Oligo $(dT)_{25}$ 磁珠法 mRNA 提取试剂盒 MRN1675

Technical literature is available at: www.mesgenbio.com. E-mail MesGen Technical Services if you have questions on use of this system: tech@mesgenbio.com

MESGEN™ INNOVATION BIOTECHNOLOGY

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-dT_{25}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	~1×10^7	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 1-4×10^6 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