

从石蜡包埋组织样品提取总 RNA

简介

近 10 年来，现代分子生物学技术越来越广泛地被用于人类疾病研究的诸多领域，为了解病理状态下核酸的变化积累了新资料。石蜡包埋组织是生物样品保存的经典方法。医院病理科档案中积存的大量石蜡包埋组织，是一个可靠的分子生物学研究的材料来源。石蜡包埋组织 DNA/RNA 的提取扩展了分子生物学技术在临床上的应用范围。若能成功地从蜡块中提取出高质量的 DNA/RNA，就可以满足某些肿瘤分子生物学的需要，结束了 DNA/RNA 研究依赖于新鲜或冰冻组织和细胞的历史，而且可以广泛地应用于大宗病例的回顾性研究，对肿瘤发生的分子机制的探讨，诊断与鉴别诊断研究和患者预后评估等方面均具有重要价值。从石蜡组织提取 RNA 有着极大的难度。样品在固定过程，包埋过程以及贮藏过程都会造成核酸的损坏。核酸还会因蛋白质与蛋白质交联，或蛋白质与核酸的交联而修改或包裹。此外，RNA 还会片段化和被化学修饰。Magen 公司的 HiPure FFPE RNA Kits 采用硅胶柱纯化技术和独特的溶液体系，可高效地从石蜡包埋组织样品提取高纯度的 RNA。更加细节的操作流程和高温脱修饰处理，可最大限度地提高 RNA 的得率，该产品系列包括有：

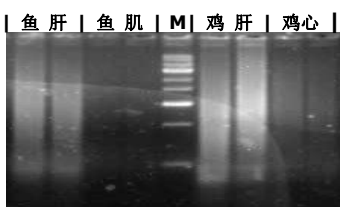
名称	RNA 分子	纯化方式
HiPure FFPE RNA Kit	总 RNA	硅胶柱
HiPure FFPE RNA Plus Kit	总 RNA	硅胶柱
HiPure FFPE miRNA Kit	小分子 RNA	硅胶柱
MagPure FFPE RNA Kit	总 RNA	磁珠法

实验结果

1. HiPure FFPE RNA Kit 提取效果

1.1. RNA 产量和电泳结果：取 9mg 石蜡包埋组织草鱼肝脏，草鱼肌肉、鸡肝、鸡心脏鱼肝样品(一年)，用 HiPure FFPE RNA Kit 进行提取。取纯化的 RNA 用 Nanodrop 2000 测量其 OD 值，取纯化的 RNA 上样于 2% 琼脂糖凝胶电泳分析，

M: CL5000 DNA Marker。由 OD 值可知，OD260/OD280 约为 2.0，OD260/OD230 在 1.8-2.0，表明 RNA 纯度高，由产量可知，RNA 得率也很非常高。

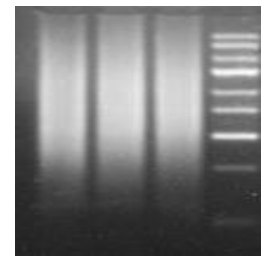


样品	浓度 ng/μl	260/280	260/230	Yield/μg
鱼肝	372.1	1.88	1.13	14.8
	574.7	1.78	0.94	22.9
鱼肌	39.1	1.69	0.36	1.5
	44.7	1.75	0.39	1.7
鸡肝	532.3	1.96	1.38	21.2
	627.7	1.92	1.21	25.1
鸡心	70.1	1.84	0.58	2.804
	71.8	1.84	0.57	2.8

1.2. 石蜡 RNA 中 DNA 的污染情况

取上述纯化的石蜡包埋组织鸡肝 RNA，用 DNase I 进行消化，去除 DNA 污染后，电泳分析其结果。由图可知，鸡肝 RNA 不经过或经过 DNase I 处理后，电泳的带型没有发生明显变化，表明 HiPure FFPE RNA Kit 得到的 RNA 中 DNA 污染很少。这主要是因为 DNA 被组蛋白交联，在短时间消化时，DNA 还没有充分游离出来。HiPure FFPE RNA Plus Kit 采用独特的 DNase 消化流程，在消化液中直接加入 DNase 激活液，这种溶液可屏蔽 SDS 和蛋白酶对 DNase 的影响，让 DNase 在消化液中可起作用消化去除 DNA，因为可得到无 DNA 污染的 RNA。

| 无 | DNase 消化 | M

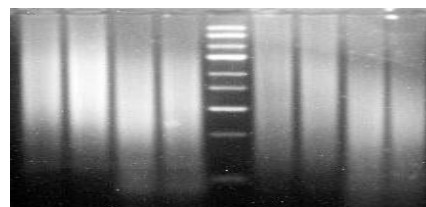


2. HiPure FFPE miRNA Kit 提取效果

2.1 RNA 产量和电泳结果：取 10mg 石蜡包埋组织鸡肝和鱼肝样品(一年)，用 HiPure FFPE miRNA Kit 进行提取。提取时，加入不同浓度的乙醇(0.5 倍和 1.5 倍)，来达到总 RNA 和小分子 RNA 的筛选目的。取纯化的 RNA 用 Nanodrop 2000 测量其 OD 值，取纯化的 RNA 上样于 2% 琼脂糖凝胶电泳分析。M: CL5000 DNA Marker。由 OD 值可知，OD260/OD280 约为 2.0，OD260/OD230 在 1.8-2.0，表明 RNA 纯度高，由产量可知，RNA 得率也很非常高。由电泳可知，通过改变乙醇浓度，可轻松实现大分子 RNA 与小分子 RNA 分离。当乙醇达到 1.5 倍时，小于 100bp 以下的仍然有许多小分子 RNA 的条带，若乙醇用量为 0.5 倍时，在 100bp 附近都没有亮带，表明小分子 RNA 被去除，而起到富集大分子 RNA 的作用。

Sample ID	Conc. ng/μl	260/280	260/230	Yield μg
鸡肝	总 RNA 1	534.1	2.07	26.7
	总 RNA 2	598.3	2.06	29.9
	小分子 RNA 3	612.1	2.05	30.6
	小分子 RNA 4	599.4	2.06	29.9
鱼肝	总 RNA 5	295.7	2.03	14.7
	总 RNA 6	318.8	2.03	15.9
	小分子 RNA 7	384	2.02	19.2
	小分子 RNA 8	377.3	2.03	18.8

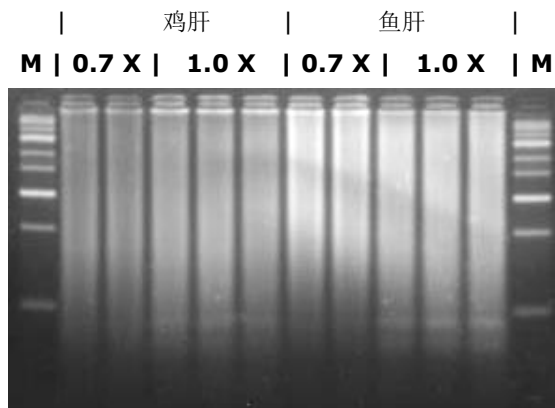
1 2 3 4 M 5 6 7 8



(小分子 RNA)

3. MagPure FFPE RNA Kit 提取效果

取 5mg 石蜡包埋组织鸡肝和鱼肝样品(一年), 用 MagPure FFPE RNA Kit 进行提取。提取时, 加入不同浓度的异丙醇(0.7 倍和 1.0 倍), 来达到总 RNA 和小分子 RNA 的筛选目的。取纯化的 RNA 用 Nanodrop 2000 测量其 OD 值, 取纯化的 RNA 上样于 2% 琼脂糖凝胶电泳分析。M: CL5000 DNA Marker。由 OD 值可知, OD260/OD280 约为 2.0, 表明 RNA 纯度高, 由产量可知, RNA 得率也很非常高。由电泳可知, 通过改变乙醇浓度, 可轻松实现大分子 RNA 与小分子 RNA 分离。当异丙醇达到 1.5 倍时, 小于 100bp 以下的仍然有许多小分子 RNA 的条带, 若异丙醇用量为 0.7 倍时, 在 100bp 附近都亮带不明显, 表明小分子 RNA 被去除, 而起到富集大分子 RNA 的作用。



Sample ID	Conc.	260/ ng/μl	260/ 280	260/ 230	Yield μg
鸡肝	0.7V	318.1	2.02	1.29	9.5
		409.7	2.07	1.79	12.2
	1.5V	654.5	1.96	1.21	19.6
		691.4	2.06	1.62	20.7
鱼肝	0.7V	277.4	1.86	0.95	8.3
		195.2	2.06	1.43	5.8
	1.5V	371.1	1.83	0.87	11.1
		255.7	2.07	1.08	7.6