

Version: AC 6.0 (2024.02.22修订)

# SPARKeasy FFPE RNA Kit

## 固定包埋组织RNA快速提取试剂盒

(离心柱型)

目录号: AC1101

### 01/产品组分

序号	组分	50 次 AC1101
1	裂解液 PKD	15 mL
2	结合液 RBC	25 mL
3	漂洗液 RW	10 mL 第一次使用前加入 42 mL 无水乙醇
4	蛋白酶 K 溶液 (20 mg/mL)	1 mL
5	RNase Free H <sub>2</sub> O	10 mL
6	基因组 DNA 清除柱和收集管	50 套
7	RNA 吸附柱 RA 和收集管	50 套
8	RNase-Free 收集管 (1.5 mL)	50 个

### 02/保存条件

蛋白酶K于-20 °C保存, 其他组分室温 (15-25 °C) 保存。

### 03/产品概述

本试剂盒设计用于快速从福尔马林固定、石蜡包埋组织样品中提取总 RNA。独特的裂解液/蛋白酶 K 迅速裂解细胞释放出 RNA, 然后裂解混合物通过基因组 DNA 清除柱, 基因组 DNA 被清除而 RNA 穿透滤过。滤过的 RNA 用乙醇调节结合条件后, RNA 在高离子盐状态下选择性吸附于离心柱内硅基质膜, 再通过一系列快速漂洗的步骤将细胞代谢物等杂质去除, 最后低盐的 RNase Free H<sub>2</sub>O 将纯净 RNA 从硅基质膜上洗脱。得到的 RNA 可用于反转录 PCR、荧光定量 PCR 等实验。该产品可在 70 min 内完成样品 RNA 的提取, 提取的总 RNA 完整性好, 无蛋白和基因组 DNA 污染。

## 04/自备材料

二甲苯、无水乙醇

## 05/注意事项

### 请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项

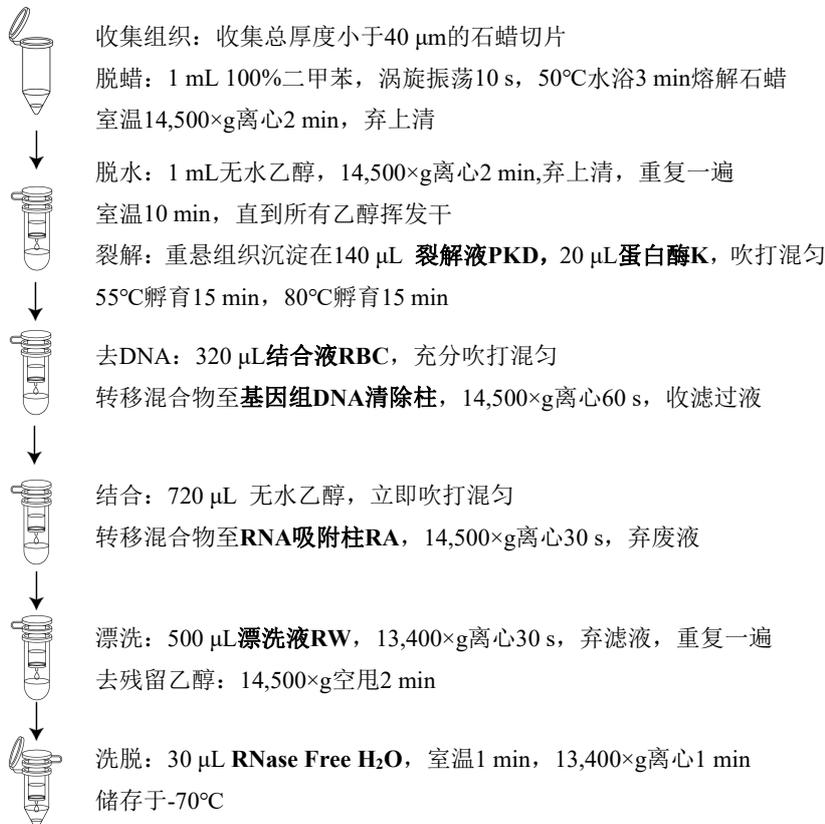
- ◇ 样品处理量绝对不要超过基因组 DNA 清除柱和 RNA 吸附柱 RA 处理能力，否则造成 DNA 残留或者产量降低。不同组织细胞种类 RNA/DNA 相差极大，例如胸腺脾脏 DNA 含量丰富，超过 5 mg 就会超过吸附柱处理能力。COS 细胞 RNA 含量丰富，超过  $3 \times 10^6$  细胞就会超过吸附柱吸附能力。所以开始摸索实验条件时，如果不清楚样品 DNA/RNA 含量时宁可使用较少的样品处理量，如不超过 2 个 10  $\mu\text{m}$  厚度石蜡切片，再根据样品试验情况增加或者减少处理量。
- ◇ 裂解液 PKD、结合液 RBC 中含有刺激性化合物，操作时要戴乳胶手套，避免沾染皮肤，眼睛和衣服。若沾染皮肤、眼睛时，要用大量清水或者生理盐水冲洗。
- ◇ 所有离心操作步骤，均在室温（15-25  $^{\circ}\text{C}$ ）下进行。

## 06/使用方案

1. 修整去除过量包埋组织外石蜡，并切片成 5-20  $\mu\text{m}$  厚切片（开始的 2-3 片抛弃不用）。
2. 收集总厚度不超过 ■40  $\mu\text{m}$  的石蜡切片到一个 1.5-2 mL 离心管（例如 2 片 20  $\mu\text{m}$ 、4 片 10  $\mu\text{m}$ 、8 片 5  $\mu\text{m}$  的石蜡切片），或者不超过 ▲80  $\mu\text{m}$  的石蜡切片到一个 2 mL 离心管。  
■代表处理切片总厚度 $\leq 40 \mu\text{m}$ ，▲代表处理切片总厚度 $\leq 80 \mu\text{m}$
3. 加入 1 mL 100%二甲苯，涡旋振荡 10 s。瞬间离心把组织全部浸入到二甲苯。
4. 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 3 min 溶解石蜡，室温 12,500 rpm（14,500 $\times g$ ）离心 2 min，收集组织到管底。
5. 小心用移液器吸弃上清二甲苯，注意不要吸到沉淀。
6. 加入 1 mL 无水乙醇，涡旋振荡，12,500 rpm（14,500 $\times g$ ）离心 2 min，小心吸弃上清乙醇。
7. 加入 1 mL 无水乙醇，重复步骤 6 一遍，尽可能吸弃所有乙醇。
8. 室温或者 37 $^{\circ}\text{C}$ 晾干乙醇 10 min 或直到所有乙醇挥发干。  
▲乙醇完全晾干非常重要，微量的乙醇残留也会导致 RNA 产量降低。
9. 重悬吹打或者涡旋振荡充分重悬组织沉淀在 ■140  $\mu\text{L}$  ▲230  $\mu\text{L}$  裂解液 PKD 中，短暂离心收集液体到管底，加 20  $\mu\text{L}$  蛋白酶 K，吹打混匀。
10. 55 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min，然后 80 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min。  
▲55 $^{\circ}\text{C}$ 孵育后，可以将离心管取出放置在室温，等水浴锅温度升到 80  $^{\circ}\text{C}$ 后再放入水浴锅，精确的孵育 15 min。即使 2 min 的延长也可能导致 RNA 的部分降解。
11. 加入 ■320  $\mu\text{L}$  ▲500  $\mu\text{L}$  结合液 RBC，充分吹打混匀调节结合条件。

12. 立刻将混合物加入一个基因组 DNA 清除柱中（清除柱放入收集管中），12,500 rpm（14,500×g）离心 60 s，保留滤过液（RNA 在滤过液中）。
  - ▲应避免吸到可能的较大的未消化完全的絮团物质上清除柱，以免堵塞。
13. 加入 720 μL 无水乙醇到滤过液中，立即吹打混匀，不要离心。
14. 立刻将混合物（每次小于 700 μL，多可以分多次加入）加入一个 RNA 吸附柱 RA 中（吸附柱放入收集管中），12,500 rpm（14,500×g）离心 30 s，弃掉废液。
15. 加入 500 μL 漂洗液 RW（请先检查是否已加入无水乙醇！），12,000 rpm（13,400×g）离心 30 s，弃掉废液。加入 500 μL 漂洗液 RW，重复一遍。
16. 将吸附柱 RA 放回空收集管中，12,500 rpm（14,500×g）离心 2 min，尽量除去漂洗液，以免漂洗液中残留乙醇抑制下游反应。
17. 取出吸附柱 RA，放入一个 RNase Free 离心管中，根据预期 RNA 产量在吸附膜的中间部位加 30 μL RNase Free H<sub>2</sub>O（事先在 70-90°C 水浴中加热可提高产量），室温放置 1 min，12,000 rpm（13,400×g）离心 1 min。
  - ▲洗脱体积越大，洗脱效率越高，如果需要 RNA 浓度较高，可以适当减少洗脱体积，如果需要 RNA 浓度高，可以将洗脱液放回吸附柱 RA，再洗脱一遍。

## 07/流程简图



## 08/相关产品

AA1602 SPARKeasy 固定包埋组织DNA快速提取试剂盒（含蛋白酶K）

AA1907 蛋白酶K（20 mg/mL）

AG0304 SPARKscript II RT Plus Kit（With gDNA Eraser）

AG0305 SPARKscript II All-in-one RT SuperMix for qPCR（With gDNA Eraser）

AH0104 2×SYBR Green qPCR Mix（With ROX）

本产品仅用于科学研究！

Tel: 0531-82387577

Web: <http://www.sparkjade.com>

Support: [support@sparkjade.com](mailto:support@sparkjade.com)

