

RNeasy[®] DSP FFPE Kit 使用说明 (手册)



50

第 2 版



供体外诊断使用

与 RNeasy DSP FFPE Kit 配套使用



73604



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, 德国



1127532ZHCN

目录

| | |
|------------------------------|----|
| 预期用途 | 4 |
| 预期用户 | 4 |
| 描述与原理 | 5 |
| 总结与说明 | 5 |
| 操作流程原理 | 6 |
| 提供的材料 | 8 |
| 试剂盒内容物 | 8 |
| 试剂盒组件 | 9 |
| 使用者应自备的材料 | 10 |
| 警告和预防措施 | 11 |
| 安全信息 | 11 |
| 紧急情况应对信息 | 12 |
| 预防措施 | 12 |
| 试剂存储和搬运 | 14 |
| 使用中稳定性 | 14 |
| 试剂盒组件 | 14 |
| 流程步骤 | 15 |
| 开始前重要注意事项 | 15 |
| 缓冲液的制备 | 16 |
| 实验开始之前的准备事项 | 17 |
| 方案：从 FFPE 组织切片中纯化总 RNA | 17 |
| 质量控制 | 21 |

| | |
|----------------------|----|
| 局限性 | 21 |
| 性能特点 | 22 |
| 处置..... | 23 |
| 故障排除向导..... | 24 |
| 符号..... | 26 |
| 联系信息 | 28 |
| 附录：处理 RNA 的一般说明..... | 29 |
| 订购信息 | 31 |
| 文档修订历史..... | 32 |

预期用途

RNeasy DSP FFPE Kit 系统用于从福尔马林固定和石蜡包埋（Formalin-Fixed Paraffin Embedded, FFPE）处理后的组织中手动纯化总 RNA。

它采用了经优化的硅胶离心柱方案，并通过酶法去除 DNA 残留。

RNeasy DSP FFPE Kit 旨在用于体外诊断。

预期用户

该产品旨在供专业用户使用，例如，在分子生物技术方面经过培训的技术员和医师。

描述与原理

总结与说明

RNeasy DSP FFPE Kit 专为从福尔马林固定和石蜡包埋 (FFPE) 处理后的组织切片中纯化总 RNA 而设计。此试剂盒通过分离大于 70 个核苷酸的 RNA 分子，可为 RT-PCR 等应用回收可使用的 RNA 片段。

因固定和包埋，FFPE 样本中的核酸通常较为破碎且由福尔马林化学修饰。因此，从 FFPE 样本中分离得到的核酸常常在分子量上低于新鲜或冷冻样本。核酸破碎化的程度取决于样本的类型和制作时间及其固定、包埋和储存条件。为了实现 FFPE 组织的预检流程标准化，我们建议按照 ISO 20166 - 1:2018《分子体外诊断检查 - 福尔马林固定和石蜡包埋 (FFPE) 组织的预检过程规范 - 第 1 部分：分离 RNA》进行操作。

虽然福尔马林的修饰无法通过凝胶电泳或芯片实验室分析等标准质控检验而检测，它确实会强烈干扰酶分析。

虽然 RNeasy DSP FFPE Kit 可以优化的方式尽可能地逆转福尔马林的修饰，同时不会造成 RNA 的进一步降解，但从 FFPE 样本中纯化的核酸不应用于要求全长 RNA 的下游应用。有些应用可能需要经改进才能使用破碎的 RNA（例如为 RT-PCR 设计小扩增子）。在合成 cDNA 时，应使用随机或基因特定的引物以替代 oligo-dT 引物。

FFPE 切片的染色也可影响 RNA 的质量和在下游应用中的表现。这对很多免疫组织化学染色方案来说特别重要

操作流程原理

RNeasy DSP FFPE 的操作程序采用了用于 RNA 纯化的成熟 RNeasy 技术。专门优化的裂解条件允许从 FFPE 组织切片中有效地纯化总 RNA。DNase I 消化步骤可高效地去除 DNA 污染，包括高度破碎化的分子。

首先，使用 Deparaffinization Solution 处理 FFPE 组织切片，去除所有的石蜡。接下来在经优化的含蛋白酶 K 的裂解缓冲液中培养样本，以释放切片中的 RNA。较高温度下的短暂培养可部分逆转释放后核酸的福尔马林交联，从而提高 RNA 产量和质量以及下游酶分析中 RNA 的表现。随后经 DNase I 处理以优化的方式消除基因组 DNA，包括长期福尔马林固定和/或长期储存后 FFPE 样本中通常存在的极小 DNA 片段。接下来将裂解物与 Buffer RBC 混合。添加乙醇为 RNA 提供适合的附着条件，然后让样本通过 RNeasy MinElute Spin Columns，让总 RNA 附着到膜上并高效地冲洗清除污染物。最后用至少 14 μ l 的不含 RNase 的水洗脱 RNA。

RNeasy DSP FFPE 的操作程序

FFPE 组织切片

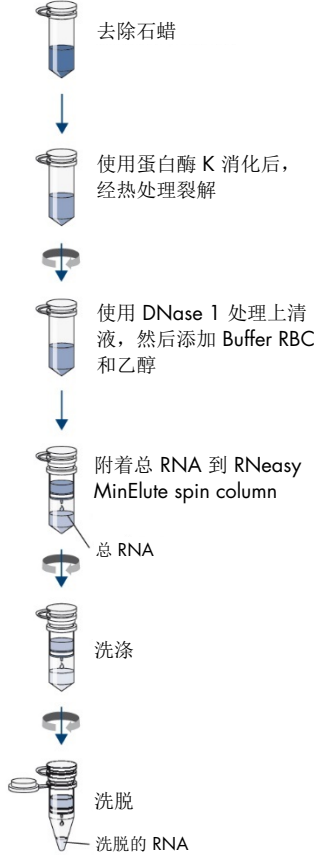


图 1. 使用 RNeasy DSP FFPE Kit 从 FFPE 组织中纯化 RNA 的操作程序。

提供的材料

试剂盒内容物

| RNeasy DSP FFPE Kit | | | (50) |
|----------------------------|--|----------------------|--------------|
| 目录编号 | | | 73604 |
| 制备数 | | | 50 |
| | 标识 | 符号 | 数量 |
| RNeasy MinElute Spin | RNeasy MinElute® Spin Columns (粉色) (每个 2 ml 采样管中 1 个) | COL | 50 |
| ET | Elution Tubes (洗脱管) (1.5 ml) | ELU TUBE | 50 |
| LT | Lysis Tubes (裂解管) (2 ml) | LYS TUBE | 150 |
| WT | Wash Tubes (冲洗管) (2 ml) | WASH TUBE | 250 |
| DPS | Deparaffinization Solution | DEPAR SOL | 20 ml |
| RBC | Buffer RBC* | BIND BUF | 45 ml |
| PKD | Buffer PKD | PROTK DIL | 15 ml |
| PK | Proteinase K (蛋白酶 K) | PROTK | 1.25 ml |
| DN | RNase-Free DNase I (lyophilized) (不含 RNase 的 DNase I) (冻干) | DNase | 1 |
| RNFW | RNase-Free Water (不含 RNase 的水) | ELU DIL | 3 x 1.5 ml |
| DBB | DNase Booster Buffer | DNase BUF | 2 ml |
| RPE | Buffer RPE [†] (浓缩液) | WASH BUF CONC | 11 ml |
| HB, v2 | RNeasy DSP FFPE Kit 手册 | | 1 |

* 含有胍盐。与含有漂白剂的消毒剂不相容。有关安全信息请参阅第 11 页。

[†]首次使用前，按瓶身上说明添加 4 倍容量的乙醇（96 - 100%，非变性），并按第 16 页说明制备工作溶液。

试剂盒组件

试剂盒的主要组件说明如下。

表 1.含有活性成分的试剂

| 试剂 | | 组件 | 容量 |
|------|--------------------------------|-------|------------------|
| 符号 | 名称 | | |
| DPS | Deparaffinization Solution | 十六烷 | ≥90% 至 ≤100% w/w |
| RBC | Buffer RBC | 盐酸胍 | ≥30% 至 70% w/w |
| PKD | Buffer PKD | 无 | - |
| PK | Proteinase K (蛋白酶 K) | 蛋白酶 K | ≥1% 至 <3% w/w |
| DN | 不含 RNase 的 DNase I (冻干) | DNase | ≥90% 至 ≤100% w/w |
| RNFW | RNase-Free Water (不含 RNase 的水) | 无 | - |
| DBB | DNase Booster Buffer | 无 | - |
| RPE | Buffer RPE (浓缩液) | 无 | - |

为了将 RNA 分离对诊断结果的负面影响风险最小化，应该对下游应用进行足够的控制。

使用者应自备的材料

工作中如接触化学品，则必须穿着合适的实验工作服，并戴好一次性手套和护目镜。有关更多信息，请参考相关安全数据表 (Safety Data Sheets, SDS)。该表可从产品供应商处获得。

确保根据制造商的建议对仪器进行检查和校准。

- 无菌、不含 RNase 的移液器吸头和移液管
- 微型离心机（包含用于 2 ml 试管的转子）
- 涡旋器
- 96 - 100% 乙醇（请勿使用含有甲醇或甲基乙基酮等其他成分的变性酒精）
- 一次性手套
- 带振动功能的加热块，能够在 56° C 和 80° C 下培养

警告和预防措施

请注意，可能会要求您参照当地法规，将用户和/或患者发生的与设备有关的严重事故报告给制造商和监管机构。

尽可能在产品开发阶段实施计划的所有缓解措施，并对其进行了系统审查。根据风险管理判断，整体残余风险可接受，因此可判断设备使用安全。RNeasy DSP FFPE Kit 无残余风险。

供体外诊断使用。

在使用此试剂盒之前，请认真阅读所有说明。

安全信息

工作中如接触化学品，则必须穿着合适的实验工作服，并戴好一次性手套和护目镜。有关更多信息，请参阅相关安全数据表 (Safety Data Sheets, SDS)。这些信息在 www.qiagen.com/safety 上以 PDF 格式在线提供。您可以在该网址中查找、浏览和打印每种 QIAGEN 试剂盒及其组件的安全数据表。

警告

人身伤害风险



不得将漂白剂或酸性溶液直接添加到样本制备产生的废弃物中。

RNeasy DSP FFPE Kit 中的缓冲液含叠氮化钠。如果试剂盒的缓冲液泼洒出来，请使用合适的实验室洗涤剂和水进行清理。如果泼洒的液体含有潜在感染性试剂，请首先使用实验室洗涤剂和水来清洁受影响区域，然后使用 1% (v/v) 次氯酸钠进行清洁。

紧急情况应对信息

CHEMTREC

美国和加拿大 1-800-424-9300

美国和加拿大以外 +1 703-527-3887

预防措施

以下危险和预防声明适用于 RNeasy DSP FFPE Kit 的组件。

PKD、RPE、RNFw、DBB

包含：叠氮化钠。警告！如果吞食，可能有害。如果您感觉不适，请呼叫毒物中心或者医生/内科医师。

Deparaffinization Solution



包含：十六烷。危险！吞咽和进入气道后可致命。导致皮肤瘙痒。导致严重眼刺激。可能导致呼吸道不适。可能对水生生物造成长期持久的有害影响。使用防护手套/防护衣/护目镜/面部护具。如果已接触或担心接触：立即呼叫毒物中心或者医生/内科医师。请勿催吐。上锁存放。将其中内容物/容器交给获批的废物处理厂处理。

Proteinase K



包含：蛋白酶 K。危险！导致轻度皮肤瘙痒。如果吸入，可能导致过敏、哮喘症状或者呼吸困难。避免吸入灰尘/烟尘/煤气/雾气/蒸汽/喷雾/喷剂。使用防护手套/防护衣/护目镜/面部护具。佩戴呼吸防护用品。如果已接触或担心接触：请呼叫毒物中心或者医生/内科医师。请将人员移到空气新鲜的地方，保持舒适顺畅的呼吸。将其中内容物/容器交给获批的废物处理厂处理。

DNase I



包含：DNase。危险！可能引发过敏性皮肤反应。如果吸入，可能导致过敏、哮喘症状或者呼吸困难。避免吸入灰尘/烟尘/煤气/雾气/蒸汽/喷雾/喷剂。使用防护手套/防护衣/护目镜/面部护具。佩戴呼吸防护用品。如果已接触或担心接触：请呼叫毒物中心或者医生/内科医师。请将人员移到空气新鲜的地方，保持舒适顺畅的呼吸。

Buffer RBC



含有：盐酸胍。警告！吞食或吸入有害。导致皮肤瘙痒。导致严重眼刺激。使用防护手套/防护衣/护目镜/面部护具。

DNase Booster Buffer



警告！导致轻度皮肤瘙痒。使用防护手套/防护衣/护目镜/面部护具。

试剂存储和搬运

不含 RNase 的 DNase I 和 RNeasy MinElute spin columns 应在接收后立即在 2 - 8° C 下储存。缓冲液可存放在室温 (15 - 25° C) 下。在上述条件下，试剂盒可储存至包装盒标签上标明的失效日期且性能不会下降。

一旦 RNeasy DSP FFPE Kit 失效，请勿再使用。

使用中稳定性

本试剂盒可在首次使用后使用 10 个月或使用至到期日。

试剂盒组件

各试剂的失效日期在单个组分的标签上标明。在正确的储存条件下，产品可在使用相同批次的组件时保持稳定性。

长期储存重新溶解后的 DNase I 时，从玻璃瓶中取出原液，将其分为多个单次使用等份试样，然后在 - 15 至 - 30° C 下可最多储存 10 个月。解冻后的等份试样可在 2 - 8° C 下最多储存 8 周。请勿在解冻后重新冷冻等分试样。

避免使试剂暴露于紫外灯（例如，用于去污染）下，因为这种暴露会导致其加速老化。

流程步骤

开始前重要注意事项

起始材料

标准的福尔马林固定和石蜡包埋程序可导致核酸的大量破碎和交联。为了限制核酸破碎和交联的程度，请确保：

- 使用小于 5 mm 厚的组织样本以便福尔马林完全渗透
- 在手术移除后尽快用 4 - 10% 的中性缓冲福尔马林溶液固定组织样本。
- 固定时间最长 24 小时（更长的固定时间可导致固定过度 and 更严重的核酸破碎，导致在下游检测中表现较差）。
- 包埋前为样本彻底脱水
- 使用低熔点石蜡包埋

RNA 纯化的起始材料为 FFPE 组织切片，每片最多 20 μm 厚。切片越厚，核酸产量就会越低，即使延长使用蛋白酶 K 培养的时间也是如此。一次可最多组合使用每片厚度 10 μm 的 4 个切片。如果切片的合计厚度在 40 μm 或以下，则组合使用 4 个以上的切片（例如 8 个厚度 5 μm 的切片）。

对于 DNA 含量特别高的组织，我们推荐每次使用更少的切片数以避免纯化后的 RNA 遭受 DNA 污染。

如果没有关于您所使用的起始材料性质的信息，我们建议刚开始每次制备不超过 2 个切片。取决于 RNA 产量和纯度，您可随后最多使用 4 个切片。但若让 RNeasy MinElute spin column 过载，则可显著降低 RNA 的产量和质量。

缓冲液的制备

制备 DNase I 原液

将冻干 DNase I 在 550 μl 不含 RNase 的水中溶解即可制备 DNase I 原液。为了避免损失 DNase I，请勿打开玻璃瓶。用不含 RNase 的针头和注射器将不含 RNase 的水注入玻璃瓶。轻轻倒置玻璃瓶以混合。请勿以旋涡方式混合。

有时，储存 DNase I 的玻璃瓶可能看起来是空的。这是因为冻干后的酶粘在了隔片上。为了避免损失 DNase I，请勿打开玻璃瓶。请按下述说明使用针头和注射器溶解 DNase I。

提示： DNase I 对物理变性非常敏感。仅应以轻轻倒置玻璃瓶的方式混合。

提示： 请注意将全部不含 RNase 的水注入玻璃瓶。

溶解 DNase I 后，可能存在不溶性材料。这是因为生产过程中冻干 DNase I 中可能存在不溶性材料。这一现象不会影响 DNase I 的性能。

长期储存 DNase I 原液时，从玻璃瓶中取出原液，将其分为多个单次使用等份试样，然后在 -15 至 -30°C 下可最多储存 10 个月。解冻后的等份试样可在 $2 - 8^{\circ}\text{C}$ 下最多储存 8 周。请勿在解冻后重新冷冻等分试样。

制备 Buffer RPE

添加 4 倍容量 (44 ml) 的乙醇 (96 - 100%) 到含有 11 ml Buffer RPE 浓缩液的瓶中。勾选瓶标签上的复选框以指示已添加了乙醇。

提示： 开始前，摇动混合复溶 Buffer RPE。

实验开始之前的准备事项

- 如果您是首次使用 RNeasy DSP FFPE Kit，请阅读“开始前重要注意事项”（第 15 页）。
- 如果您是首次使用 RNA，请阅读“附录：处理 RNA 的一般说明”（第 28 页）。
- Buffer RBC 含有胍盐，因此与含有漂白剂的消毒剂不兼容。有关安全信息，请参阅第 11 页。
- 除非另外说明，否则所有步骤应在室温下 (15 - 25° C) 操作。请在操作过程中快速操作；切勿在步骤间停留时间过长。
- 请在 15 - 25° C 下使用微型离心机执行所有离心步骤。如果使用冷冻微型离心机，则将温度设置到 20 - 25° C，否则可能显著降温到 15° C 下。
- 在下列程序中，▲ 表示每个样本处理 1 - 2 个切片时使用的容量，而 ● 表示每个样本处理超过 3 - 4 个切片时使用的容量。
- 如果您是首次使用 Buffer RPE 和不含 RNase 的 DNase I，请按“缓冲液的制备”（第 16 页）中的说明将其复溶。
- 将所有的缓冲液保持在室温 (15 - 25° C)。摇动混合复溶 Buffer RPE。
- 将加热混合器设置为 56° C，以便在第 5 步和第 9 步中使用。为了缩短等待时间，将第二个加热混合器设置为 80° C 以便在第 9 步中使用。
- **提示：**切勿在步骤之间停止纯化程序，否则培养时间过长可导致 RNA 损失或降解。同时处理多达 12 个样本的平均时间约为 130 分钟。

方案：从 FFPE 组织切片中纯化总 RNA

1. 用手术刀修剪掉样块上多余的石蜡。
2. 切出 5 - 20 μm 的切片。
如果样本表面曾暴露在空气中，则丢弃前 2 - 3 个切片。
3. 立即将切片放入一个 ▲ 1.5 或 ● 2 ml 微型离心机试管中，然后盖上盖。
4. 添加 ▲ 160 或 ■ 320 μl Deparaffinization Solution，以涡旋方式强力振荡 10 秒，然后短暂离心让样本沉降到试管底部。
5. 在 56° C 下培养 3 分钟，然后静置 5 分钟冷却到室温。

如果使用的 Deparaffinization Solution 过少或者样本上残留了过多的石蜡，冷却后 Deparaffinization Solution 可能会有蜡感或为固态。在此情况下，在 160 μ l 步骤中添加额外的 Deparaffinization Solution 并重复第 5 步。

6. 添加 ▲ 150 或 ● 240 μ l Buffer PKD，以涡旋方式混合 3 秒。
7. 以 11,000 $\times g$ 的速度离心 1 分钟。
8. 添加 10 μ l 蛋白酶 K 到下段的透明液相，然后轻轻上下移液 10 次以混合（不应混合不同的液相）。
9. 在 56° C 和 1100 rpm 下培养 15 分钟，然后在 80° C 和 1100 rpm 下培养 15 分钟。
如果仅使用一个加热块，则在 56° C 培养后让样本冷却到室温直至加热块温度达到 80° C。
提示：不要求为获得最大的 RNA 产量而使用蛋白酶 K 完全消化组织；但 80° C 培养步骤很关键。
重要提示：确保开始 15 分钟培养之前，加热块的温度达到 80° C。在 80° C 下培养 15 分钟对于逆转福尔马林交联以及在下游应用中（如 real-time RT-PCR）优化 RNA 性能至关重要。
10. 短暂离心后将 ▲ 145 或 ● 230 μ l 的下段无色液相转移到一个新 1.5 ml 微型离心管中。
11. 在冰上培养 3 分钟。然后，以 20000 $\times g$ 速度离心 15 分钟。
12. 将上清液移至一个新的 2 ml 微型离心管中，注意勿扰动沉淀颗粒。
沉淀物包含不溶解的组织碎屑，包括交联的 DNA。
13. 添加等同于总样本体积十分之一的 DNase Booster Buffer（▲ 14.5 或 ● 23 μ l）和 10 μ l DNase I 原液。倒置试管混合。短暂离心以收集管壁上残留的液体。
提示：DNase I 为冻干粉，且应按“制备 DNase I 原液”（第 16 页）中的说明复溶。
提示：DNase I 对变性特别敏感。仅应轻轻倒置试管以混合。请勿以旋涡方式混合。
14. 在室温下培养 15 分钟。
15. 添加 ▲ 320 或 ● 500 μ l Buffer RBC 以调节附着条件，然后以涡旋方式彻底混合裂解物 3 秒并短暂离心。

16. 将 ▲ 720 μ l 或 ■ 1200 μ l 乙醇 (96-100%) 加入样本。请勿离心。立即前进到第 17 步。

添加乙醇后即可看到沉淀。这不会影响程序。

17. 上下移液 5 次均匀混合，然后将 700 μ l 样本（包括可能产生的任何沉淀）转移至 RNeasy MinElute spin column（置于 2 ml 的采样管中）。轻轻关上盖，以 $\geq 8000 \times g$ 的速度离心 15 秒。丢弃含流经液体 * 的采样管，然后将离心柱放入一个新采样管中（已提供）。

18. 重复第 17 步（不再额外混合）直至整个样本完全通过 RNeasy MinElute spin column。

19. 添加 500 μ l Buffer RPE 到 RNeasy MinElute spin column。轻轻关上盖，以 $\geq 8,000 \times g$ 速度离心 15 秒。丢弃含流经液体*的采样管，然后将离心柱放入一个新采样管中（已提供）。

提示： Buffer RPE 为浓缩液。确保在使用前已按“制备 Buffer RPE”中的说明添加乙醇。

20. 添加 500 μ l Buffer RPE 到 RNeasy MinElute spin column。轻轻关上盖，以 $\geq 8,000 \times g$ 的速度离心 2 分钟以冲洗离心柱膜。丢弃含流经液体 † 的采样管，然后将离心柱放入新采样管中（已提供）。

提示： 离心后，小心地从采样管中取出 RNeasy MinElute spin column。不要让离心柱接触流经液体。否则，会发生乙醇携带污染。

21. 打开离心柱盖，以全速离心 5 分钟。丢弃含有流经液体的采样管。

为了避免损坏盖，将离心柱放入离心机中时，两个离心柱间至少空一个位置。盖的定向应与转子的旋转方向相反（例如，如果转子顺时针旋转，则逆时针定向盖）。

干燥离心柱的膜至关重要，因为乙醇残留会干扰下游反应。打开盖离心以确保 RNA 洗脱中不会残留乙醇。

22. 将 RNeasy MinElute spin column 放入一个新 1.5 ml 采样管中（已提供）。直接向离心柱膜的中心注入 14 - 32 μ l 不含 RNase 的水。轻轻关上盖，以全速离心 1 分钟洗脱 RNA。

洗脱时不含 RNase 的水用量越少，总 RNA 浓度就越高，但 RNA 产量越低。

*流经液体包含 Buffer RBC，因此与漂白剂不兼容。有关安全信息请参阅第 8 页。

† 流经液体包含 Buffer RBC，因此与漂白剂不兼容。有关安全信息请参阅第 8 页。

提示：如果预期 RNA 产量较低，则推荐使用低附着试管（未提供）洗脱。RNeasy MinElute spin column 的平均死体积为 2 μl ；使用 14 μl 不含 RNase 的水洗脱可产生约 12 μl 的洗脱液。

23. 在 -60 至 -90°C 下储存 RNA 洗脱液，或在 -15 至 -30°C 下最多储存 12 周。

提示：洗脱液的稳定性取决于分离 RNA 的含量和类型、洗脱体积以及存储条件。我们建议用户根据自身的具体要求建立洗脱液稳定性。

质量控制

QIAGEN 根据 ISO 认证的质量管理体系，针对预先确定的规范，测试每批 RNeasy DSP FFPE Kit 以确保始终如一的产品品质。

局限性

系统性能通过从福尔马林固定石蜡包埋的样本中纯化人 RNA 的性能评估研究进行确定。

用户负责针对其实验室中使用的、不在 QIAGEN 性能评估研究的涵盖范围内的任何操作程序验证系统性能。

为了将对于诊断结果的负面影响风险最小化，应该对下游应用进行足够的控制。

产生的任何诊断结果必须结合其他临床或实验结论来读解。

性能特点

可以在 www.qiagen.com 产品页面“资源”标签下找到适用的性能特点。

处置

废弃物包含样本和试剂。废弃物中可能含有有毒或传染性物质，必须妥善处置。有关正确的处理程序，请参见当地的安全法规。

有关更多信息，请参阅相关安全数据表 (Safety Data Sheets, SDS)。这些信息在 www.qiagen.com/safety 上以 PDF 格式在线提供。您可以在该网址中查找、浏览和打印每种 QIAGEN 试剂盒及其组件的安全数据表。

故障排除向导

故障排除向导能帮助解决可能出现的任何问题。有关更多信息，请参见我们技术支持中心的常见问答网页：www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx。QIAGEN 技术服务部门的专家将非常乐意解答您有关本手册、样本和分析技术中信息和/或方案的问题。（如需进行信息交流，请登录 www.qiagen.com 以获取相关信息）。

意见和建议

RNeasy MinElute spin column 堵塞

- | | |
|------------|---|
| a) 起始材料过多 | 减少起始材料的数量。使用正确数量的起始材料至关重要（请参阅第 15 页）。 |
| b) 离心温度过低。 | 离心温度应为 15 - 25° C。有些离心机即使设置 20° C，也会冷却到 15° C 以下。这可导致沉淀形成，从而堵塞 RNeasy MinElute spin column。在此情况下，设置离心温度到 25° C。 |
-

RNA 产量低

- | | |
|--|---|
| a) 起始材料质量差 | 固定超过 24 小时或长期储存的样本可能包含极少的可利用 RNA。在显微镜载玻片上固定过的切片因长期暴露于空气而仅可产生极少的可利用 RNA。 |
| b) 起始材料过多 | RNeasy MinElute spin column 过载可显著降低核酸产量。减少起始材料的数量（请参阅第 15 页）。 |
| c) RNA 仍附着在 RNeasy MinElute spin column 膜上 | 重复 RNA 洗脱，但在离心前在工作台上用 RNFWD 培养 RNeasy MinElute spin column 10 分钟。 |
| d) 缓冲液/试剂储存方式有误 | RNeasy MinElute spin column 以及 DNase I 需要在接收试剂盒后于 2 - 8° C 下储存。检查储存温度是否正确，因为在较高的温度下暴露较长时间可导致功能丧失。 |
-

A_{260}/A_{280} 值低

| | |
|-------------------------------|---|
| 稀释核酸以测量 A_{260}/A_{280} 的用水 | 测量纯度前用 pH 7.5 的 10 mM Tris Cl 稀释样本，而不是用水。 |
|-------------------------------|---|

意见和建议

下游试验中 DNA 污染

- a) 起始材料过多
对某些类型的组织来说，处理极高数量时的 DNA 清除效率会下降。如果洗脱后的 RNA 中包含大量的 DNA 污染物，每次制备中试着处理较少的组织切片。
- b) 组织中 DNA 含量高
处理富含 DNA 的大量组织（例如胸腺）时，DNA 可能无法被完全消化。用较少的组织切片重复纯化程序。
检查 DNase I 是否已按“试剂储存和处理”和“制备 DNase I 原液”中的说明正确储存。
- c) RNA 数量不足的逆转录
大多数逆转录酶旨在用于约 1 µg 的 RNA。如果使用极少量的 RNA 进行逆转录，我们推荐使用专为高敏感逆转录设计的逆转录酶。

RNA 在下游检测/应用中表现不佳

- a) RNA 因福尔马林修饰而破碎或结块
RNeasy DSP FFPE 程序中的 80° C 培养是逆转录和其他下游酶应用中 RNA 最佳表现的关键。确保在整个 15 分钟的培养过程内培养温度始终保持在 80° C。
虽然 80° C 培养去除了部分福尔马林修饰，从 FFPE 切片中纯化的 RNA 不是酶反应的最佳模板。我们推荐在合成 cDNA 时仅使用随机引物或基因特定的引物。我们也推荐在 PCR 中尽可能使用最短的扩增子（<500 个核苷酸）。
- b) 乙醇携带污染
在用 Buffer RPE 进行二次冲洗时，确保在 15 - 25° C 温度下以 $\geq 8000 \times g$ 的速度离心 2 分钟，以干燥 RNeasy MinElute spin column 膜。离心后，小心地从采样管中取出离心柱，不要让离心柱接触流经液体。然后，将离心柱放入新的采样管中，并以全速离心 5 分钟。
- c) RNA 洗脱中发生盐携带污染
确保添加适量的乙醇以复溶 Buffer RPE 并将缓冲液置于室温下 (15 - 25° C)。
- d) RNA 数量不足的逆转录
大多数逆转录酶旨在用于约 1 µg 的 RNA。如果使用极少量的 RNA 进行逆转录，我们推荐使用专为高敏感逆转录设计的逆转录酶。

符号

使用说明或包装和标签上会出现下列符号：

| 符号 | 符号定义 |
|---|------------------------------------|
|  Σ <N> | 包含足够进行 <N> 次反应的试剂 |
|  | 有效期 |
|  | 本产品符合体外诊断医疗器械法规 (EU) 2017/746 的要求。 |
|  | 体外诊断医疗器械 |
|  | 到达时 |
|  | DN |
|  | RNeasy MinElute Spin |
|  | 目录编号 |
|  | 批号 |
|  | 材料编号（即，组件标签） |
|  | 组件（即，所含内容清单） |
|  | 所含物（内容） |
|  | 编号（即，小瓶、试剂瓶） |

符号

符号定义

| | |
|---|---------------------------|
|  | 全球贸易项目代码 |
| Rn | R 表示使用说明（手册）为修订版，n 为修订版本号 |
|  | 温度限制 |
|  | 制造商 |
|  | 参考使用说明 |
|  | 警示 |
|  | 蛋白酶 K |
|  | 叠氮化钠 |
|  | 唯一设备标识符 |

联系信息

有关技术支持和更多信息，请参阅技术支持中心网页 www.qiagen.com/Support，拨打 00800-22-44-6000，或与 QIAGEN 技术服务部门或当地经销商（请参阅封底或访问 www.qiagen.com）联系。

附录：处理 RNA 的一般说明

处理 RNA

核糖核酸酶 (RNase) 是一种非常稳定且活跃的酶类，其作用功能的发挥一般不需要辅助因子。因为 RNase 很难灭活，且甚至只有极少量即可破坏 RNA，请勿在首先清除可能的 RNase 污染前使用任何塑料或玻璃器具。应非常小心地避免在纯化程序中或之后无意将 RNase 引入 RNA 样本。为了形成和保持一个不含 RNase 的环境，处理 RNA 时，在预处理过程中以及在使用一次性和非一次性容器和溶液时，必须采取以下预防措施。

一般处理

处理 RNA 时始终采用正确的微生物无菌操作技术。手和尘粒能携带细菌和霉菌，且是最常见的 RNase 污染源。处理试剂和 RNA 样本时始终佩戴乳胶或塑料手套，以避免来自皮肤表面或多尘实验室设备的 RNase 污染。频繁更换手套并尽可能始终保持试管封闭。在为下游应用进行等分试样移液时，应将纯化的 RNA 置于冰上保存。

为了去除工作台表面、非一次性塑料器具和实验室设备（例如移液器和电泳槽）的 RNase 污染，推荐使用 Ambion® 的 RNaseZap®（目录编号 AM9780）。RNase 污染也可使用常用实验室试剂去除。使用 0.1 M NaOH、1 mM EDTA 以及不含 RNase 的水（请参阅第 30 页上的“溶液”）冲洗塑料器具进行消毒；如果塑料器具耐氯，则可使用氯仿冲洗。对于电泳槽的消毒来说，用洗涤剂（例如 0.5% SDS）清洗后用不含 RNase 的水或乙醇（如果耐乙醇）冲洗，最后风干。

一次性塑料器具

推荐在整个操作程序中使用无菌一次性聚丙烯试管。这些试管一般不含 RNase 且不要求预处理以灭活 RNase。

玻璃器具

玻璃器具使用前应经处理以确保其不含 RNase。对于用于 RNA 操作的玻璃器具来说，使用前应用洗涤剂清洗，然后彻底冲洗，最后在烘箱中 240° C 下烘干至少 4 小时（隔夜，如果更方便）。单独使用高压灭菌不能完全灭活某些 RNase。另外，您也可按下面的“溶液”中所述用 DEPC（焦碳酸二乙酯）处理玻璃器具。

溶液

溶液（水和其他溶液）应使用 0.1% DEPC 进行处理。DEPC 是 RNase 的强大抑制剂，但其抑制效果并不绝对。通常使用 0.1% 的浓度灭活玻璃或塑料器具上的 RNase 或制备不含 RNase 的溶液和水。DEPC 通过共价修饰灭活 RNase。将 0.1 ml DEPC 加入到 100 ml 待处理的溶液中，然后猛烈摇动，让 DEPC 进入溶液。在 37° C 下培养溶液 12 小时。高压灭菌 15 分钟以清除任何 DEPC 残留。DEPC 可与伯胺反应，且不可直接用于处理 Tris 缓冲液。DEPC 在 Tris 缓冲液中高度不稳定，且可快速降解为乙醇和 CO₂。制备 Tris 缓冲液时，首先用 DEPC 处理水，然后溶解 Tris 以制备适合的缓冲液。痕量的 DEPC 可通过乙酯基化修饰 RNA 中的嘌呤残基。乙酯基化的 RNA 在无细胞体系中转化效率极低。但其形成 DNA:RNA 或 RNA:RNA 杂合体的能力未受严重影响，除非大量的嘌呤残基都被修饰。必须通过高压灭菌或加热到 100° C 后保持 15 分钟以清除溶液或容器中残留的 DEPC。

提示：RNeasy 缓冲液无需 DEPC 处理即可担保没有 RNase，因此没有任何 DEPC 污染。

订购信息

| 产品名称 | 目录 | 目录编号 |
|--------------------------|--|-------|
| RNeasy DSP FFPE Kit (50) | 50 RNeasy MinElute Spin Columns、洗脱管、冲洗管、裂解管、不含 RNase 的试剂和缓冲液 | 73604 |

有关最新的许可信息和特定产品的免责声明，请参阅相应的 QIAGEN 试剂盒手册或使用手册。QIAGEN 试剂盒手册和用户手册可从 www.qiagen.com 下载或从 QIAGEN 技术服务部门或您本地的经销商处获取。

文档修订历史

修订版本

说明

R1, 2022 年 6 月

更新至试剂盒第 2 版，以符合 IVDR。
与试剂盒第 1 版相比，方案和性能均无变化

更新了警告与预防措施（增加了残余风险和紧急情况应对信息）

增加了处置章节

RNeasy DSP FFPE Kit 的有限许可协议

使用本产品表示本产品的任何购买者或使用者同意遵循如下条款：

1. 本产品在使用时只能遵守本产品随附的方案和本手册，且只能与试剂盒内包含的组分协同使用。除了本产品随附的操作方案、本手册以及 www.qiagen.com 上提供的其他操作方案中所述的情况，QIAGEN 并未在其任何知识产权下许可将本试剂盒的所含组件与本试剂盒中未包含的任何组件协同使用或者相整合。其中一些附加方案可能是由 QIAGEN 用户为 QIAGEN 用户提供的。这些方案未经 QIAGEN 彻底测试或优化。QIAGEN 既不对其进行担保，也不保证其没有侵犯第三方的权利。
 1. 除非相关许可明确说明，否则 QIAGEN 并不保证本试剂盒和/或其使用不会侵犯第三方的权利。
 2. 本试剂盒及其组件为一次性用品，不可重复使用、翻新或转卖。
 3. 除了明确陈述的许可外，QIAGEN 否认提供任何其他明示或暗示许可。
 4. 本试剂盒的购买者和使用者同意不采取、也不允许其他人采取任何步骤来实施或推动实施以上禁止的任何行为。为行使本“有限许可协议”条款的规定内容或者保护本试剂盒和/或其组分的知识产权，QIAGEN 可能会在法庭上执行本协议的相关禁令，并追讨所有调查和诉讼费用（包括律师费）。
- 有关更新的许可条款，请访问 www.qiagen.com。

商标：QIAGEN®、Sample to Insight®、MinElute®、RNeasy® (QIAGEN Group)；Ambion®、RNaseZap® (Thermo Fisher Scientific 或其子公司)。本档中使用的注册名称、商标等，甚至在未有专门如此标记时，也不得视为不受法律保护。
06/2022 HB-3027-001 1127532 © 2022 QIAGEN，保留所有权利。

