

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 μg 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

1. 操作流程中的室温操作建议温度为 15 ~ 30°C。
2. *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。
3. 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。
4. “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。
5. “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。
6. “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。

- 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。
- 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。
- 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。
- 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。
- 操作过程中，应预防 RNase 污染，需注意以下几方面：
 - 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。
 - 严防操作环境、使用的容器、耗材和试剂的 RNase 污染。

操作流程

样本准备

- 向 PCR 管中加入 1 ~ 50 μg 总 RNA，如体积不足 50 μl ，请用 RNase Free Water 补足至 50 μl ，置于冰上备用。

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。

- 将 *MagPure* Oligo (dT) Beads 从 4°C 取出，使其温度恢复至室温备用。
- 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 μl 磁珠悬液加入到新的离心管中，再加入 100 μl *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。】
- 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。
- 将离心管从磁力架上取下，再加入 100 μl *Mag* Buffer BB，用移液器吸打 6 ~ 10 次以使混合液充分混匀。
- 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。
- 将离心管从磁力架上取下，向含磁珠的离心管中加入 50 μl *Mag* Buffer BB，用移液器吸打混匀 6 ~ 10 次以充分重悬磁珠。

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。

- 吸取 50 μl 上述重悬的磁珠加入至步骤 1 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。
- 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。
反应程序为： 65°C 5 min， 25°C 5 min， 4°C 2 min。冷却至 4°C 后即可将 PCR 管取出。
- 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。
- 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 μl *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

14. 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。
反应程序为：80°C 2 min，25°C 2 min。冷却至 25°C 后即可将 PCR 管取出。

【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）。】

15. 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

14. 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。
反应程序为：80°C 2 min，25°C 2 min。冷却至 25°C 后即可将 PCR 管取出。

磁珠与 mRNA 再次结合

15. 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。
16. 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

17. 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。
反应程序为：80°C 2 min，25°C 2 min。冷却至 25°C 后即可将 PCR 管取出。

【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。

