



核酸提取或纯化试剂 说明书

【产品名称】

核酸提取或纯化试剂

【包装规格】

50次/盒

【预期用途】

用于核酸提取、富集、纯化步骤，其处理后的产物用于临床体外检测使用。

【检验原理】

本试剂盒使用专门优化的裂解液和蛋白酶K，释放福尔马林固定或组织切片样本中的RNA，无需过夜操作；消化后的样品在较高的温度孵育后，去除由福尔马林交联造成的抑制作用，有效释放组织切片中的RNA，而避免危害RNA的完整性；组织裂解后，RNA结合于硅基包被磁珠表面。漂洗后，高纯度的RNA洗脱于洗脱缓冲液或去离子水中，经过纯化的RNA可直接用于RT-PCR、Real-Time PCR和印迹分析等实验。

【主要组成成分】

试剂名称	50次/盒	
	规格	数量
脱蜡剂	30 mL/瓶	1瓶
裂解缓冲液1	15 mL/瓶	1瓶
裂解缓冲液2	25 mL/瓶	1瓶
漂洗缓冲液1	40 mL/瓶	1瓶
漂洗缓冲液2（浓缩液）	11 mL/瓶	1瓶
洗脱缓冲液	10 mL/瓶	1瓶
蛋白酶K	1.25 mL/支	1支
DNA酶	1000 U/支	1支
10×DNA酶反应液	1 mL/支	1支
磁珠悬浮液	1 mL/支	1支

【储存条件及有效期】

DNA酶和10×DNA酶反应液-20℃保存，其余组分0-35℃保存，有效期12个月。

DNA酶和10×DNA酶反应液冰袋运输，其余组分常温运输，运输时间建议不超过7天。

【样本要求】

1. 适用样本类型：福尔马林固定、石蜡包埋组织。
2. 样本处理与保存：常温处理保存。
3. 样本运输：常温运输。

【检验方法】

自备仪器、试剂

1. 手动单管提取：
 - 1) 恒温混匀仪——货号：CW2593
 - 2) 2/15 mL磁力架——货号：CW2594
 - 3) 异丙醇
2. 与康为CWE2100全自动核酸提取仪的匹配：
 - 1) 康为CWE2100全自动核酸提取仪
 - 2) 恒温混匀仪——货号：CW2593
 - 3) 异丙醇
 - 4) 96孔深孔板——货号：CW2523、8联深孔磁套——货号：CW2524

操作步骤

1. 样本处理

1.1 石蜡包埋样本

- 1.1.1 用手术刀将组织块中多余的石蜡修剪掉，露出组织后切成5-10 μm 的薄片。
- 1.1.2 取约 $1 \times 1 \text{ cm}^2$ 的切片（共约1-5片切片）置于离心管（自备）中，加入500 μL 脱蜡剂，涡旋震荡10秒。短暂离心收集样本到管底。56 $^{\circ}\text{C}$ 孵育3分钟，期间涡旋震荡2次。12,000 rpm离心2分钟，小心吸弃上清液，不要吸到沉淀。
- 1.1.3 **注意：1) 如果样品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) 如样品量多可增加脱蜡剂量至500 μL 。
 - 3) 脱蜡剂低于18 $^{\circ}\text{C}$ 会凝固，如果凝固不影响下面的实验。

1.2 福尔马林等固定液中的样本

- 1.2.1 取约20 mg的样本，切成小块，置于离心管中。
- 1.2.2 加入500 μL 10mM PBS (PH 7.4)，涡旋振荡，12,000 rpm（~13,400 \times g）离心1分钟后弃上清。
- 1.2.3 重复1.2.2三次。
- 1.3 上述管中加入150 μL 裂解缓冲液1和20 μL 蛋白酶 K，涡旋震荡混匀。
- 1.4 56 $^{\circ}\text{C}$ 孵育15分钟，80 $^{\circ}\text{C}$ 孵育15分钟。

注意：56 $^{\circ}\text{C}$ 孵育后的样品可置于室温，直至温度达到80 $^{\circ}\text{C}$ 后再把样品置于80 $^{\circ}\text{C}$ 孵育。

- 1.5 置于冰上3min，12,000 rpm离心15分钟，将上清（裂解产物）转移至新的离心管中，小心不要吸到沉淀。

2. 手动单管操作

- 2.1 向离心管中加入320 μL 裂解缓冲液2并涡旋震荡混匀。
- 2.2 向离心管中加入300 μL 异丙醇与20 μL 磁珠悬浮液后涡旋震荡混匀5秒钟，之后将离心管固定于25 $^{\circ}\text{C}$ 、1600 rpm的恒温混匀仪上震荡结合10分钟。
- 2.3 将离心管固定于磁力架上静置1分钟，之后弃去溶液。
- 2.4 向离心管中加入350 μL 漂洗缓冲液1，涡旋震荡5秒钟后置于25 $^{\circ}\text{C}$ 、1600 rpm的恒温混匀仪上震荡结合1分钟。
- 2.5 将离心管固定于磁力架上静置1分钟，之后弃去溶液。
- 2.6 配制DNase I 混合液：取52 μL 灭菌水，向其中加入8 μL 10 \times DNA酶反应液和20 μL DNA酶（1 U/ μL ），混匀，配制成终体积为80 μL 的反应液。
- 2.7 向离心管中直接加入80 μL DNA酶混合液，20-30 $^{\circ}\text{C}$ 孵育15分钟，期间每隔5分钟上下颠倒混匀1次。
- 2.8 将离心管固定于磁力架上静置1分钟，之后弃去溶液。
- 2.9 向离心管中加入350 μL 漂洗缓冲液1，涡旋震荡5秒钟后置于25 $^{\circ}\text{C}$ 、1600 rpm的恒温混匀仪上震荡结合1分钟。
- 2.10 将离心管固定于磁力架上静置1分钟，之后弃去溶液。
- 2.11 向离心管中加入500 μL 漂洗缓冲液2，涡旋震荡5秒钟后置于25 $^{\circ}\text{C}$ 、1600 rpm的恒温混匀仪上震荡结合1分钟。
- 2.12 将离心管固定于磁力架上静置1分钟，之后弃去溶液。
- 2.13 重复2.11-2.12一次。
- 2.14 离心管短暂离心后，将其重新固定于磁力架上用移液器去除管底溶液，之后开盖室温放置5分钟使乙醇充分挥发。
- 2.15 向离心管中加入50-100 μL 洗脱缓冲液后涡旋震荡使磁珠充分悬浮于洗脱液中，之后将离心管固定于56 $^{\circ}\text{C}$ 、1600 rpm的恒温混匀仪上震荡洗脱10分钟。
- 2.16 将离心管固定于磁力架上静置2分钟，之后将洗脱液转移至新的离心管中-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

3. 与CWE2100的匹配

产品与CWE2100匹配后可一次性从1-32份固定组织样本中提取RNA。

- 3.1 配制DNase I 混合液：取52 μL 灭菌水，向其中加入8 μL 10 \times DNA酶反应液和20 μL DNA酶（1 U/ μL ），混匀，配制成终体积为80 μL 的反应液。
- 3.2 按下表将样品与试剂加入到96孔深孔板的相应位置中：

位置	试剂及用量
1 & 7 列	裂解产物: 全部 裂解缓冲液2: 320 μ L 磁珠悬浮液: 20 μ L 异丙醇: 300 μ L
2 & 8 列	漂洗缓冲液1: 350 μ L
3 & 9 列	DNase I混合液: 80 μ L
4 & 10 列	漂洗缓冲液2: 500 μ L
5 & 11 列	漂洗缓冲液2: 500 μ L
6 & 12 列	洗脱缓冲液: 70 μ L

- 3.3 将8联深孔磁套与96孔深孔板放入CWE2100中，运行“FFPE RNA”提取程序。
- 3.4 约25分钟后程序暂停，此时向3&9列中加入漂洗缓冲液1: 350 μ L，继续运行程序。
运行结束，将96孔深孔板和8联深孔磁套从仪器中取出，把6&12列中的洗脱产物转移至离心管中-20℃保存备用。
- 3.5

【注意事项】

1. 在实验前，应仔细阅读本说明书。
2. 获得样品后，要尽快将样品在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。
3. 确保包埋前的样品彻底脱水，残留的福尔马林会抑制蛋白酶K的作用。
4. 磁珠悬浮液严禁冰冻、离心。冰冻、离心可能会对磁珠造成不可逆的损害。磁珠悬浮液使用前需涡旋震荡20秒使其充分混匀。
5. 第一次使用前应按试剂瓶标签说明先在漂洗缓冲液2（浓缩液）中加入无水乙醇并做好标记。
6. 使用前请检查裂解缓冲液1、裂解缓冲液2和脱蜡剂是否出现结晶或沉淀，如有结晶或沉淀，请将裂解缓冲液1、裂解缓冲液2和脱蜡剂于56℃水浴重新溶解。
7. 实验过程中，磁珠在溶液中的充分混匀对于提取的得率与纯度都有很大的影响。实验过程中务必使磁珠与溶液充分混匀。不同厂家的恒温混匀仪震荡混匀效果有一定差异，实验过程中请注意观察磁珠状态。如出现磁珠贴壁等未充分混匀的现象，请用移液器吹吸混匀或调整震荡频率。
8. 检验方法中涉及到的“FFPE RNA”提取程序由康为世纪另行提供。