

Version: AC 6.0 (2024.02.22修订)

# SPARKeasy FFPE microRNA Kit

## 固定包埋组织microRNA快速提取试剂盒

### (离心柱型)

目录号: AC1506

## 01/产品组分

| 序号 | 组分                          | 50 次<br>AC1506               |
|----|-----------------------------|------------------------------|
| 1  | 裂解液 PKD                     | 15 mL                        |
| 2  | 结合液 RBC                     | 25 mL                        |
| 3  | 漂洗液 RW                      | 10 mL<br>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溶液于-20℃保存。其他组分室温（15-25℃）保存。

## 03/产品概述

本试剂盒用于快速从福尔马林固定、石蜡包埋组织样品中提取包括 microRNA 的 RNA。独特的裂解液/蛋白酶 K 能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，在高离序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 吸附柱 DA 和 RNA 吸附柱 RA 的处理能力，否则会造成 DNA 残留或产量降低。不同的组织细胞 RNA/DNA 相差极大，例如胸腺、脾脏 DNA 含量丰富，超过 5 mg 就会超过柱子处理能力。COS 细胞 RNA 含量丰富，超过  $3 \times 10^6$  个细胞就会超过吸附柱吸附能力。因此，若不清楚样品的 DNA/RNA 含量，可使用较少的样品处理量，如不超过 2 个  $10 \mu\text{m}$  厚度的石蜡切片，再根据实验情况增加或减少样品量。
- ◇ 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，要用大量清水或生理盐水冲洗。
- ◇ 避免试剂长时间暴露于空气中产生挥发、氧化、pH 值变化，各溶液使用后应及时盖紧盖子。
- ◇ 所有离心操作步骤，均可在室温（15-25°C）下进行。

## 06/使用方案

1. 修整去除过量包埋组织外的石蜡，并切片成 10-20  $\mu\text{m}$  厚切片。

▲切片厚度必须 $\geq 10 \mu\text{m}$ ，太薄会切碎细胞，造成脱蜡过程中 microRNA 丢失。

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  $\mu\text{m}$  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。瞬时离心把组织全部浸入到二甲苯中。

4. 50°C水浴 3 min 溶解石蜡，室温 12,500 rpm（14,500×g）离心 2 min，收集组织到管底。

5. 用移液器吸弃上清，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×g）离心 2 min，吸弃上清。重复此步骤。

7. 室温或 37°C 10 min 晾干乙醇。

▲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。

8. 吹打或涡旋振荡，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。

9. 55°C 孵育 15 min，然后 80°C 孵育 15 min。

▲55°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°C 后再放入水浴锅，精确孵育 15 min。即使 2 min 的延长也可能导致 RNA 的部分降解。

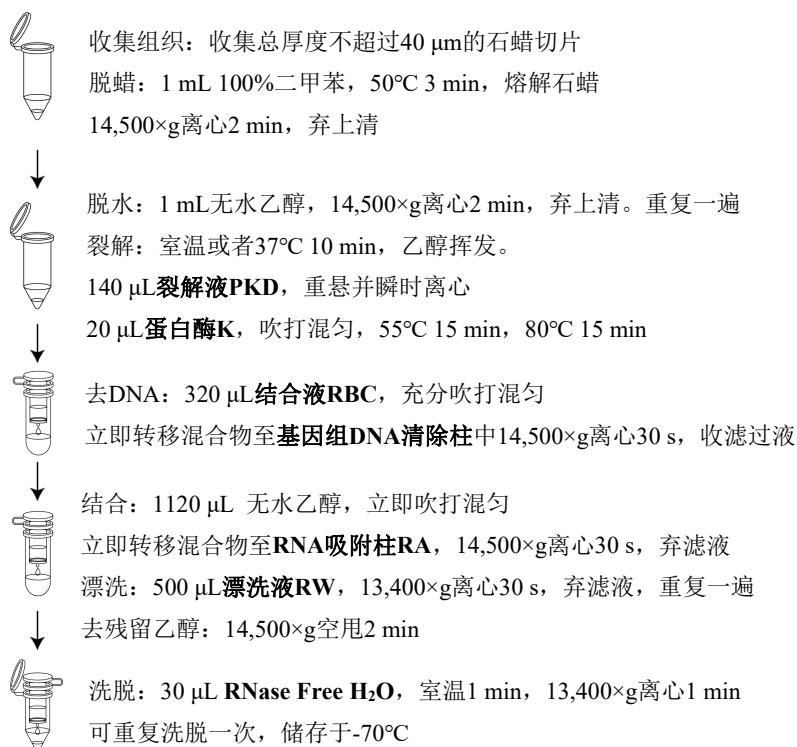
10. 加入■320  $\mu\text{L}$ /▲500  $\mu\text{L}$  结合液 RBC，充分吹打混匀调节结合条件。

11. 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 30 s，保留滤过液（RNA 在滤过液中）。

▲应避免吸到较大的未消化完全的絮团物质上清除柱，以免堵塞清除柱。

12. 加入■1120 μL/▲1750 μL 无水乙醇到滤过液中，立即吹打混匀，不要离心。  
▲如果加 1750 μL 无水乙醇，应先将滤过液转到容量超过 3 mL 的离心管。
13. 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，弃废液。
14. 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，弃废液。重复此步骤。
15. 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。
16. 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，或将第一次洗脱离心下来的洗脱液吸回吸附柱 RA，再洗脱一遍。

## 07/流程简图



## 08/相关产品

- AC1101 SPARKeasy 固定包埋组织 RNA 快速提取试剂盒
- AG0501 SPARKScript miRNA 1st strand cDNA synthesis kit(Tailing Reaction)
- AG0502 SPARKScript II miRNA 1st strand cDNA synthesis kit(By stem-loop)
- 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)

