

石蜡RNA抽提试剂盒（磁珠法）使用说明书

【货号】 A2010A103

【规格】 50T

【产品说明】 版本：2020版-01

BioTNT 磁珠法RNA 抽提试剂盒采用国际领先的磁珠法对样本进行抽提，可用于手工抽提RNA，经优化，也可用于多款全自动的磁珠法抽提仪器。

本试剂盒用于石蜡组织切片提取、纯化RNA，提取产物纯度高、片段完整，适用于分子生物学研究及下游应用。

【试剂盒组成】：

	试剂名称	规格
103-SR-1	[脱蜡剂]	50mL× 1瓶
103-SR-2	[溶解液]	10mL× 1瓶
103-SR-3	[裂解液]	10mL× 1瓶
103-SR-4	[蛋白酶混合液]	1000 μ L× 1支
103-SR-5	[洗涤液A]	45mL× 1瓶
103-SR-6	[洗涤液B]	9mL× 2瓶
103-SR-7	[洗脱液]	5mL× 1瓶
103-SR-8	[磁珠悬液]	500 μ L× 1支
SR-8	无水乙醇	25ml× 3瓶
SR-9	异丙醇	20ml× 1瓶

【储存条件】：蛋白酶混合液及磁珠悬液2-8℃保存，其余试剂室温（15-25℃）保存，有效期一年。

【实验设备】：漩涡振荡器，离心机或磁力架；

【样本要求】

石蜡组织切片不超过10 μ m厚度切片。如果没有起始样本的信息，建议初次制备采用的切

片数应不超过 2 片，然后根据得率和纯度，下次制备采用的切片数可以进行调整，但应不超过 5 片。

【操作步骤】

未开封的洗涤液 B 使用前需先向试剂瓶中加入 37.5mL 无水乙醇，充分混匀配置成洗涤液 B 工作液用于常规提取过程，配制完毕后请在瓶身及瓶盖标记“√”。

【样本预处理】

1. 取石蜡切片接入到1.5mL离心管中，加入1000 μ L脱蜡剂。

2. 65 $^{\circ}$ C脱蜡10分钟，期间间断性颠倒混匀脱蜡。脱蜡结束时，管内无石蜡片、液体趋于透明，组织样本悬浮于液体中。

注：若脱蜡后液体浑浊，仍可看到未溶解的白色石蜡，可适当增加脱蜡剂的用量，重复脱蜡步骤。

3. 迅速取出离心管并加入200 μ L无水乙醇（取出后温度不可大幅降低，建议样本量大的时候分批次操作，每批次不超过4管），12000rpm离心3min沉淀组织，用移液器吸头清除析出石蜡层，尽量清除析出石蜡并小心不要搅动沉淀组织，石蜡层除去后再吸除上层清液，留下200 μ L体积液体以及组织沉淀混合物。

4. 吸出上述混合物至一个干净的1.5mL离心管，加入200 μ L溶解液以及20 μ L蛋白酶混合液。65 $^{\circ}$ C消化10min，期间每隔3分钟颠倒离心管10次。

5. 上述液体中加入200 μ L裂解液，65 $^{\circ}$ C消化10min，期间每隔3分钟颠倒离心管10次。

最后置于已经加热至90 $^{\circ}$ C水浴锅静置5min。冷却至室温后待用。

所有样本处理后进入下面步骤：

如果有磁力架，请选择磁力架操作模式Part A；如果您没有配备磁力架，也可以选择离心机的操作模式。本试剂也可以在全自动核酸提取仪上进行操作。

Part A 使用磁力架按照以下进行操作：

1. 于上述预处理好的样本混合液离心管中加入300 μ L异丙醇、10 μ L磁珠悬液，立即高速涡旋震荡10-15次（溶液完全涡旋震荡、磁珠分布均匀算作一次），60 $^{\circ}$ C孵育15分钟，期间每

隔2分钟上下颠倒离心管10次，始终使管内磁珠分布均匀。室温放置5分钟，期间每隔2分钟上下颠倒离心管10次，始终使管内磁珠分布均匀。

2. 将离心管置于磁力架，颠倒混匀，回收管盖残留磁珠，静置30s至磁珠全部吸附到管壁，用移液器吸去管内及管盖液体，**注意不能将磁珠吸出。**

3. 移去磁力架，加入900 μ L洗涤液A，低速旋涡震荡10s至其分布均匀后，上下颠倒离心管10-15次充分洗涤。将离心管置于磁力架，颠倒混匀，回收管盖残留磁珠，静置30s至磁珠全部吸附到管壁，用移液器吸去管内及管盖液体，**注意不能将磁珠吸出。**

4. 移去磁力架，加入600 μ L洗涤液B工作液，低速旋涡震荡10s至其分布均匀后，上下颠倒离心管10-15次充分洗涤。将离心管置于磁力架，颠倒混匀，回收管盖残留磁珠，静置30s至磁珠全部吸附到管壁，用移液器吸去管内及管盖液体，**注意不能将磁珠吸出。**

5. 移去磁力架，加入600 μ L洗涤液B工作液，用移液器吹散磁珠后将液体带磁珠全部转入新的离心管内。将离心管置于磁力架，颠倒混匀，回收管盖残留磁珠，静置30s至磁珠全部吸附到管壁，用移液器吸去管内及管盖液体，**注意不能将磁珠吸出。**

6. 移去磁力架，加入600 μ L洗涤液B工作液，低速旋涡震荡10s至其分布均匀后，上下颠倒离心管10-15次充分洗涤。瞬时低速离心，将离心管置于磁力架上，静置直至磁珠全部吸附到管壁，用移液器吸去管内液体。**特别注意：务必吸尽离心管内残留液体，可以多次吸取液体，但不能将磁珠吸出。**

7. 打开管盖，于室温干燥2-3分钟，至磁珠表面无明显液体。将洗脱液放置于80 $^{\circ}$ C预热(2-3分钟)。

8. 移去磁力架，加入50-100 μ L预热好的洗脱液，用枪头吹吸至磁珠分布均匀或高速涡旋10-15次（溶液完全涡旋震荡、磁珠分布均匀算作一次）。80 $^{\circ}$ C温育6分钟，期间每隔1分钟左右摇晃离心管10-15次（切勿颠倒），使管内磁珠始终保持均匀分布的状态。温育结束后，将离心管高速涡旋10-15次（溶液完全涡旋震荡、磁珠分布均匀算作一次）。

9. 将离心管置于磁力架上，静置直至磁珠全部吸附到管壁，吸取上清到一个无核酶干净的离心管中，此即为纯化后的RNA核酸溶液。液体可以直接进行下面的分子生物学分析，如需检测mRNA，建议直接逆转录得到CDNA。RNA可短期保存于-20℃，长期保存于-70℃。

Part B 无磁力架请按照下面进行操作：

- 1) 于上述预处理好的样本混合液离心管中加入300μL异丙醇、10μL磁珠悬液，立即高速涡旋震荡10-15次（溶液完全涡旋震荡、磁珠分布均匀算作一次），60℃孵育15分钟，期间每隔2分钟上下颠倒离心管10次，始终使管内磁珠分布均匀。室温放置5分钟，期间每隔2分钟上下颠倒离心管10次，始终使管内磁珠分布均匀。
- 2) 离心机操作：8000 rpm 离心 1min，弃上清。
- 3) 在离心管中加入 900μl 洗涤液 A，用力摇晃离心管 10 次，直至管内磁珠分布均匀；8000 rpm 离心 30s-1min，弃上清。
- 4) 在离心管中加入 600μl 洗涤液 B，用力摇晃离心管 10 次，直至管内磁珠分布均匀；8000 rpm 离心 30s-1min，弃上清。
- 5) 在离心管中加入 600μl 洗涤液 B，用力摇晃离心管 10 次，直至管内磁珠分布均匀；8000 rpm 离心 30s-1min，弃上清。
- 6) 在离心管中加入 600μl 洗涤液 B，用力摇晃离心管 10 次，直至管内磁珠分布均匀；8000 rpm 离心 30s-1min，弃上清。
- 7) 打开管盖，于室温干燥2-3分钟，至磁珠表面无明显液体。将洗脱液放置于80℃预热（2-3分钟）。
- 8) 离心管中加入50-100μL预热好的洗脱液，用枪头吹吸至磁珠分布均匀或高速涡旋10-15次（溶液完全涡旋震荡、磁珠分布均匀算作一次）。80℃温育6分钟，期间每隔1分钟左右摇晃离心管10-15次（切勿颠倒），使管内磁珠始终保持均匀分布的状态。温育结束后，将离心管高速涡旋10-15次（溶液完全涡旋震荡、磁珠分布均匀算作一次）。也可以用更少的量进行洗脱。
- 9) 将离心管置于磁力架上，静置1分钟后，吸取上清到一个无核酶干净的离心管中，此即为纯化后的RNA溶液。液体可以直接进行下面的分子生物学分析，如需检测mRNA，建议

直接逆转录得到CDNA，RNA可短期保存于-20℃，长期保存于-70℃。

【注意事项】

- 1) 所有试剂必须为完全澄清的液体，如果出现浑浊或者沉淀，请将其置于37℃孵育直至澄清。
- 2) 为了达到最佳脱蜡效果，建议使用水浴锅进行样本预处理，并确保水浴锅的温度准确达到设定温度后继续操作。
- 3) 本试剂建议石蜡组织切片不超过10μm厚度切片，切片用量不超过5片。若使用的样本较厚或石蜡切片大于5片，建议适当增加脱蜡剂用量。
- 4) 脱蜡结束时，管内无石蜡片、液体趋于透明，组织样本悬浮于液体中；若脱蜡后液体浑浊，仍可看到未溶解的白色石蜡，可适当增加脱蜡剂的用量，重复脱蜡步骤。
- 5) 水浴锅、金属浴、核酸提取仪器温度设置需要考虑到仪器显示温度与深孔板内实际温度的偏差，并适当调整，确保液体内温度准确。
- 6) 提取过程中发现磁珠有小块凝结，属于核酸结合磁珠的正常现象，若发现磁珠凝聚成单一块状且洗涤过程依旧成块，请减少样本数量。
- 7) 洗脱步骤可能会存在磁珠残留，吸取样品进行后续操作时应尽量避免吸入磁珠。
- 8) 手工提取步骤1和步骤8，可将离心管放置于恒温杂交仪中加热并持续保持混匀，使磁珠均匀分散。
- 9) 本试剂盒涉及的检测样本应视为具有传染性物质，操作和处理均需符合卫生部《微生物医学实验室生物安全通用准则》和《医疗废物管理条例》相关要求。

【预防RNase污染】

1. 经常更换新手套。因为皮肤经常带有细菌，可能导致RNase污染。
2. 使用无RNase的塑料制品和枪头避免交叉污染。
3. RNA在裂解液中时不会被RNase降解。但提取后继续处理过程中应使用不含RNase的塑料和玻璃器皿。玻璃器皿可在150℃烘烤4 h，塑料器皿可在0.5 M NaOH中浸泡10 min，然后用水彻底清洗，再灭菌，即可去除RNase。
4. 配制溶液应使用RNase-Free ddH₂O。（将水加入到干净的玻璃瓶中，加入DEPC至终浓度0.1% (v/v)，混匀后放置过夜，高压灭菌。）

【RNA纯度及浓度检测操作步骤】

完整性：RNA可用普通琼脂糖凝胶电泳（电泳条件：胶浓度1.2%；0.5×TBE电泳缓冲液；150V，15 min）检

测完整性。由于细胞中70%-80%的RNA为rRNA，电泳后UV下应能看到非常明显的rRNA条带。28S rRNA的量约为18S rRNA的两倍，说明RNA的完整性较好。

纯度：OD260/OD280比值是衡量蛋白质污染程度的指标。高质量的RNA，OD260/OD280读数在1.8-2.1之间，比值为2.0是高质量RNA的标志。OD260/OD280读数受测定所用溶液的pH值影响。同一个RNA样品，假定在10 mM Tris, pH7.5溶液中测出的OD260/OD280读数1.8-2.1之间，在水溶液中所测读数则可能在1.5-1.9之间，但这并不表示RNA不纯。

浓度：取一定量的 RNA 提取物，用RNase-Free ddH₂O稀释 n 倍，用RNase-Free ddH₂O将分光光度计调零，取稀释液进行OD260，OD280测定，按照以下公式进行RNA浓度的计算：

$$\text{终浓度 (ng/}\mu\text{l)} = (\text{OD260}) \times (\text{稀释倍数n}) \times 40$$

可以使用nano drop等核酸检测仪器，以及 Aglient 2000 检测RNA 含量，纯度和完整度。

对于不同的石蜡切片样本，得到的 RNA 产量和纯度会有差异，通常 2 片常规 10 μ m 石蜡切片样本，RNA 产量可达 1 μ g；OD260/280：2.0 左右，OD260/230：1.8 以上。

品质保证：所有产品由 BioTNT 进行品质保证。如果客户使用中有任何问题，都可以联系 BioTNT 公司。