

【产品名称】

通用名称：总 RNA 提取试剂盒

英文名称：Total RNA Extraction Kit

【包装规格】

12 人份/盒；24 人份/盒

【预期用途】

用于石蜡包埋组织（FFPE）样本总RNA的提取、富集、纯化等步骤。其处理后的产物用于临床体外检测使用。

【反应原理】

利用Buffer FTRL和蛋白酶K裂解并释放样品中的核酸，经过DNase I将DNA消化，剩余的RNA在Buffer FTRB提供的高盐环境下结合到吸附柱上，再通过Buffer FTRW清洗去蛋白去盐，最后用无RNase水洗脱，得到高纯度高质量的RNA。

【主要组成成分】

本试剂盒由包装 A 和包装 B 组成。其中包装 A 于-20±5℃保存，包装 B 于室温保存。

1、本试剂盒包装 A 的主要组成成分

序号	组分名称	组分含量	
		12 人份/盒	24 人份/盒
1	蛋白酶 K	250μL×1 管	500μL×1 管
2	DNase I Buffer	500μL×1 管	1000μL×1 管
3	DNase I	400μL×1 管	800μL×1 管
4	无 RNase 水	1 mL×1 管	1 mL×2 管

注：不同批号试剂盒中各组分不能混合或交替使用。

2、本试剂盒包装 B 的主要组成成分

序号	组分名称	组分含量	
		12 人份/盒	24 人份/盒
5	Buffer FTRL	4mL×1 瓶	8mL×1 瓶
6	Buffer FTRB	4 mL×1 瓶	8 mL×1 瓶
7	Buffer FTRW	5 mL×1 瓶	5 mL×2 瓶
8	吸附柱	12 个×1 包	24 个×1 包
9	收集管	24 个×1 包	24 个×2 包
10	1.5mL 离心管	12 个×1 包	24 个×1 包
11	2.0mL 离心管	12 个×1 包	24 个×1 包

注：不同批号试剂盒中各组分不能混合或交替使用。

3、本试剂盒不包含，但需配套使用的试剂、耗材及仪器：

1. 试剂类：二甲苯或者十二烷(推荐)、无水乙醇；

2. 耗材类：小刀、无 RNase 带滤芯吸头、1.5mL 离心管、一次性口罩和手套；

3. 仪器类：高速台式离心机（附带 2mL 离心管的转子）；可以加热至 37℃、56℃和 80℃的加热装置；掌上离心机。

【储存条件及有效期】

包装A置于-20℃±5℃保存；包装B置于室温(10-30℃)保存；可稳定保存6个月。

【适用仪器】无

【样本要求】

- 1、本试剂盒用于石蜡包埋组织样品的总 RNA 提取。
- 2、石蜡包埋组织样品建议切成厚度 5μm 左右，在室温保存 2 年内使用。
- 3、使用本试剂盒提取的 RNA 样本，可在-20℃以下保存 3 个月，反复冻融不得超过 3 次。

【检验方法】

1. 试剂准备：

- 1) 取出试剂包装 A，于 2~8℃条件下彻底融化，混匀离心后备用；
- 2) 在 Buffer FTRW 加入无水乙醇，混匀后使用，无水乙醇加入量请参见瓶签标注。

2. 前处理：

- 1) 切下2~10片厚度为5μm（重约10mg）的组织块，尽量切去石蜡部分，并将含有组织块部分的石蜡切碎，置于一个1.5mL的离心管中。
- 2) 加入1mL二甲苯或者十二烷(推荐)，并振荡30s，室温放置5min，室温12,000 rpm以上离心3min，枪头吸弃上清，小心不要吸到沉淀。
- 3) 向沉淀中加入1mL无水乙醇，振荡离心管20s，室温12,000 rpm 以上离心3min，小心完全吸弃上清，打开管盖，室温干燥组织沉淀 15min，乙醇需要彻底挥发。

3 提取步骤

- 1) 向沉淀加入300μL的Buffer FTRL，并加入20μL蛋白酶K溶液，振荡离心管重悬沉淀；将离心管置于56℃温浴15min（每隔2min混匀一次），随后置于80℃ 15 min，然后置于冰上放置3min；
- 2) 室温12,000 rpm以上离心15min。

注意，此时在冰盒上配制DNase I 反应液：对于单个样品，10μL无RNase水+35 μL 的Buffer DNase

I+30 μ L的DNase I, 实际配制量按照样品的数量按比例放大。

3) 吸取300 μ L上清转至2.0mL离心管中, 并加入配置好的75 μ L的DNase I 反应液, 颠倒混匀, 37 $^{\circ}$ C放置15min。

4) 向离心管中加入300 μ L Buffer FTRB, 再加入945 μ L无水乙醇, 充分混匀, 掌上离心机离心10s。

5) 按样本数量, 将吸附柱和收集管组合在一起, 并进行编号。

6) 用移液器吸取700 μ L样品以及有可能形成的沉淀, 加入带有收集管的吸附柱中, 轻盖盖子, 静置2min, 室温10000rpm 离心1min, 弃尽废液; 将吸附柱放回收集管中。

7) 重复步骤6), 直至所有样品全部加入到吸附柱中。

8) 向吸附柱中加入700 μ L Buffer FTRW, 轻盖盖子, 室温10000rpm离心1min, 弃尽废液, 将吸附柱放回收集管中。

9) 重复一次步骤8)。

10) 将吸附柱转移至一新的收集管中, 不加Buffer FTRW10000rpm离心5min, 用于干燥硅胶膜。

注意: 完全去除洗液对最后溶解是非常重要的, 洗液的残留会影响最终的洗脱。

11) 将吸附柱转移至1.5mL离心管中, 用移液器向硅胶膜中央滴加50 μ L无RNase水, 轻盖管盖, 室温静置2min, 10,000rpm离心2min, 得到RNA溶液, RNA溶液请于-20 $^{\circ}$ C以下保存。

注意: 无RNase水体积不应少于30 μ L, 体积过小影响回收效率; 若样本量比较少或样本比较珍贵, 可将RNA洗脱液重新加入吸附柱中, 10,000rpm离心2min, 以提高RNA洗脱效率。

4. 质量检测:

通过测定RNA洗脱液的A260来确定RNA产量, 通常情况下A260值在 0.1~1.0之间数据比较可信。如果不在此范围内, 请稀释或浓缩样品调整; 通过测定RNA洗脱液的A280来确定RNA纯度, A260/A280比值在1.8-2.2之间, 小于1.8表示可能有蛋白质污染。

由于FFPE样本在固定和包埋过程涉及甲醛固定以及加热等过程, FFPE样本核酸通常发生片段化并且会被甲醛化学修饰, 所以FFPE样品所提取的总RNA琼脂糖凝胶电泳条带会呈降解弥散状, 其降解程度取决于固定包埋条件和存放时间。

【产品性能指标】

1、提取效率: 10mg 小鼠肝脏组织石蜡样本提取 RN

A 含量 \geq 100ng/ μ L。

2、提取纯度: 10mg 小鼠肝脏组织石蜡样本提取 RNA 的 A260/A280 比值在 1.8-2.2 之间。

【注意事项】

1. 使用前请仔细阅读本说明书, 操作人员应接受过专业培训, 并具有实际试验操作经验和能力。
2. 不同批号试剂盒中各组分不可以互换。
3. 若试剂已超过有效期, 则不能再使用。

【参考文献】

1. Sanbrook J, Russel D. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M]. 3rd ed. New York:Cold Spring Harbor Laboratory Press,2001.
2. Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol- chloroform extraction: twenty-something years on[J], Nat Protoc,2006,1(2):581-585.
3. Villarreal J V, Jungfer C, Obst U, et al. DNase I and Proteinase K eliminate DNA from injured or dead bacteria but not from living bacteria in microbial reference systems and natural drinking water biofilms for subsequent molecular biology analyses [J]. Journal of Microbiol Methods, 2013, 94(3): 161-169.

【基本信息】

备案人/生产企业名称: 苏州吉玛基因股份有限公司

住所: 苏州工业园区东平街199号

联系方式: 0512-86668828

售后服务单位名称: 苏州吉玛基因股份有限公司

生产地址: 苏州工业园区东平街199号

生产备案凭证编号:

【医疗器械备案凭证编号/产品技术要求编号】

苏苏械备20180720

【说明书核准日期】2018年8月

【生产日期及有效期】见标签