

EZ-press RNA Purification Kit for FFPE Tissue

说明书

Cat. No.: EZB-RNF01

一、产品简介

本产品适用于从福尔马林固定的石蜡包埋组织（FFPE）中分离纯化总 RNA。脱蜡过程可选择使用二甲苯，或使用本试剂盒提供无毒性的脱蜡试剂（Buffer RW）。使用本产品提取的 RNA 完整性好，纯度高，可用于多种下游应用，如 RT-PCR、qRT-PCR 等实验。

二、产品组分

组分	货号（规格）	EZB-RNF01 (50 Preps)
Buffer RW		55 ml
Buffer RL1		8 ml
Buffer RL2		12 ml
Proteinase K		300 µl
gDNA Remover		120 µl
Buffer W1*1		6 ml
Buffer W2*1		6 ml
Buffer E		3 ml
Spin Columns for RNA (with Collection Tubes)		50 Preps

注：*1: Buffer W1 和 Buffer W2 首次使用前需加入瓶身标签所示体积的无水乙醇并充分混匀，并做好标记（Buffer W1 和 Buffer W2 与无水乙醇的体积比为 1:4）。

Buffer RW: 去除样本中石蜡；Buffer RL1: 悬浮样本并裂解组织细胞；Buffer RL2: 提供 RNA 上柱缓冲环境；Proteinase K: 酶解组织样本；gDNA Remover: 去除基因组 DNA；Buffer W1: 去除 RNA 中的蛋白；Buffer W2: 去除 RNA 中的盐离子；Buffer E: 洗脱离心柱上的 RNA；Spin Columns for RNA (with Collection Tubes): 吸附 RNA。

三、保存条件

Proteinase K 和 gDNA Remover 务必保存在 -20°C，其余组分置于 4°C 保存，可稳定保存 18 个月。过期日期详见产品标签中有效期信息。若溶液产生沉淀，使用前应将试剂盒内的溶液在室温放置一段时间，也可在 56°C 水浴中预热 10 min，以溶解沉淀。

四、注意事项

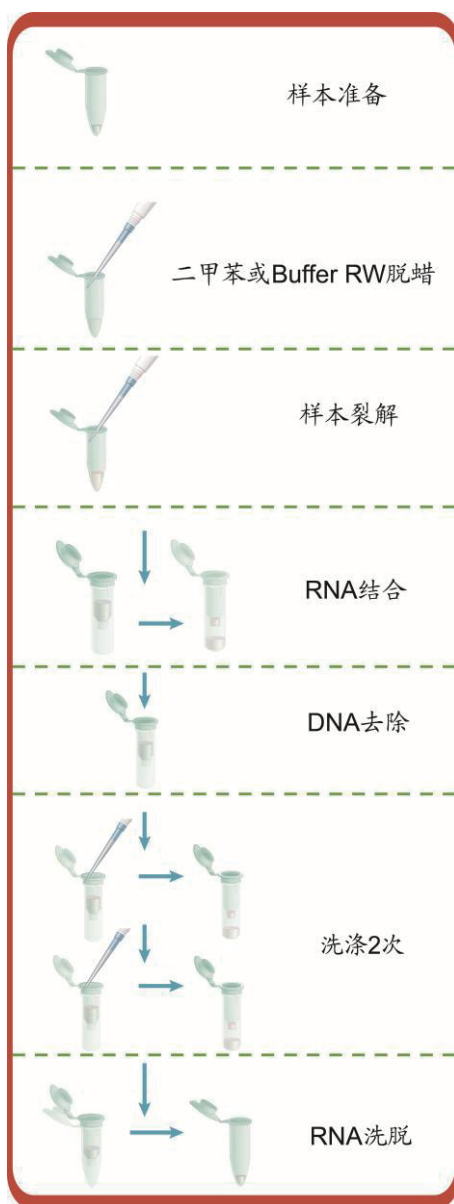
1. 使用本试剂盒前，请务必仔细阅读本指南，以确保操作正确。
2. Buffer W1 和 Buffer W2 首次使用前需加入瓶身标签所示体积的无水乙醇并充分混匀后才可使用，并做好标记（Buffer W1 和 Buffer W2 与无水乙醇的体积比为 1:4）。
3. Proteinase K 和 gDNA Remover 建议分装保存于 -20°C，反复冻融会影响其活性。
4. 提前将金属浴或水浴锅预热到 56°C、60°C 和 90°C。

5. 建议使用前把洗脱液 Buffer E 分装为 3 ~ 4 份，以减小污染的概率；且可以取 1 份提前预热到 60°C。
6. RNA 洗脱时一定要将洗脱液 Buffer E 加到柱中央的膜上（如果洗脱液加到侧壁上，会导致 RNA 没有被溶解而使产量大大减少），同时注意避免移液器枪尖将膜刺破。

五、自备材料

金属浴或水浴锅，无水乙醇、二甲苯等。

六、实验流程



七、操作步骤

1. 样本准备
 - a. **石蜡切片**: 取石蜡切片 (5 ~ 10 μm 厚, 1×1 cm^2 大小) 5 ~ 8 张。
 - b. **石蜡块**: 手术刀刮取不超过 20 mg 的组织样本 (尽量去除多余的石蜡, 如果样品表面暴露于空气中, 最初刮取的 2 ~ 3 片弃去不用)。
2. 脱蜡处理
 - a. **二甲苯脱蜡**【优先建议使用二甲苯脱蜡, 所需的脱蜡时间更短 (须在通风橱中操作)】: 将上述样本放入 1.5 ml EP 管中, 加入 1 ml 二甲苯, 剧烈涡旋 10 sec 至样品完全脱蜡, 瞬时离心将管壁上的液体离心至管底。
 - b. **Buffer RW 脱蜡**: 将上述样本放入 1.5 ml EP 管中, 加入 1 ml Buffer RW, 剧烈涡旋 10 sec, 瞬时离心将管壁上的液体离心至管底, 56°C 加热 5 ~ 20 min (中间需涡旋 3 次), 直到样品完全脱蜡。
3. 充分脱蜡后, 15000 g 离心 2 min, 吸弃上清。
4. 加入 1 ml 无水乙醇, 剧烈涡旋 10 sec, 15000 g 离心 2min, 吸弃上清。
5. 重复步骤 4 一次。
6. 开盖室温或者 37°C 晾干 20 min【期间上下颠倒几次, 晾干时间可延长, 直至乙醇挥发干净 (用 Buffer RW 脱蜡的晾干时间较二甲苯要长, 需多于 20 min)】。
7. 向样品中加入 150 μl 的 Buffer RL1 和 5 μl 的 Proteinase K, 涡旋 10 sec 混匀。
8. 将样品置于 56°C 金属浴或水浴锅加热 1 h (期间颠倒混匀 3 次)。
9. 将样品置于 90°C 金属浴或水浴锅加热 1 h (注意: 金属浴或水浴需要提前预热到 56°C 和 90°C, 不要加入样品后再升温; 如果没有提前预热, 可先将样品保存在室温, 等金属浴温度达到预定温度后再加热处理)。
10. 加热完毕后, 瞬时离心将管壁上的液体离心至管底, 加入 200 μl 的 Buffer RL2 (该组分如有沉淀, 需提前在 56°C 水浴中预热 10 min, 以充分溶解沉淀), 涡旋 10 sec 混匀, 室温静置 5 min。
11. 15000 g 离心 2 min (离心时间可延长, 直至上部液体澄清), 取 300 μl 上清至新的 1.5 ml Nuclease-Free 的离心管中, 并加入等体积 300 μl 无水乙醇, 充分混匀后 (如果出现絮状沉淀, 需将沉淀吹打至看不见为止), 转移至 RNA 离心柱, 12000 g 离心 1 min, 弃去收集管中的废液, 将离心柱放回收集管中。
12. **可选操作**: 按照每个样品 2 μl gDNA Remover + 18 μl ddH₂O 的比例, 配制 DNA 酶消化液, 可多配一份, 混匀后每个样品取 20 μl 加入离心柱中央的膜上, 室温静置 5 min, 不要离心。
13. 向离心柱中加入 500 μl Buffer W1 (使用前请先检查是否已加入相应体积无水乙醇), 12000 g 离心 1 min, 弃废液, 将离心柱放回收集管中。
14. 向离心柱中加入 500 μl Buffer W2 (使用前请先检查是否已加入相应体积无水乙醇), 12000 g 离心 1 min, 弃废液, 将离心柱放回收集管中。
15. 空柱 12000 g 离心 1min, 将离心柱转移到新的 1.5 ml Nuclease-Free 离心管中, 并开盖晾干 2 min。
16. 向离心柱中央的膜上加 30 ~ 50 μl 提前预热到 60°C 的 Buffer E, 静置 2 min 后, 12000 g 离心 1 min 洗脱, 得到的 RNA 保存于 -80°C。

八、常见问题与解决方法

常见问题	可能的原因	解决方法
洗脱后的样品中未检测到 RNA 或者浓度很低	样本量过少	应严格按照说明书推荐的样本量进行提取 RNA 实验。
	样本保存时间过长或处理不当	FFPE 样本由于保存环境以及时间的不同,提取出来的 RNA 会发生不同程度的降解,建议使用新鲜样品重复实验,包埋前确保样品完全脱水。
	Buffer W1 和 Buffer W2 首次使用前未加入相应体积无水乙醇	上述两种试剂需提前加相应体积无水乙醇,另外,其余操作步骤需要使用无水乙醇的地方,请勿使用含有其他物质的变性酒精,如甲醇等。
	添加洗脱液前过度干燥吸附柱	干燥离心柱时应严格按照说明书推荐时间,最长干燥时间不能超过 5 min,否则容易造成 RNA 洗脱困难。
	洗脱不充分	洗脱液过少或者洗脱液未加在柱中央都能造成洗脱不充分,从而导致 RNA 浓度过低。洗脱液体积至少 30 μ l 且必须加在柱中央。可以提前预热洗脱液或者重复洗脱以达到提高 RNA 产量的目的
RNA 纯度低	蛋白残留严重	加入 Buffer RL2 后离心取上清时,确定没有吸到沉淀;使用 Buffer W1 洗涤时,确定试剂量及离心速度准确。
	盐离子残留严重	使用 Buffer W2 洗涤时,确定试剂量及离心速度准确,此步骤可重复一次。
	乙醇残留严重	确定 Buffer W2 洗涤后有做空柱离心和室温开盖晾干 2 min 这些步骤。
离心柱堵塞	样本量过多	建议不要超过 20 mg 的组织样本。
	脱蜡不充分	样本前处理时,没有刮去多余的石蜡,需改进。可改用二甲苯进行脱蜡,所需的时间更短,或增加 Buffer RW 的使用量、重复脱蜡操作步骤及延长脱蜡处理的时间,以彻底去除样本中的石蜡。