**Oligo (dT)25磁珠法mRNA提取试剂盒 MRN1675**

**Technical literature is available at:** [**www.mesgenbio.com**](http://www.mesgenbio.com)**. E-mail MesGen Technical Services if you have questions on use of this system: tech@mesgenbio.com**

****

**产品包装：2 tests □ 10 tests □ 25 tests □**

**产品简介**

MesGen-Oligo (dT)25磁珠法mRNA提取试剂盒适用于从总RNA或者直接从动物组织、动物细胞、植物细胞中快速分离出高纯度且完整的mRNA。磁珠上的oligo-dT25与mRNA的Poly-A杂交，仅需几步洗涤、洗脱和磁分离操作，即可获得高纯度的mRNA。所有操作都在单管中1次完成，操作简单、易行。

**试剂盒组成**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **产品组成** | **2 tests** | **10 tests** | **25 tests** |
| **Binding buffer** | 2.5ml | 25ml | 65ml |
| **Lysis/Binding buffer** | 2ml | 20ml | 50ml |
| **Wash buffer A** | 5ml | 50ml | 125ml |
| **Wash buffer B** | 5ml | 50ml | 125ml |
| **Oligo (dT)25磁珠** | 200ul | 2ml | 5ml |

**操作流程**

**1.  磁珠预处理**

（1）将磁珠悬液漩涡振荡30 s，使磁珠充分重悬；

（2）取出100 μL磁珠悬液至1.5 mL EP管中；置于磁力架中，磁分离，移去上清液，从磁力架上取下反应管；

（3）加入1mL **Binding buffer**重悬磁珠，用移液器缓慢吹打5~10次或漩涡震荡30 s，磁分离，去上清；

（4）加入100 μL**Binding buffer**重悬磁珠；

**2.  样品前处理**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **对应样品** | **样品量** | **建议磁珠的使用量** |
| 动物组织 | ~50 mg | 100 μL |
| 植物组织 | ~100 mg | 100 μL |
| 培养细胞 | ~1×107 | 100 μL |
| 总RNA | ~100μg | 100 μL |

（1）动物 / 植物组织

a. 将所需量的植物或动物组织在液氮中研磨成粉末，保持冷冻状态，避免RNA降解；

b. 将一定量（参考样品对照表）冷冻粉收集并转移到新的EP管中，添加1mL **Lysis/Binding buffer**，匀浆器匀浆1-2min至裂解完全。该步骤尽量快速操作，避免mRNA降解；

c. 在室温下以14,000rpm离心1 min，并将所有上清液转移至一个新的EP管。上清液可用于mRNA纯化，或保存在-80℃备用；

（2）细胞悬浮液

a. PBS缓冲液中清洗细胞，室温下以4,000rpm离心5min沉淀细胞并丢弃上清液；

b. 每1-4×106个动物或植物细胞加1mL **Lysis/Binding buffer**。通过移液吹打多次，裂解细胞至溶液变粘稠；

c. 通过DNA剪切降低粘度。用1-2注射器通过21#针头3次吸入和吸出剪切裂解液中的DNA来降低溶液粘度。可能会产生泡沫，但并不影响mRNA的得率；

d. 在室温下以14,000rpm离心5 min，并将所有上清液转移至一个新鲜的EP管。上清液可进行mRNA纯化，或保存在-80℃以备将来使用；

**3.  提取mRNA**

a. 制备动物/植物组织裂解液或从培养细胞和细胞悬浮液中制备裂解液；

b. 对磁珠进行预处理；

c. 将裂解液与磁珠混合（参考样品对照表），室温下旋转混合3-5分钟；

d. 磁分离，静置2min，去上清；

e. 室温下分别用1mL **Wash buffer A**和1mL **Wash buffer B**清洗磁珠，去除可能的污染物。

f. 进入如下之一操作：

如果分离mRNA用于酶促下游应用（例如固相cDNA合成），**Wash buffer B**（500μL）洗涤一次，随后用酶缓冲液洗涤一次，可用于下游应用；

如从磁珠中洗脱mRNA，**Wash buffer B**洗涤后并加入10～20μl 10mMTris-HCl，75~80°C孵育2min，然后快速将含mRNA的上清转移到新RNase-free的EP管；

**4. Total RNA中纯化mRNA**（以纯化75ug Total RNA中mRNA为例）

a. 取100uL含有75ug Total RNA 与100uL **Binding buffer**混合。（若Total RNA含量低于75ug/100uL，直接混合；若Total RNA含量高于75ug/100uL，用DEPC水稀释至75ug/100uL后混合）

b. 65°C孵育2min，打开RNA二级结构，结束后迅速置于冰上；

c. 将200 uL混合液与100 uL洗涤后磁珠在室温下旋转混合3-5min。75ug Total RNA对应1mg磁珠，磁珠应预先洗涤并重分散在100 uL**Binding buffer**中；

d. 磁分离，静置2min，去上清；

e. 室温下分别用200 uL **Wash buffer B**清洗磁珠，磁分离，去上清。重复该步骤1次；

f. 加入10～20μl的10mM Tris-HCl，75~80°C孵育2min，然后快速将含有mRNA的上清液转移到新的RNase-free的EP管；

**注意事项**

实验操作：在进行RNA实验时，必须注意要抑制RNase的作用。因此，除了要防止通过使用器具以及试剂中混入RNase，即注意实验环境之外，还要防止通过唾液、汗等混入RNase，建议戴上口罩和手套。

实验器材：所有实验涉及的耗材均需要去核酸酶处理，在实验器材允许情况下，对一次性塑料制品高温高压湿热灭菌处理。在使用玻璃器皿的情况下，请干热灭菌，或在0.1% DEPC溶液中，37℃下浸泡12h，再高温高压湿热灭菌（121℃，30分钟）。

**自备材料**

磁力架、Nuclease-free离心管、各种规格吸头等其他试剂盒中不含的耗材产品；

**储存条件**

2-8°C，勿冻结。常温运输，保存期1年。

**仅供科学研究，不得用于临床诊断、治疗**