

SteadyPure Mag mRNA 纯化试剂盒 (磁珠法)

SteadyPure Mag mRNA Isolation Kit

Code No. AG21204

包装量: 50 rxns

保存温度: 4°C

产品概述

本产品是利用偶联 Oligo (dT) 的磁珠专一性捕获信使 RNA (mRNA) 的试剂盒, 基于磁珠表面的 Oligo (dT) 与 mRNA 尾部的 Ploy A 退火形成杂交体, 再通过洗涤去除杂质, 最后用 *Mag* Elution Buffer 或 RNase Free Water 洗脱, 即可获得纯化的 mRNA。本产品可从 1 ~ 50 μ g 动物组织、植物组织、细胞等多种生物样本的总 RNA 中分离纯化得到高收量、高纯度的 mRNA, 核糖体 RNA 残留率低。经本产品纯化获得的 mRNA 可直接用于文库构建、NGS、微阵列、RT-PCR、基因表达分析等分子生物学实验。

安全操作

实验过程中可能会接触到强变性剂, 实验操作开始前请穿戴合适的实验服、护目镜、口罩和手套, 然后再进行实验操作。

【注意: 实验过程中产生的废液需要收集在废液桶中专门处理。】

如果 *Mag* Buffer BB、*Mag* Buffer WB 不小心溅出, 请立刻用清水擦拭干净。

产品组成

<i>Mag</i> Buffer BB	15 ml
<i>Mag</i> Buffer WB	15 ml X 2 pcs
<i>Mag</i> Elution Buffer	5 ml
RNase Free Water	10 ml
<i>MagPure</i> Oligo (dT) Beads ^{*1、*2}	1 ml

*1: *MagPure* Oligo (dT) Beads 避免冻存或使其干裂。

*2: *MagPure* Oligo (dT) Beads 每次取用前应涡旋振荡混匀使其充分悬浮, 否则可能会导致吸取磁珠的量不一致或磁珠上偶联的 Oligo (dT) 暴露不完全, 从而影响磁珠结合 mRNA 的能力。

保存及运输

保存温度: 4°C 保存

运输温度: 4°C 运输

实验前准备

离心管 (RNase-free)、PCR 管 (RNase-free)、移液器、磁力架、涡旋振荡器、PCR 仪

注意事项

- 操作流程中的室温操作建议温度为 15 ~ 30°C。
- MagPure* Oligo (dT) Beads 切勿冻存或使其干裂, 否则可能会出现磁珠团聚、官能团脱落、磁珠形态发生变化等问题, 影响磁珠结合 mRNA 的能力, 也会导致磁珠非特异性吸附核糖体 RNA。
- 为了纯化获得高收量、高质量的 mRNA, 投入完整度良好的总 RNA 至关重要。一般情况下, 应确保总 RNA 的 RIN 值 ≥ 7.0 , 且无 RNase 污染。推荐使用本公司 RNA 提取产品, 如: *SteadyPure* 通用型 RNA 提取试剂盒 (Code No. AG21017) 或 *AG RNAex Pro* RNA 提取试剂 (Code No. AG21101), 以获得高质量的总 RNA。
- “磁珠准备”过程中磁珠的充分悬浮至关重要, 否则可能会导致吸取磁珠的量不一致或磁珠上偶联的 Oligo (dT) 暴露不完全, 从而影响磁珠结合 mRNA 的能力。请按照后续操作流程进行操作。
- “磁珠结合 mRNA”过程中磁珠的悬浮需充分且轻柔, 否则可能会导致 mRNA 结合不充分或者 mRNA 脱落, 从而影响 mRNA 的收量。请按照后续操作流程进行操作。
- “洗涤”过程中磁珠的悬浮需充分且轻柔, 否则可能会导致 mRNA 洗涤不充分或者 mRNA 脱落, 从而影响 mRNA 的收量及纯度。请按照后续操作流程进行操作。

7. 操作过程中磁性分离时应确保磁珠与 Buffer 彻底分离, 用移液器吸取上清液时, 应注意不要触碰磁珠, 避免磁珠的损失, 从而影响 mRNA 的收量。
8. 一般情况下, 磁性分离 1 min 可使磁珠与 Buffer 彻底分离, 但不同磁力架的磁力会有所不同, 磁性分离的时间可根据实际情况进行调整, 以确保磁珠完全吸附于离心管壁, 与 Buffer 彻底分离。
9. 操作过程中, 用移液器将上清液吸取完全后, 应尽快进行后续操作, 避免磁珠长时间暴露于空气中, 导致磁珠干裂。
10. 纯化获得的 mRNA 可直接用于后续实验。如果需要保存, 请将 mRNA 置于 -80°C 冻存。
11. 操作过程中, 应预防 RNase 污染, 需注意以下几方面:
 - ① 使用 RNA 操作专用实验台, 经常更换新手套, 穿戴 RNA 专用实验服, 实验过程中尽量不要说话及来回走动, 操作过程中避免物品从离心管上方经过。
 - ② 严防操作环境、使用的容器、耗材和试剂的 RNase 污染。

操作流程图

磁珠准备

以下操作以 1 个样本为例进行磁珠的准备。若需要同时纯化多个样本, 可统一进行磁珠的准备, 在以下“磁珠准备”步骤中, 磁珠的用量及各试剂的添加量需按样本个数等比例增加。

1. 将 *MagPure* Oligo (dT) Beads 从 4°C 取出, 使其温度恢复至室温备用。
2. *MagPure* Oligo (dT) Beads 恢复至室温后, 涡旋振荡 3 min 或使用移液器反复吸打 10 次以充分悬浮磁珠, 吸取 20 μ l 磁珠悬液加入到新的离心管中, 再加入 100 μ l *Mag* Buffer BB, 用移液器吸打混匀 6 ~ 10 次以确保混合液充分混匀。
【注: 一般情况下涡旋振荡 3 min 或使用移液器反复吸打 10 次可充分悬浮磁珠, 但不同涡旋混匀仪的混匀频率或吸打的程度可能不一致, 可根据需要调整混匀时间及吸打次数, 确保磁珠充分悬浮。】
3. 室温下将离心管置于磁力架上磁性分离 1 min 直至磁珠全部吸附到管壁, 用移液器去除管内液体, 注意不要触碰到磁珠。
4. 将离心管从磁力架上取下, 再加入 100 μ l *Mag* Buffer BB, 用移液器吸打 6 ~ 10 次以使混合液充分混匀。
5. 室温下将离心管置于磁力架上磁性分离 1 min 直至磁珠全部吸附到管壁, 用移液器去除管内液体, 注意不要触碰到磁珠。
6. 将离心管从磁力架上取下, 向含磁珠的离心管中加入 50 μ l *Mag* Buffer BB, 用移液器吸打混匀 6 ~ 10 次以充分重悬磁珠。

样本准备

7. 向 PCR 管中加入 1 ~ 50 μ g 总 RNA, 如体积不足 50 μ l, 请用 RNase Free Water 补足至 50 μ l, 置于冰上备用。

磁珠结合 mRNA

孵育后磁珠已与 mRNA 结合, 使用移液器吸打混匀重悬磁珠时需轻柔, 避免剧烈吸打或涡旋混匀, 否则可能会导致 mRNA 脱落, 从而影响 mRNA 的收量。

8. 吸取 50 μ l 上述重悬的磁珠加入至步骤 7 含有总 RNA 的 PCR 管中, 用移液器吸打 6 ~ 10 次以使混合液充分混匀。
9. 将上述 PCR 管放入 PCR 仪中进行孵育, 使磁珠表面的 Oligo (dT) 与 mRNA 尾部的 Ploy A 形成杂交体。

反应条件^{*3}:

65°C	5 min
25°C	5 min
4°C	2 min

*3: 冷却至 4°C 后即可将 PCR 管取出进行后续实验操作。

10. 孵育完成后将 PCR 管取出, 用移液器轻柔吸打 6 ~ 10 次重悬磁珠, 室温孵育 5 min。
11. 孵育完成后再次轻柔吸打 6 ~ 10 次重悬磁珠, 室温孵育 5 min 后, 置于磁力架上磁性分离 1 min 直至磁珠全部吸附到管壁, 用移液器去除管内液体, 注意不要触碰到磁珠。



洗涤

洗涤操作时，磁珠已与 mRNA 结合，应使用移液器轻柔吸打混匀重悬磁珠进行洗涤，避免剧烈吸打或涡旋混匀，否则可能会导致 mRNA 脱落，从而影响 mRNA 的收量。

- 将上述 PCR 管从磁力架上取下，加入 200 μ l *Mag* Buffer WB，用移液器轻柔吸打 6 ~ 10 次以充分重悬磁珠，重悬后置于磁力架上磁性分离 1 min 直至磁珠全部吸附到管壁，用移液器去除管内液体，注意不要触碰到磁珠。
- 重复步骤 12 一次。

可根据需求选择不同的洗脱方法：

方法一（一轮洗脱）：mRNA 收量较多，但核糖体 RNA 占比较高。

洗脱

- 向上述 PCR 管中加入 50 μ l *Mag* Elution Buffer 或 RNase Free Water，用移液器吸打 6 ~ 10 次充分重悬磁珠后，放入 PCR 仪中进行孵育。
反应条件⁴：

80°C	2 min
25°C	2 min

⁴：冷却至 25°C 后即可将 PCR 管取出进行后续实验操作。

【注：*Mag* Elution Buffer 或 RNase Free Water 的添加量可根据实际需求的 mRNA 浓度调整，若需求较高浓度的 mRNA，可适当降低 *Mag* Elution Buffer 或 RNase Free Water 的添加量（例：15 ~ 50 μ l）。】

- 孵育完成后请将上述 PCR 管取出，置于磁力架上磁性分离 2 min，直至磁珠完全吸附到管壁，转移全部上清液至新的离心管中，注意不要触碰到磁珠，否则可能会影响 mRNA 的纯度。纯化获得的 mRNA 可立即用于后续实验或置于 -80°C 冻存。

方法二（两轮洗脱）：核糖体 RNA 占比低，但 mRNA 的收量相较“方法一”略低。

第一轮洗脱

- 向上述 PCR 管中加入 50 μ l *Mag* Elution Buffer，用移液器吸打 6 ~ 10 次充分重悬磁珠后，放入 PCR 仪中进行孵育。
反应条件⁵：

80°C	2 min
25°C	2 min

⁵：冷却至 25°C 后即可将 PCR 管取出进行后续实验操作。

磁珠与 mRNA 再次结合

- 孵育完成后请将上述 PCR 管取出，加入 50 μ l *Mag* Buffer BB，用移液器吸打 6 ~ 10 次以使混合液充分混匀，室温孵育 5 min。
- 孵育完成后再次吸打 6 ~ 10 次重悬磁珠，室温孵育 5 min 后，置于磁力架上磁性分离 1 min 直至磁珠全部吸附到管壁，用移液器去除管内液体，注意不要触碰到磁珠。

洗涤

- 将上述 PCR 管从磁力架上取下，加入 200 μ l *Mag* Buffer WB，用移液器吸打 6 ~ 10 次以充分重悬磁珠，重悬后置于磁力架上磁性分离 1 min 直至磁珠全部吸附到管壁，用移液器去除管内液体，注意不要触碰到磁珠。

第二轮洗脱

18. 向上述 PCR 管中加入 17 μ l *Mag* Elution Buffer 或 RNase Free Water，用移液器吹打 6~10 次充分重悬磁珠后，放入 PCR 仪中进行孵育。

反应条件*6：

80°C	2 min
25°C	2 min

*6: 冷却至 25°C 后即可将 PCR 管取出进行后续实验操作。

【注：*Mag* Elution Buffer 或 RNase Free Water 的添加量可根据实际需求的 mRNA 浓度调整，若需求较高浓度的 mRNA，可适当降低 *Mag* Elution Buffer 或 RNase Free Water 的添加量（例：15~50 μ l）。】

19. 孵育完成后，将 PCR 管取出，置于磁力架上磁性分离 2 min，直至磁珠完全吸附到管壁，转移全部上清液至新的离心管中，注意不要触碰磁珠，否则可能会影响 mRNA 的纯度。纯化获得的 mRNA 可立即用于后续实验或置于 -80°C 冻存。