

## 固定组织 RNA 提取试剂盒说明书

### 【产品名称】

通用名称：固定组织 RNA 提取试剂盒

### 【包装规格】

50 次提取/盒

### 【预期用途】

本试剂盒适用于从福尔马林固定、石蜡包埋的组织中有效纯化总 RNA。

经纯化的 RNA 可以直接反转录，反转录产物可直接用于 PCR、Real-time PCR 等。

### 【检验原理】

本试剂盒利用先进的硅胶膜技术和简单的离心程序可以简单快速地从福尔马林固定、石蜡包埋的组织中有效分离得到高纯度的总 RNA。RNA 特异性地结合到硅胶膜上，最后用低盐缓冲液或水洗脱下来的纯化 RNA 可以直接用于 RT-PCR、Real-time PCR 等下游操作。

### 【主要组成成分】

本试剂具体包含组分如表一。

试剂盒组份	规格和数量
Buffer A	15 mL×1 瓶
Buffer RB	50 mL×1 瓶
蛋白酶 K	25mg×1 支
蛋白酶 K Buffer	1.25mL×1 支
Buffer RW1(concentrate)	15 mL×1 瓶
RNase-Free Water	10mL×1 瓶
脱蜡液	25mL×1 瓶
Spin Column RS	50 个×1 包
DNA Remover Column	50 个×1 包
Collection Tube	100 个×1 包
T1 离心管	50 个×1 包

注：不同批号试剂盒中各组分不可以互换。

### 【储存条件及有效期】

本试剂盒中不同试剂组分存储条件不同，请按如下条件分别储存：

蛋白酶 K、蛋白酶 K Buffer：-20℃±5℃，其他组分：室温（10℃-30℃），有效期 12 个月。

蛋白酶 K、蛋白酶 K Buffer 在运输过程中，加冰袋运输，运输时间建议不超过 7 天。

### 【生产日期及失效日期】

生产日期及失效日期见标签。

### 【自备试剂及耗材】

1. 无水乙醇
2. 离心管
3. 10mM PBS (pH7.4)

### 【样本要求】

本试剂盒所用样本为组织石蜡切片及经福尔马林固定组织样本，获得组织样本后，要尽快将样本在 4%-10%的福尔马林中固定，固定时间以 14-24 小时为宜，时间过长易导致 RNA 断裂，影响下游实验。

确保包埋前的样本彻底脱水，残留的福尔马林会抑制蛋白酶 K 的作用。

### 【实验前准备及重要注意事项】

1. 向蛋白酶 K 中加入 1.25mL 蛋白酶 K Buffer 使其溶解，-20℃±5℃ 保存。配制好的蛋白酶 K 勿长时间室温放置，避免反复冻融，以免影响其活性。
2. 第一次使用前应按照试剂瓶标签的说明在 Buffer RW1 加入无水乙醇并打钩，避免多次加入。
3. 使用前请先检查 Buffer A 和 Buffer RB 是否有结晶，若有结晶，使用前加热溶解（温度不超过 60℃）。

### 【操作步骤】

#### 1. 福尔马林固定的新鲜样本：

- 1) 福尔马林固定液中的样本：取约 20mg 的样本，切成小块，置于离心管中，加入 500μL 10mM PBS(pH7.4)，涡旋振荡，12,000rpm 离心 1 分钟，弃上清，重复 3 次。
- 2) 加入 150 μL Buffer A，重悬沉淀；加入 20μL 蛋白酶 K，涡旋振荡混匀。
- 3) 56℃ 孵育 15 分钟，直到样本完全溶解；80℃ 孵育 15 分钟；12000rpm 离心 1 分钟，使管壁上的溶液收集到管底。（后续按照石蜡包埋样本处理的步骤 4 开始操作）

注意：①此步骤的目的是修复由甲醛变性的核酸，孵育的温度过度或时间过长可能造成 RNA 断裂，产生 RNA 碎片。

②56℃ 孵育后的样本可置于室温，直至水浴锅或干浴锅的温度达到 80℃ 后再把样本置于

80℃孵育。

## 2. 石蜡包埋样本:

1) 用手术刀将组织块中多余的石蜡修剪掉, 露出组织。将组织块切成 5-10 $\mu$ m 的薄片。

**注意:** 如果样本表面已经暴露在空气中, 请将接触空气的 2-3 片弃掉不用。

2) 取约 1 $\times$ 1 cm<sup>2</sup> 的切片 (共约 4-5 片切片) 置于离心管中, 加 400 $\mu$ L 脱蜡液和 200 $\mu$ L Buffer A, 涡旋振荡混匀, 再加入 20 $\mu$ L 蛋白酶 K, 涡旋振荡。

3) 56℃孵育 15min, 直到样本完全溶解; 80℃孵育 15min; 12000rpm 离心 1min; 使用 200 $\mu$ L 移液器沿管壁小心吸取下层 200 $\mu$ L 孵育产物转移至新的 1.5mL 离心管

**注意:** ①此步骤的目的是修复由甲醛变性的核酸, 孵育的温度过度或时间过长可能造成 RNA 断裂, 产生 RNA 碎片。

②56℃孵育后的样本可置于室温, 直至水浴锅或干浴锅的温度达到 80℃后再把样本置于 80℃孵育。

4) 加入 320  $\mu$ L Buffer RB, 涡旋振荡彻底混匀。

5) 将步骤 4) 所得的溶液全部加入到已装入收集管 (Collection Tube) 的吸附柱 (DNA Remover Column) 中, 10,000rpm 离心 1 分钟, 收集滤液, 丢弃吸附柱。

6) 向步骤 5) 所得到的溶液中加入 720 $\mu$ L 无水乙醇, 混匀。

**注意:** 加入无水乙醇后, 可能有少量沉淀物析出, 但不影响后续操作。

7) 将步骤 6) 中所得的溶液全部加入到已装入收集管 (Collection Tube) 的吸附柱 (Spin Column RS) 中, 若一次不能加完溶液, 可分多次转入。10,000rpm 离心 1 分钟, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管。

8) 向吸附柱中加入 500  $\mu$ L Buffer RW1 (使用前检查是否已加无水乙醇), 10,000 rpm 离心 1 分钟, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管。

9) 重复步骤 8)。

10) 12,000rpm 离心 2 分钟, 倒掉收集管中的废液。将吸附柱置于室温数分钟以彻底晾干。

11) 将吸附柱置于 T1 离心管中, 向吸附柱的中间部位悬空加入 20-50  $\mu$ L RNase-Free Water, 室温放置 2-5 分钟, 10,000 rpm 离心 1 分钟, 收集 RNA 溶液, 直接用于后续实验或置于 -70℃ 以下保存。

**注意:** ① RNase-Free Water 体积不应小于 20 $\mu$ L, 体积过小影响回收率。

②如果要提高 RNA 的产量, 可用 20-50 $\mu$ L 新的 RNase-Free Water 重复步骤 11)。



③如果要提高 RNA 浓度, 可将得到的溶液重新加入到吸附柱中, 重复步骤 11)。

### 【注意事项】

1. 在试验前应详细阅读本说明。
2. 不要使用超过有效期的试剂。
3. 不应使用不符合要求的样本。
4. 应由具备专业经验或经培训合格的人员进行操作, 并佩戴手套、口罩等防护用品。

5. 本试剂盒所有试剂均经过特别配制，随意替换试剂盒中的任何试剂，都可能影响使用效果，不同批号试剂盒成分不可相互混用。

**【标识的解释】**

图形符号	符号标题	符号说明
	怕晒	表示医疗器械需要避开光源
	怕雨	表示医疗器械需要避免潮湿，保持干燥
	体外诊断医疗器械	表示医疗器械为体外诊断医疗器械
	查阅使用说明	表示用户需要查阅使用说明
	向上	表明该运输包装件在运输时应竖直向上

**【基本信息】**

备案人/生产企业名称：嘉兴允英医学检验有限公司

住所：浙江省嘉兴市南湖区大桥镇汇信路 153 号研发车间楼第三层

联系方式：0573-83108883

售后服务单位名称：嘉兴允英医学检验有限公司

联系方式：0573-83108883

生产地址：浙江省嘉兴市南湖区大桥镇凌公塘路 3556 号 5 号楼-2

生产备案编号：浙嘉药监械生产备 20160011 号

**【医疗器械备案凭证编号/产品技术要求编号】**

浙嘉械备 20170031 号

**【说明书批准日期及修改日期】**

批准日期：2017 年 06 月 21 日

修改日期：2024 年 03 月 12 日