



GenePharma

FFPE总RNA纯化试剂盒

目录

一. 介绍	
背景及原理介绍·····	1
试剂盒规格和组成·····	1
用户自备试剂和设备·····	2
相关产品·····	2
二. 操作步骤	
样品要求·····	3
细胞和组织样品总 RNA 制备·····	3
三. 疑难问题处理	
疑难问题及处理方法·····	6
四. 后续应用	
应用·····	8
相关产品和服务·····	8
五. 附录	
总 RNA 储存·····	9
总 RNA 定量·····	9
总 RNA 质量判定·····	10
技术服务·····	11

一. 介绍

背景及原理介绍

福尔马林固定，石蜡包被（FFPE）组织样品是人们诊断和预测疾病的主要组织来源，也同时用作分子及遗传研究。但是和新鲜组织样品不同，石蜡包埋样品中大多数 DNA 和 RNA 分子在固定时以及长期储存的过程中，降解为小片段，更进一步的是福尔马林诱导的核酸和蛋白交联限制了 DNA 或者 RNA 从被固定的细胞中释放，然而随着技术的发展，现在已经能够从石蜡包埋样品中提取到高质量的 DNA 和 RNA。

DxGene™ FFPE DNA/RNA 抽提试剂盒整合了一系列的方法，包括二甲苯脱蜡，胍盐/苯酚/氯仿抽提和纯化柱。每一步都被优化，从而保证了高得率，高纯度的核酸提取，适用于下游的基因突变检测和基因表达的荧光定量实验以及芯片分析，并且与 DxGene™ Her2 Test Kit, DxGene™ EGFR Test Kit, DxGene™ Beta-actin Test Kit 和 DxGene™ Her2 Duplex Test Kit 等基因检测试剂盒结合使用，为准确定量癌症患者中各指标基因包括的表达情况提供优质的总 RNA 标本。

试剂盒规格

产品目录号	产品名	规格	储存条件
QPG-062	DxGene™ FFPE DNA/RNA Extraction Kit	25 Samples	室温
QPG-063	DxGene™ FFPE DNA/RNA Extraction Kit	50 Samples	室温

试剂盒组成

组分	规格	
	25 Samples	50 Samples
离心纯化柱	25	50
1.5ml 无 RNA 酶离心管	25	50
2.0ml 收集管	25	50
PDB 缓冲液	8.7ml	17.4ml
Ezol™ 裂解液	30ml	60ml
WB1 缓冲液 (浓缩液)	11ml	22ml
WB2 缓冲液 (浓缩液)	9ml	2×9ml
无 RNA 酶洗脱缓冲液	2ml	5ml

用户自备试剂和设备

当接触化学试剂时，请穿好实验服，戴好一次性手套和防护目镜。

试剂类

二甲苯
蛋白酶 K (30mg/ml)
氯仿
95%~100%乙醇。
无 RNA 酶水/DEPC 水

设备和耗材类

一次性手套
无 RNA 酶，灭菌的枪头。
无 RNA 酶的 1.5ml 和 2ml 离心管
能进行室温和 4℃离心的台式离心机

相关产品

我们也同时提供 DxGene™ Total RNA Quantitation Kit, DxGene™ Her2 Test Kit, DxGene™ EGFR Test Kit, DxGene™ Beta-actin Test Kit 和 DxGene™ Her2 Duplex Test Kit 等配套使用的试剂盒，详情请联系我们。

目录号	名称	规格
QPG-070	DxGene™ Total RNA Quantitation Kit	20 rxns
QPG-080	DxGene™ Her2 Test Kit	100rxns
QPG-081	DxGene™ EGFR Test Kit	100rxns
QPG-082	DxGene™ Beta-actin Test Kit	100rxns
QPG-083	DxGene™ Her2 Duplex Test Kit	100rxns

二. 操作步骤

样品类型需求

DxGene™ FFPE DNA/RNA 抽提试剂盒是被开发和优化用来从石蜡包被样品中进行 DNA 或是 RNA 的提取，如果是新鲜的组织样品或者细胞样品，请选择 DxGene™ Tissue and Cell line Total RNA Extraction Kit。

实验流程

1. 切下 5 片厚度约为 10 μ m（重约 10mg）的组织块，尽量切去石蜡部分，置于 1.5ml 的离心管中。
注意：该实验流程只适用于在 **10mg** 左右的组织样品中抽提总 **RNA**，样品不宜过多，否则消化组织是非常困难的。
 2. 加入 1ml 二甲苯，并振荡 30s，然后室温放置 5 分钟。
 3. 20 $^{\circ}$ C，14000 x g 离心 3 min，用移液器移尽上清，并加入 1ml 100%乙醇。
 4. 振荡离心管 20s，然后 20 $^{\circ}$ C，14000 x g 离心 3 min。
 5. 用移液器移去上清，室温干燥组织沉淀 15 min。
注意：任何残留的乙醇可能会影响蛋白酶 **K** 的消化以及减少核酸的得率。
 6. 加入 290 μ l 的 PDB 缓冲液重悬沉淀，并加入 10 μ l 蛋白酶 K（30mg/ml）溶液，振荡混匀。
 7. 将离心管置于 50 $^{\circ}$ C 温浴 3 hours，然后置于 70 $^{\circ}$ C 20 min。
 8. 向离心管中加入 1 ml Ezol™ 试剂，振荡混匀 30s。
 9. 将离心管置于室温 5 min 后，加入 0.2ml 氯仿，小心盖上盖子，剧烈摇动 15s。
注意：不要振荡管子，从而造成 **DNA** 对 **RNA** 的污染。
-

10. 将离心管置于室温 2-3min, 4°C, 12000xg 离心 15min。
注意：离心会使溶液分为三相，含有 **RNA** 的水相上清液，包含蛋白和 **DNA** 的中层以及包含 **DNA** 的下层有机相。在 4°C 离心对于溶液的分层是非常关键的。
 11. 对于 RNA 抽提，请将上清转移至一新的 1.5ml 离心管中，加入等体积 70%乙醇，振荡混合该溶液，并接第 13 步。
 12. 对于 DNA 抽提，在完全移走上清以后，向中层和有机相中加入 300μl 100%乙醇，振荡混合均匀，并接下一步。
 13. 立即吸取 700μl 样品以及有可能形成的沉淀，加入带有 2ml 收集管的 mini-spin 离心柱。轻盖盖子，8,000 x g，室温离心 15 s，弃尽流穿液。
 14. 将剩余的样品转移至离心柱，重复第 13 步。
 15. 向离心柱中加入 700 μl WB1，轻盖盖子，8,000 x g，室温离心 15 s，弃尽流穿液。
注意：第一次使用前请确认是否已经往 **WB1** 中加入适量乙醇。
 16. 向离心柱中加入 700 μl WB2，轻盖盖子，8,000 x g，室温离心 15 s，弃尽流穿液。
注意：第一次使用前请确认是否已经往 **WB2** 中加入适量乙醇。
 17. 重复第 16 步，用 500 μl WB2 再次洗涤纯化柱。最后一次洗涤后，8,000 x g 离心空心柱 2 min 干燥硅胶膜。
注意：完全去除洗液对最后溶解是非常重要的，洗液的残留会影响最终的洗脱。
 18. 将离心柱转移至一新的无 RNA 酶的 1.5ml 离心管中，向硅胶膜中央滴加 40μl 无核酸酶水，轻盖管盖，室温静置 1-5 min，8,000 x g 离心 1 min 洗脱 RNA。
-

19. 把洗脱液滴加回硅胶膜重复第 18 步 洗 脱 。
20. 始终将溶解的 RNA 至于冰上，然后于-70℃保存。

三. 疑难问题处理

本试剂盒经过精心的包装并含有高质量的试剂，这部分疑难问题处理主要提供了针对组织样品操作问题的常规指导。也许您还会遇到其他的问题，届时我们也非常欢迎您来和我们的技术服务人员进行探讨。

液相没有完全分开

混匀和匀浆不充分

通常此类问题是由于加了氯仿之后不充分的混匀以及随后在比较高的温度下离心引起。正如实验操作流程中第 3 和第 4 步所述，在加入氯仿后必须剧烈摇动混匀至少 15s，并且随后在 4℃ 或者不高于 8℃ 的温度下离心，较高的离心温度会破坏溶液分层。

纯化柱堵塞

匀浆不充分

不充分的匀浆可能导致大块组织残留堵塞纯化柱，必要时请增加离心场和离心时间。

起始样品太多

起始组织样品不宜超过 100mg，必要时请减少样品用量。

RNA 降解

样品或素材保存环境太差

状态不好，或者经过某些药物处理如福尔马林固定和石蜡包被（FFPE）的细胞或组织中的 RNA 有可能会发生自发的降解，请将标本存放于 -80℃ 或者液氮中。如果能加入一些商业化的 RNA 酶抑制剂（如 RNA Later），效果会更好。

样品采集

在采集到组织标本后最快的使 RNA 酶丧失活性对防止 RNA 降解是至关重要的。另外，请尽量缩短处死到取样的时间，这样才能保证高纯度 RNA 的高得率。

裂解前样品操作

在把组织样品投入裂解液前，请保持冷冻的状态，在样品解冻之前，尽快将其投入含 RNA 酶抑制剂的裂解液中，然后立即匀浆。

离心条件

加入氯仿之后的离心请务必在 4℃。

电泳图显示降解

如果在电泳时总 RNA 上样超过 5 μ g，单一泳道中的总 RNA 条带就会出现弥散和拖尾现象。一般电泳时总 RNA 的上样量为 700ng 至 800ng 左右。

外源 RNA 酶的污染

在抽提总 RNA 的过程中，务必防止外源核酸酶的污染，整个过程始终需戴手套，并且经常更换以防止“手指残留 RNA 酶”污染。研钵和研杵必须在 180 $^{\circ}$ C 下烘烤过夜，以除去残留的 RNA 酶。所有的离心管和吸头必须用 DEPC 水浸泡并高压灭菌后方可使用。

RNA 降解是由于核糖核酸酶 (RNase) 造成，这是一种非常稳定和高活性的酶，尽管试剂盒中提供的耗材和试剂都是无 RNA 酶的，但是 RNA 酶会存在于整个工作环境中，比如双手，实验工作台和其他设备，因此很显然，RNA 样品可能在抽提中或者之后的保存过程中污染到 RNA 酶，所以我们提出如下预防措施：**1).** 请使用无 RNA 酶和一次性的用品。**2).** 用含 RNA 酶抑制剂的溶液来清洁工作台面以及相关设备。**3).** 操作试剂和 RNA 时请带上乳胶手套。**4).** 尽快的采集组织样品，避免组织样品接触到任何表面。**5).** 在进行下游操作分析时，请始终把 RNA 样品置于冰上。**6).** 将 RNA 样品分装后储存于 -70 $^{\circ}$ C，减少操作中反复冻融。**7).** 使用去垢剂溶液清洁电泳槽，在电泳时请用 DEPC 水防止 RNA 降解。**8).** 请用试剂盒中提供的无 RNA 酶水稀释 RNA 样品。

低得率

RNA 的得率的变化是非常普遍的现象，但是 RNA 极端的低得率可能由于抽提的失败而导致。很多因素会降低 RNA 的得率，例如低质量的组织样品，不充分的匀浆以及低效的洗脱。因此，选取高质量的组织样品并进行合理的操作是非常重要的，在 Ezol 中充分的匀浆组织对于 RNA 的获得也是必要的，另外在一些情况下，RNA 的低得率是因为低效的洗脱，适当的延长洗脱时的孵育溶解时间有助于提高 RNA 的得率。

A₂₆₀/A₂₈₀ 比值偏低

通常，A₂₆₀/A₂₈₀ 比值偏低是由于在水中测量吸收值，或者是由于酚和其他有机药品的污染造成。在一般情况下，分离出的 RNA 应该不含酚和其他有机药品。另外，不充分的匀浆可能导致蛋白和核酸的共纯化，从而使 280nm 处的吸收值增大。我们推荐您按照手册中的标准流程消化和匀浆组织样品，另一方面，我们也推荐您在 10mM 的 Tris-HCl 溶液中测量 RNA 的 A₂₆₀/A₂₈₀ 比值。

四. 后续应用

应用

抽提纯化得到的总 RNA 能应用于多种您所需要的后续实验，如 northern blotting 和 Real-time PCR，同时高纯度高质量的总 RNA 能给您提供更加稳定放心的实验结果，除此之外，本试剂盒还能保留小片段 RNA，如 microRNA，也可提供您微小 RNA 的研究使用。

相关产品和服务

为了得到稳定的基因检测结果，本试剂盒同时和 DxGene™ Total RNA Quantitation Kit, DxGene™ Her2 Test Kit, DxGene™ EGFR Test Kit，DxGene™ Beta-actin Test Kit 和 DxGene™ Her2 Duplex Test Kit 共同出售，可以为研究者提供从抽提，定量到检测一整套便利的服务。吉玛的技术人员总是乐意回答您所遇到的任何问题，无论是操作步骤还是技术上的问题，我们都将给与最大的支持。请看我们的附录来获取更多联系信息。

五. 附录

总 RNA 储存

RNA 应溶解于无 RNA 酶的水里，一般没有必要额外添加其他试剂，如 RNA 酶抑制剂或者 RNA 稳定剂。洗脱的 RNA 可以储存于-70 °C 或者 -20 °C，如果长期保存，我们推荐在-70 °C。在这种低温环境下，3 年后也并未观察到 RNA 有显著的降解。为了防止由于反复冻融而造成的 RNA 降解，请分装后储存。

总 RNA 定量

本试剂盒所抽提的 RNA 基本上没有任何有机药品的污染，因此非常适合用紫外分光光度计进行定量。RNA 的浓度可以在一个石英或者紫外适用的比色皿中通过测量 260nm 处的吸收值来计算得到，260nm 处一个单位的吸收值等于 40 µg/ml 的 RNA，这种计算关系只适用于在水中定量分析，因此 RNA 必须用无 RNA 酶水溶解，稀释和测量，同时为了最大限度减少差异，样品的吸收值应控制在 0.1-1.0 之间。然而，由于抽提得到 RNA 的量较少，因此我们推荐使用超微量的比色皿，只需要消耗常规比色皿的十分之一的 RNA 就能进行测量。适用于紫外测量的比色皿您可以从几个生物公司购得：例如 BrandTech Scientific (www.brandtech.com) 和 Santa Cruz Biotechnology (www.scbt.com)。在测量之前，我们推荐先用 RNA 标准溶液校正紫外分光光度计，RNA 标准溶液可另行购买。

实例：用常规比色皿测量 RNA 浓度。

RNA 样品总体积：50 µl

稀释因子，1:100 (10 µl RNA 样品+990 µl 无 RNA 酶高压灭菌水)

A₂₆₀ 读值：0.20 (在 1ml 比色皿中测量)

因此，RNA 样品浓度 = 40 × A₂₆₀ × 稀释因子 = 40 × 0.20 × 100 = 800 µg/ml

RNA 样品的得率 = 800 × 0.05 = 40 µg

实例：用超微量比色皿测量 RNA 浓度。

RNA 样品总体积：50 µl

稀释因子，1:100 (1 µl RNA 样品+99 µl 无 RNA 酶高压灭菌水)

A₂₆₀ 读值：0.20 (在超微比色皿中测量)

因此，RNA 样品浓度 = 40 × A₂₆₀ × 稀释因子 = 40 × 0.20 × 100 = 800 µg/ml

RNA 样品的得率 = 800 × 0.05 = 40 µg

用户可以选择其他方法，比如 RiboGreen 法 (Invitrogen) 或者 NanoDrop 设备 (Thermo Scientific) 来测量本试剂盒抽提出来的 RNA 的浓度，应该能获得和紫外分光光度计一致的结果。但是用户们必须于测量样品之前在 RiboGreen 法中先建立一条标准曲线，或者先用 RNA 标准品校正 Nanodrop。如果用户采用其他方法来测量 RNA 浓度，我们建议用户严格按照该厂商的使用手册进行操作。

总 RNA 质量的判定

完整性

本试剂盒提取的 RNA 的大小和完整性可以用变性胶电泳或者 Bioanalyzer 来鉴定。通常经过溴乙锭染色后，胶上会呈现出两条锐利的条带，它们分别是 18s 和 28s 核糖体 RNA。一个具有良好完整性的 RNA 样品，28s 和 18s 的强度比应接近 2:1，Bioanalyzer 能提供更准确的完整性信息。

注意：由于配套的 *DxGene™* 荧光定量检测试剂盒是设计用来扩增短于 100 个核苷酸的 *mRNA* 片段，因此即使完整性有少许不合格的样品也会给最终的检测结果造成细微的影响。

纯度

本试剂盒将传统的胍盐/酚/氯仿法和纯化柱相整合，在试剂盒所述的步骤和环境下能分离出高质量的 RNA，因此，我们不推荐您检测 RNA 的纯度，然而由于某些原因，用户想证明其纯度，这样的话用 A_{260}/A_{280} 的吸收比值可以对 RNA 的纯度作大概评价。通常来说，高纯度 RNA 样品的 A_{260}/A_{280} 应在 1.9~2.1 之间，然而该吸收比值容易受 PH 变化的影响，因为水不是缓冲体系，因此在水中测量的 A_{260}/A_{280} 会略低于在缓冲液中测量的结果，并且结果之间会有很大的差异，结果可能导致一些误解，例如样品是否被蛋白，酚或者其他有机试剂污染，因为这些污染都在 280nm 处有高吸收值。所以，为了结果的准确性，我们推荐您在 10 mM Tri-HCl (pH 7.5) 的缓冲体系中测量，并用相同的缓冲液校准紫外分光光度计。

注意：

1. RNA 浓度必须在水中测量，因为吸收值和 RNA 浓度之间的换算关系取决于 RNA 在水中的消光系数。
 2. 本试剂盒已经过优化来防止 DNA 污染，我们的测试结果表明不需要再额外添加 DNA 酶。用本试剂盒分离的 RNA 完全适用于配套的 *DxGene™* 荧光定量检测试剂盒，其中引物和探针都是针对目标 *mRNA* 特异设计的。同时也请您在检测实验时引入 “no RT” 对照来监控 DNA 可能的干扰。
-

技术服务

万维网

您可以用您的网页浏览器访问我们的网站，您可以得到以下信息：

- 查找相应产品的货号
- 了解我们的新产品
- 咨询产品和相应的文章

吉玛网址 www.genepharma.com

联系我们

如果您想获取更多的技术支持，请致电，写信，电子邮件或是传真。

公司总部：

中国上海张江高科技园区哈雷路1011号

电话：86-21-51320195

传真：86-21-51320295

电子邮件：service@genepharma.com