinase K	6 mg	24 mg	110 mg
RNase Free Water	1 ml	10 ml	20 ml
说明书	1	1	1

需要准备材料和工具

- 无水乙醇(96-100%)和异丙醇
- 二甲苯
- 溶解 Proteinase K (20mg/ml): 加入 Protease Dissolve Buffer 溶解 Proteinase K 至终浓度为 20mg/ml。轻轻振荡使之溶解，分装保存于-20℃。
- Buffer RWC 使用前，须按瓶子标签所示用无水乙醇进行稀释。
- Buffer RW2 使用前，须按瓶子标签所示用无水乙醇进行稀释。

方案 1. 石蜡包埋组织总 RNA 抽提(含小分子 RNA)方案

该方案适合于从石蜡包埋组织样品中提取总 RNA，包括小分子 RNA。

1. 用干净刀片去除多余石蜡。把样品切成厚度为 5-20 μ m 的切片。若样品已曝露在空气中，去除表面的 2-3 个切片。
2. **立即转移 1-8 片切片至 1.5ml 离心管。加入 1ml 二甲苯并涡旋 10~30 秒。**
试剂盒一次可最多处理 8 片厚度为 10 μ m，表面积为 250cm² 的石蜡切片。
3. 14,000 \times g 离心 2 分钟。小心吸弃上清液，不要吸到沉淀。
4. **加入 1ml 100%乙醇至样品中。** 涡旋混匀 10-30 秒。14,000 \times g 离心 2 分钟。
5. 小心彻底吸弃上清液，不要吸到沉淀。
6. **打开管盖，室温（15~25 $^{\circ}$ C）或 37 $^{\circ}$ C 干燥 15 分钟彻底去除乙醇。**
充分干燥去除乙醇非常重要。乙醇会影响到 RNA 的抽提效率。
7. **加入 200 μ l Buffer FRL 和 20 μ l Proteinase K 至样品中，** 涡旋重悬样品。
8. 55 $^{\circ}$ C 水浴 15 分钟，然后于 80 $^{\circ}$ C 水浴 15 分钟。
80 $^{\circ}$ C 处理可以逆转被甲醛修饰的核酸。延长会引起 RNA 的降解。
9. **短暂离心，加入 200 μ l Buffer FBD 至样品中，** 涡旋混匀 20 秒。
10. **加入 1000 μ l 无水乙醇至样品中。** 涡旋混匀 20 秒。
11. **把 HiPure RNA Mini Column I 装在 2ml 收集管中。转移一半体积的混合液至柱子中。** 8,000 \times g 离心 30-60 秒。
12. 倒弃流出液，把柱子装在收集管中。转移剩余混合液至柱子中。8,000 \times g 离心 30-60 秒。
13. 倒弃流出液，把柱子装在收集管中。**加入 500 μ l Buffer RWC(已用乙醇稀释)至柱子中。** 8,000 \times g 离心 30-60 秒。
Buffer RWC 在使用之前，必须按瓶子标签所示用异丙醇进行稀释。
14. 倒弃流出液，把柱子装在收集管中。**加入 500 μ l Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中。** 8,000 \times g 离心 30-60 秒。

Buffer RW2 在使用之前，必须按瓶子标签所示用无水乙醇进行稀释。

15. 倒弃流出液，把柱子装在收集管中。**加入 500 μ l Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中。**，8,000 \times g 离心 30-60 秒。
16. 倒弃流出液，把柱子装在收集管中。13,000 \times g 离心空柱 3 分钟，以甩干柱子的基质。
17. 将柱子转移至新的 1.5ml 离心管。**加入 15~30 μ l RNase Free Water 至柱子的膜中央。**静置 2 分钟。13,000 \times g 离心 1 分钟。
18. 弃去柱子，把 RNA 保存于-80 $^{\circ}$ C。

方案 2. 石蜡包埋组织小分子 RNA 富集方案

该方案适合于从各种石蜡包埋组织样品中有效去除大分子 RNA，并富集小分子 RNA。

1. 用干净刀片去除多余石蜡。把样品切成厚度为 5-20 μ m 的切片。若样品已曝露在空气中，去除表面的 2-3 个切片。
2. **立即转移 1-8 片切片至 1.5ml 离心管。加入 1ml 二甲苯并涡旋 10~30 秒。**
试剂盒一次可最多处理 8 片厚度为 10 μ m，表面积为 250cm² 的石蜡切片。
3. 14,000 \times g 离心 2 分钟。小心吸弃上清液，不要吸到沉淀。
4. **加入 1ml 100%乙醇至样品中。** 涡旋混匀 10-30 秒。14,000 \times g 离心 2 分钟。
5. 小心彻底吸弃上清液，不要吸到沉淀。
6. **打开管盖，室温（15~25 $^{\circ}$ C）或 37 $^{\circ}$ C 干燥 15 分钟彻底去除乙醇。**
充分干燥去除乙醇非常重要。乙醇会影响到 RNA 的抽提效率。
7. **加入 200 μ l Buffer FRL 和 20 μ l Proteinase K 至样品中，** 涡旋重悬样品。
8. 55 $^{\circ}$ C 水浴 15 分钟，然后于 80 $^{\circ}$ C 水浴 15 分钟。
80 $^{\circ}$ C 处理可以逆转被甲醛修饰的核酸。延长时间会引起的 RNA 的降解。
9. **短暂离心，加入 200 μ l Buffer FBD 至样品中，** 涡旋混匀 20 秒。
10. **加入 200 μ l 无水乙醇至样品中。** 涡旋混匀 20 秒。
11. **把 HiPure RNA Mini Column I 装在 2ml 收集管中。转移混合液至柱子中。** 8,000 \times g 离心 30-60 秒。弃去 HiPure RNA Mini Column I。
12. **保存滤液，加入 800 μ l 无水乙醇至滤液中，** 吸打混匀 3~5 次。
13. **把 HiPure RNA Mico Column 装在 2ml 收集管中。转移一半体积的混合液至柱子中。** 8,000 \times g 离心 30-60 秒。
14. 倒弃流出液，把柱子装在收集管中。转移剩余混合液至柱子中。8,000 \times g 离心 30-60 秒。
15. 倒弃流出液，把柱子装在收集管中。**加入 500 μ l Buffer RWC(已用乙醇稀释)至柱**

子中。 8,000 × g 离心 30-60 秒。

Buffer RWC 在使用之前，必须按瓶子标签所示用异丙醇进行稀释。

16. 倒弃流出液，把柱子装在收集管中。**加入 500µl Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中。**， 8,000 × g 离心 30-60 秒。

Buffer RW2 在使用之前，必须按瓶子标签所示用无水乙醇进行稀释。

17. 倒弃流出液，把柱子装在收集管中。**加入 500µl Buffer RW2(已用乙醇稀释)至柱子中。**， 8,000 × g 离心 30-60 秒。

18. 倒弃流出液，把柱子装在收集管中。13,000 × g 离心空柱 3 分钟，以甩干柱子的基质。

19. 将柱子转移至新的 1.5ml 离心管。**加入 10~15µl RNase Free Water 至柱子的膜中央。**静置 2 分钟。13,000 × g 离心 1 分钟。

20. 弃去柱子，把 RNA 保存于-80°C。

常见问题回答

该列表可能有利于您解决在提取过程中所碰到的问题。Magen 的技术人员可以随时为您提供咨询服务，若您对试剂盒存在疑问或有良好的建议，又或者您在分子生物学实验中碰到问题，都请您联系我们。我们将竭尽所能为您排忧解难。

现象	原因及解决方法
RNA 产量低	
样品的起始用量太多	参照上面
乙醇残留	脱蜡时，干燥时间不够，有乙醇残留。
切片太厚	石蜡组织切片太厚，不要超过 10 μ m。
石蜡残留	二甲苯去除石蜡不彻底。
RNA 降解	
样品中 RNA 已经降解	石蜡包埋组织 RNA 在固定，包埋及保存过程都会发生降解。
RNA 酶污染	操作过程引入 RNA 酶的污染。
下游实验结果不理想	
盐分污染	加入 Buffer RW2 后，静置 5 分钟后，再离心。
乙醇污染	确保空柱离心速度高于或等于 12,000xg，离心时间为 2 分钟。
膜材料脱落	硅胶膜在离心过程中可能会发生脱落。脱落到质粒中硅胶膜是不溶解的，可能过 12,000xg 离心 2 分钟去除。

若以上的解答还是无法解决您的问题，请您联系我们。