

## 磁珠法石蜡包埋组织（FFPE）RNA提取试剂盒说明书

### 【产品名称】

通用名称：磁珠法石蜡包埋（FFPE）组织总 RNA 提取试剂盒

### 【包装规格】

100T/盒（货号：NG-MB0022-100T），500T/盒（货号：NG-MB0022-500T）

### 【预期用途】

本试剂适用于提取福尔马林固定组织、石蜡包埋组织中的总 RNA，其处理得到的核酸可用于 PCR、q-PCR、Northern Blot、二代测序建库等下游实验。

### 【检测原理】

RNA 在高盐条件下结合于硅基包被的 Magbeads 表面，经过多次清洗，去除杂蛋白等，低盐条件下洗脱，得到高纯度的 RNA。

### 【主要组成成分】

组份	NG-MB0022-100T	NG-MB0022-500T
脱蜡液	125mL	300mL*2
裂解液	25mL	110mL
结合液	25mL	110mL
磁珠悬液	1.75mL*2	17mL
蛋白酶 K	1.2mL*2	1.2mL*10
DNaseI	220μL	1mL
清洗液 1	55mL	270mL
清洗液 2	55mL	270mL
清洗液 3	55mL	270mL
洗脱液	20mL	60mL
WRB Buffer 1	12mL	55mL

### 【自备器材】

核酸提取仪（我司有不同通道核酸提取仪可选，可联系）、2.2mL96深孔板（U底）、磁棒套、离心管、磁力架、涡旋振荡器、移液器、恒温振荡器等。

### 【储存条件及有效期】

蛋白酶 K 于 4°C 保存或长期于 -20°C 保存，DNaseI 于 -20°C 保存，WRB Buffer 1 和磁珠悬液 4°C 保存，其余试剂常温保存，有效期皆为一年。

### 【注意事项】

1. 磁珠严禁冷冻，磁珠悬液使用前应充分混匀；
2. 每次使用前检查各组分是否出现沉淀，若有，可在 60°C 条件下重新溶解；
3. 注意勤换新手套，避免避免皮肤表面的 RNase 导致样品 RNA 的降解；
4. 使用 RNase-free 的耗材；
5. 实验前根据样品数量配制相应体积的 DNaseI 反应液（单个反应配制用量为 DNaseI：2μL + WRB Buffer 1：98μL），分装到相应工位的 96 孔板中。DNase I 反应液尽量现用现配，避免酶活性降低。

### 【单管手动操作步骤】

## 1. 样本前处理:

### 1) 石蜡块样本:

用手术刀修剪、去除多余石蜡,使用切片机切出 1~5 片、厚 5-20  $\mu\text{m}$  的切片(请将接触空气的前2-3 片弃掉不用),并转移至 1.5 mL 离心管中。

### 2) 石蜡卷样本:

取 1~5 片、厚 5~20  $\mu\text{m}$  的石蜡卷至 1.5 mL 离心管中。

### 3) 石蜡切片样本:

将手术刀片用脱蜡液润湿,刮取 5-10 张石蜡切片样本至 1.5 mL 离心管中,用脱蜡液冲洗干净手术刀片。

### 4) 福尔马林浸泡的样本:

取 10~30 mg 组织样本,用手术刀切成小块(约芝麻粒大小),置于 1.5 mL 离心管中,加入 500  $\mu\text{L}$  PBS 溶液(pH 7.4)或生理盐水溶液,涡旋振荡后,12,000 rpm (~13,400 g)室温离心 1 min,弃上清,重复 3 次

## 2. 样品的裂解和消化(以下两种方案任选一种)

### 1) 常规方案:

注:石蜡样本从步骤(1)开始,福尔马林浸泡的样本直接从步骤(4)开始。

(1) 在装有石蜡组织的 1.5 mL 离心管中加入 1 mL 脱蜡液。

(2) 涡旋振荡 10 s, 56°C 孵育 5 min, 立即涡旋振荡 10 s 让石蜡充分溶解。

(3) 13,000 g 离心 2 min, 弃去上清液, 注意不要吸到下层沉淀。

注:如果石蜡过多,此步骤离心后上清液会发生凝固,将离心管重新置于 56°C 孵育 3 min, 待上清恢复液态,弃去上清,重复步骤 1~3。

(4) 加入 200  $\mu\text{L}$  裂解液, 20  $\mu\text{L}$  蛋白酶 K, 涡旋振荡, 短暂离心后, 56°C 孵育 30 min, 中间可以多次颠倒混匀或 1500 rpm 震荡混匀, 使样本消化充分。

(5) 80°C 孵育 20 min。

(6) 15,000 g 离心 3 min, 转移样本裂解液至新的 1.5 mL 离心管或深孔板结合液的样孔中(若为 32 通道核酸提取仪器转移裂解液至深孔板的第 1/7 列; 若为 96 通道核酸提取仪器转移裂解液至工位 1 深孔板)。

### 2) 快速方案

注:石蜡样本从步骤(1)开始,福尔马林浸泡的样本直接从步骤(3)开始。

(1) 在装有石蜡组织的 1.5 mL 离心管中加入 1 mL 脱蜡液。

(2) 涡旋振荡 10 s, 56°C 孵育 5 min, 立即涡旋振荡 10 s 让石蜡充分溶解。

(3) 加入 200  $\mu\text{L}$  裂解液, 20  $\mu\text{L}$  蛋白酶 K, 涡旋振荡, 短暂离心后, 56°C 孵育 30 min, 中间可以多次颠倒混匀或 1500 rpm 震荡混匀, 使样本消化充分。

(4) 80°C 孵育 20 min。

(5) 15,000 g 离心 3 min, 将下层澄清液转移至新的 1.5 mL 离心管或深孔板结合液的样孔中(若为 32 通道核酸提取仪器转移裂解液至深孔板的第 1/7 列; 若为 96 通道核酸提取仪器转移裂解液至工位 1 深孔板)。

**3. 结合 RNA:** 在加有样本裂解液的离心管中加入 200  $\mu\text{L}$  结合液, 30  $\mu\text{L}$  磁珠, 振荡混匀 5 min。

**4. 磁性分离:** 将离心管置于磁力架上, 上下颠倒 2-3 次, 静置待磁珠完全吸附, 彻底去除上清液(全程保持离心管固定于磁力架上), 期间避免接触磁珠。

**5. 清洗 1:** 将离心管从磁力架上取出, 加入 500  $\mu\text{L}$  清洗液 1 盖好离心管管盖, 涡旋振荡 10s, 确保磁珠充分混匀, 然后涡旋振荡 1-2min, 进行磁性分离。

**6. 清洗 2:** 将离心管从磁力架上取出, 加入 500  $\mu\text{L}$  清洗液 2 盖好离心管管盖, 涡旋振荡 10s, 确保磁珠充分混匀, 然后涡旋振荡 1-2min, 进行磁性分离。

**7. DNA 消化:** 按照 DNase I 反应混合液配制比例, 配制 DNase I 反应混合液。往离心管中加入

100  $\mu$ L DNase I 反应混合液，振荡混匀 15 min，短暂离心后置于磁力架上吸附 1 min，待磁珠吸附聚集后，弃上清。

**8. 清洗 3:** 将离心管从磁力架上取出，加入 500  $\mu$ L 清洗液 3 盖好离心管管盖，涡旋振荡 10s，确保磁珠充分混匀，然后涡旋振荡 1-2min，进行磁性分离。

**9. 晾干:** 将离心管置于磁力架上，放置通风橱中，进行风干 3-5min，待磁珠表面不反光即可。

**10. 洗脱:** 取出离心管，加入 35-100 $\mu$ L 洗脱液，涡旋混匀 20s，确保磁珠与洗脱液充分混匀，将离心管放于 55 $^{\circ}$ C 水浴锅孵育 5min，其间涡旋混匀两次（亦可 55 $^{\circ}$ C 恒温震荡 5min）。

**11. 核酸转移:** 将离心管置于磁力架上静置 1min，待磁珠完全吸附后将上清转移至新的离心管中，即获得纯的总 RNA，于 -80 $^{\circ}$ C 保存备用。

### 【机提—16/32 通道核酸提取仪操作步骤】

#### 1. 上样准备

在 96 孔板中分别参照下表用量加入每个相应孔位，可同步完成 16/32 个样品的处理。

样品孔位	1、7	2、8	3、9	4、10	5、11	6、12
试剂	结合液 (200 $\mu$ L) 磁珠悬液 (30 $\mu$ L)	清洗液 1 (500 $\mu$ L)	清洗液 2 (500 $\mu$ L)	DNase I 反应混合液 (100 $\mu$ L)	清洗液 3 (500 $\mu$ L)	洗脱液 (35-100 $\mu$ L)

注：若为预分装试剂（FP107-16），无需进行上样准备，直接从步骤 2 开始操作。

#### 2. 样本处理及裂解消化

参照单管手动提取的步骤【1】和【2】，将裂解消化后的样本转移至第 1、7 列孔内，固定好 96 孔板，并插入磁棒套。

#### 3. 上机提取

打开仪器的操作程序，选中相应程序，单击“运行”执行全自动提取程序。

#### 4. 核酸转移

仪器运行结束后，将深孔板第 6 和 12 列中的洗脱产物转移至新的无核酸酶的离心管中。

#### 32 通道核酸提取仪器程序各参数设置如下：

步骤编号	孔位	名称	等待时间(min)	混合时间(min)	吸磁时间(sec)	容积( $\mu$ L)	混合速度	温度( $^{\circ}$ C)
1	1	结合	0	5	40	600	3	OFF
2	2	清洗 1	0	1	40	500	3	OFF
3	3	清洗 2	0	1	40	500	3	OFF
4	4	DNA 消化	0	15	40	100	3	OFF
5	5	清洗 3	0	1	40	500	3	OFF
6	6	洗脱	2	5	60	100	3	60
7	5	弃磁珠	0	1	0	600	3	OFF

### 【机提—96 通道核酸提取仪操作步骤】

**1. 上样准备:** 在 96 孔板中分别参照下表用量加入每个相应板位，可同步完成 96 个样品的处理。

样品工位	1	2	3	4	5	6
试剂	结合液 (200 $\mu$ L) 磁珠悬液 (30 $\mu$ L)	清洗液 1 (500 $\mu$ L)	清洗液 2 (500 $\mu$ L)	DNase I 反应混合液 (100 $\mu$ L)	清洗液 3 (500 $\mu$ L)	洗脱液 (35-100 $\mu$ L)

注：若为预分装试剂（FP107-96），无需进行上样准备，直接从步骤 2 开始操作。

## 2. 样本处理及裂解消化

参照单管手动提取的步骤【1】和【2】，将消化裂解后的样本转移至样品工位 1 的 96 深孔板内，固定好 96 孔板，并插入磁棒套。

3. **上机提取：**将准备好的 96 孔样品板按序放入 QN-AUT-96 核酸提取仪或同类型提取仪中，并插

入磁棒套；打开仪器的操作程序，选中对应程序，点击运行，开始提取。

## 4. 核酸转移

仪器运行结束后，将第 6 工位的洗脱液直接封膜或转移至干净的无核酸酶的离心管中，于-20℃保存备用。

### 96 通道核酸提取仪器程序各参数设置如下：

步骤	第 1 步	第 2 步	第 3 步	第 4 步	第 5 步	第 6 步	第 7 步
工位	1	2	3	4	5	6	5
等待时间	00:00:00	00:00:00	00:00:00	00:00:15	00:00:00	00:02:00	00:00:00
混合模式	3	3	3	3	3	3	3
混合时间	00:05:00	00:01:00	00:01:00	00:15:00	00:01:00	00:05:00	00:00:30
是否暂停	否	否	否	否	否	否	否
吸磁时间	00:01:00	00:01:00	00:01:00	00:01:00	00:01:00	00:01:00	00:00:00
体积	600μL	500 μL	500 μL	100 μL	500 μL	100 μL	500 μL
温度	—	—	—	—	—	60℃	—