

# SteadyPure 石蜡包埋组织 Small RNA 提取试剂盒

## SteadyPure FFPE Small RNA Extraction Kit

Code No. AG21038

**包装量:** 50 rxns

**保存温度:** Package 2-1 -20°C

Package 2-2 室温(15 ~ 30°C)

### 产品概述

本产品采用环保脱蜡的方式去除石蜡，安全无毒。可从 3~10 张厚度为 5~10  $\mu\text{m}$  的石蜡切片、小于 30 mg 的石蜡块及小于 30 mg 福尔马林固定的组织样本中提取 Small RNA (包括 miRNA、siRNA、tsRNA 和 piRNA 等)。采用优化的裂解体系释放石蜡样本中的 RNA，克服了福尔马林交联造成的抑制效应。再通过后续纯化去除蛋白质、gDNA 和大片段 RNA 等杂质，可获得高纯度 Small RNA，使用本产品提取获得的 Small RNA 纯度高、质量稳定，可用于 RT-qPCR、NGS 等下游实验。

### 安全操作

实验过程中可能会接触到强变性剂，实验操作开始前请穿戴合适的实验服、护目镜、口罩和手套，然后再进行实验操作。

**【注意：实验过程中产生的废液需要收集在废液桶中专门处理。】**

如果缓冲液 Buffer RLS-2 for small RNA、Buffer RBS-2 或 Buffer RWA for small RNA 不小心溅出，请立刻用清水冲洗。

详细信息请参考相关 MSDS 信息。

### 产品组成<sup>\*1</sup>

Proteinase K (20 mg/ml)	1 ml
DNase I (RNase free)	200 $\mu\text{l}$
10X DNase I Buffer	1 ml
Buffer DP	30 ml
Buffer RLS-2 for small RNA	13 ml
Buffer RBS-2	11 ml
Buffer RWA for small RNA <sup>*2</sup>	14 ml
Buffer RWB <sup>*2</sup>	27 ml
RNase Free Water <sup>*3</sup>	10 ml
FFPF Small RNA Mini Columns	50 sets X 2 pcs
Collection tubes	50 pcs
RNase Free Tubes <sup>*4</sup>	50 pcs

<sup>\*1</sup>: Proteinase K (20 mg/ml)、DNase I (RNase free) 及 10X DNase I Buffer 包装于 Package 2-1 中，需放置于 -20°C 保存；其余组分均包装于 Package 2-2 中，室温 (15 ~ 30°C) 保存。

<sup>\*2</sup>: Buffer RWA for small RNA 在首次使用前，请添加 21 ml 的无水乙醇 (Buffer RWA for small RNA 与无水乙醇体积比为 2 : 3)，Buffer RWB 在首次使用前，请添加 63 ml 的无水乙醇 (Buffer RWB 与无水乙醇体积比为 3 : 7)，混合均匀后在瓶子上做好标记，室温下保存。

<sup>\*3</sup>: RNase Free Water 开启后建议保存于 -20°C。

<sup>\*4</sup>: RNase Free Tubes 仅用于洗脱 RNA，前期裂解所用离心管需自备。

### 实验前准备

1. 无水乙醇、1.5 ml 离心管 (RNase free)、水浴锅、PBS (RNase free)。
2. 储存温度较低时，组分 Buffer RLS-2 for small RNA、Buffer RBS-2 可能出现沉淀，请于 37°C 加热溶解直至沉淀消失，再混合均匀后使用。
3. Buffer RWA for small RNA 在首次使用前，请添加 21 ml 的无水乙醇 (Buffer RWA for small RNA 与无水乙醇体积比为 2 : 3)，Buffer RWB 在首次使用前，请添加 63 ml 的无水乙醇 (Buffer RWB 与无水乙醇体积比为 3 : 7)，混合均匀后在瓶子上做好标记，室温下保存。

## ➤ 保存及运输

保存温度：Package 2-1 -20°C 保存

Package 2-2 室温（15-30°C）保存

运输温度：Package 2-1 干冰运输或-20°C冰袋运输

Package 2-2 室温运输

## ➤ 注意事项

1. 使用新鲜样品用于石蜡包埋组织切片的制备，可获得质量较高的 Small RNA。
2. 石蜡包埋样本存放时间过长（例：将样本暴露于空气中 1 年）可能导致 Small RNA 完整性受损，影响下游实验。
3. 针对难以裂解的样本（如肌肉、趾骨等），可使用液氮进行研磨，研磨过程中需及时补充液氮，避免样本中的 Small RNA 降解。
4. 样本切勿超过最大上样量，且需充分裂解，避免堵塞 *FFPF Small RNA Mini Columns*，影响 RNA 收量及纯度。如果样本量较大，请适当增加试剂用量，建议使用多个 *FFPF Small RNA Mini Columns* 进行纯化。
5. 本产品中 *FFPF Small RNA Mini Columns* 的最大加样体积为 700  $\mu$ l，使用时如果液体的体积超出最大加样体积，请使用多个 *FFPF Small RNA Mini Columns* 进行纯化；或分次加入：上样 700  $\mu$ l 混合液后，离心，弃滤液，然后将剩余混合液再次上样，重复此步骤。
6. 操作过程中，*FFPF Small RNA Mini Columns* 的吸附柱需竖直从 Collection tubes 或 1.5 ml 的离心管中取出（或放入），避免吸附柱柱头触碰管壁，造成污染。
7. 操作过程中，应预防 RNase 污染，需注意以下几方面：
  - ① 使用 RNA 操作专用实验台，经常更换新手套，穿戴 RNA 专用实验服，实验过程中尽量不要说话及来回走动，操作过程中避免物品从离心管上方过。
  - ② 严防操作环境、使用的容器、耗材和试剂的 RNase 污染。

## ➤ 操作流程

### 样本处理步骤

根据样本的不同，选择合适的样本处理步骤，待“样本处理步骤”完成后，请立即进入后续操作步骤。

#### ◆ 石蜡切片

1. 取石蜡切片（5-10  $\mu$ m 厚，1 $\times$ 1cm<sup>2</sup> 大小）3-10 张。
2. 使用手术刀刮取含有组织样本的石蜡装于 1.5 ml 离心管中，加入 600  $\mu$ l Buffer DP，高速涡旋振荡，使样本充分混匀。

【注①：可使用手术刀碾压石蜡样本，使样本处于粉末状，有助于样本的脱蜡及裂解；

②：针对难以裂解的样本（如肌肉、趾骨等），可使用液氮进行研磨。

将石蜡样本转移至液氮预冷的研钵中，用研杵研磨组织，直至研磨成粉末状，加入 600  $\mu$ l Buffer DP 至研钵中，继续研磨至溶液融化，再将组织和溶液全部转移至 1.5 ml 离心管中。】

3. 将上述混合液置于 56°C 水浴加热 5 min，12,000 rpm 室温离心 2 min，弃上清。

#### ◆ 石蜡块

1. 使用手术刀从石蜡块中刮取小于 30 mg 的组织样本，尽可能去除多余的石蜡。
2. 将上述刮取的组织样本装于 1.5 ml 离心管中，加入 600  $\mu$ l Buffer DP，高速涡旋振荡，使样本充分混匀。

【注①：可使用手术刀碾压石蜡样本，使样本处于粉末状，有助于样本的脱蜡及裂解；

②：针对难以裂解的样本（如肌肉、趾骨等），可使用液氮进行研磨。

将石蜡样本转移至液氮预冷的研钵中，用研杵研磨组织，直至研磨成粉末状，加入 600  $\mu$ l Buffer DP 至研钵中，继续研磨至溶液融化，再将组织和溶液全部转移至 1.5 ml 离心管中。】

3. 将上述混合液置于 56°C 水浴加热 5 min，12,000 rpm 室温离心 2 min，弃上清。



样本处理步骤

◆ 福尔马林等固定液中的样本

1. 将样本从福尔马林等固定液中取出，取小于 30 mg 的样本装于 1.5 ml 离心管中，加入 500  $\mu$ l PBS 涡旋振荡混匀，清洗组织。  
【注：若 PBS 未完全覆盖样本，可适当增加 PBS 的用量至覆盖样本即可。】
2. 将上述清洗完的组织样品转移至液氮预冷的研钵中，用研杵研磨组织，直至研磨成粉末状。  
【注：研磨过程中需要不断向研钵中补加液氮，避免样本中的 RNA 被降解。】
3. 将小于 30 mg 已研磨成粉末状的组织样本转移至含有 500  $\mu$ l PBS 的 1.5 ml 离心管中，涡旋振荡，使样本充分混匀，12,000 rpm 室温离心 2 min，弃上清。



样本处理步骤

提取步骤

1. 向上述处理后的样本中加入 250  $\mu$ l 的 Buffer RLS-2 for small RNA、20  $\mu$ l 的 Proteinase K (20 mg/ml)，高速涡旋振荡，使样本充分混匀，于 56 $^{\circ}$ C 水浴加热 15 min，期间可多次颠倒混匀，以促进裂解。
2. 再于 80 $^{\circ}$ C 水浴加热 15 min。
3. 水浴加热完成后，12000 rpm 室温离心 5 min，转移下层澄清液于新的 1.5 ml 离心管中。  
【注①：溶液表面会漂浮一层石蜡，转移下层澄清液时应尽可能避免取到石蜡层，否则可能会影响 RNA 的纯度。  
②：溶液底部可能会有未裂解充分的组织碎片，转移下层澄清液时应尽可能避免取到底部组织碎片，否则可能会导致 FFPE Small RNA Mini Column 堵塞，影响 RNA 收量及纯度。】
4. 向上述溶液中加入 220  $\mu$ l 的 Buffer RBS-2，使用移液器充分吸打混匀。
5. 准确量取上述混合液，并向混合液中加入总体积 0.47 倍的无水乙醇，使用移液器充分吸打混匀，若出现明显粘稠物或沉淀，用移液枪反复吹打直至混合液中无明显沉淀。  
【注：若沉淀不打散会导致 FFPE Small RNA Mini Column 堵塞，影响 RNA 收量及纯度。】
6. 将上述溶液全量转移至 FFPE Small RNA Mini Column 中，室温静置 1 min，12,000 rpm 室温离心 1 min，弃吸附柱，准确量取滤液的体积，转移至新的 1.5 ml 离心管。
7. 向上述滤液中加入总体积 0.75 倍的无水乙醇，使用移液器充分吸打混匀，若出现明显粘稠物或沉淀，用移液枪反复吹打直至混合液中无明显沉淀。  
【注：若沉淀不打散会导致 FFPE Small RNA Mini Column 堵塞，影响 RNA 收量及纯度。】



提取步骤



离心、收集滤液

纯化步骤

1. 立即将上述混合液全部转移至新的 FFPE Small RNA Mini Column 中，12,000 rpm 室温离心 1 min，弃滤液，保留吸附柱。  
【注：转移时如果液体的体积超出 FFPE Small RNA Mini Column 的最大容积 (700  $\mu$ l)，请分次转移：上样 700  $\mu$ l 混合液后，离心，弃滤液，然后将剩余混合液再次上样，重复此步骤。】
2. 向 FFPE Small RNA Mini Column 中加入 600  $\mu$ l 的 Buffer RWA for small RNA，室温静置 1 min，12,000 rpm 室温离心 1 min，弃滤液。  
【注：请确认 Buffer RWA for small RNA 中已经加入了指定体积的无水乙醇。】
3. 向 FFPE Small RNA Mini Column 中加入 650  $\mu$ l Buffer RWB，室温静置 1 min，12,000 rpm 室温离心 1 min，弃滤液。  
【注：请确认 Buffer RWB 中已经加入了指定体积的无水乙醇。】
4. 如需要 DNA 酶消化，请按照下述 <可选步骤> 进行。如不需要，请按照下述步骤 5-7 继续进行。
5. 重复纯化步骤 3 一次。
6. 将上述 FFPE Small RNA Mini Column 安置于新的 2.0 ml Collection Tube 中，12,000 rpm 室温离心 2 min。  
【注：此步骤需竖直将吸附柱取出，避免吸附柱柱头触碰收集管壁；安装于新的 2.0 ml Collection Tube 上，有利于提高 RNA 纯度。】



离心、弃滤液



Buffer RWA 洗一次  
Buffer RWB 洗两次

7. 将 *FFPE Small RNA Mini Column* 转入一个新的 RNase Free Tube 上，在吸附柱膜的中央处加入 30  $\mu$ l ~ 100  $\mu$ l RNase Free water，室温静置 2 min，然后 12,000 rpm 室温离心 2 min 洗脱 Small RNA，溶解后的 Small RNA 可直接用于后续检测或放入  $-80^{\circ}\text{C}$  中保存。



洗脱

【注①：此步骤需竖直将吸附柱取出，避免吸附柱柱头触碰 RNase Free Tube 管壁。

②：RNase Free water 的添加量可根据实际需求的 Small RNA 浓度调整，若需求较高浓度的 Small RNA，可适当降低 RNase Free water 的添加量（例：15 ~ 30  $\mu$ l）。】

可选步骤：DNase I 消化：

1. 按下表配制 DNase I 反应液并混匀。把 50  $\mu$ l DNase I 反应液加到 *FFPE Small RNA Mini Column* 的膜中央，室温静置 15 分钟。

成分	用量
DNase I ( RNase free )	4 $\mu$ l
10X DNase I Buffer	5 $\mu$ l
RNase free water	41 $\mu$ l

2. 向上述 *FFPE Small RNA Mini Column* 膜中央加入 350  $\mu$ l Buffer RWB，12,000 rpm 室温离心 1 分钟，弃滤液。
3. 后续实验，请按照上述纯化步骤 5~7 操作。