

动物 mRNA 提取试剂盒 (磁珠法)

HX3019

产品简介

动物 mRNA 提取试剂盒 (磁珠法) 是一种使用 Oligo (dT)₂₅ 包被的磁珠, 配合优化的缓冲体系, 用于稳定、高效、便捷地从动物组织或培养的动物细胞中快速分离纯化获得高纯度完整 mRNA 的试剂盒。本产品提取的 poly (A) RNA 中也可以包含带有 poly (A) 的 lncRNA 等, 但通常主要为 mRNA, 因此被称为 mRNA 提取试剂盒。一个典型的哺乳动物细胞中, 四种主要的大分子的质量和占比为: RNA, ~20 pg (1%); DNA, ~7 pg (0.3%); protein, ~500 pg (20%); polysaccharide (多糖), ~2 μg (78.7%)。信使 RNA (messenger RNA, 简称 mRNA) 约占总 RNA 质量的 4%, 核糖体 RNA (ribosomal RNA, 简称 rRNA) 约占 80%。Oligo (dT)₂₅ 磁珠表面共价修饰了 25 聚 dT 序列即 Oligo (dT)₂₅, 当真核细胞、动植物组织的裂解液与 Oligo (dT)₂₅ 磁珠混合后, 磁珠表面的寡聚 dT 序列与 mRNA 3'端的 poly(A) 进行碱基配对而特异性结合, 然后在外界磁场的作用下, 磁珠与相应溶液可以快速而高效地分离, 经洗涤充分去除杂质, 最后用洗脱液将 mRNA 从磁珠上洗脱下来, 即可获得高纯度完整 mRNA。本产品具有提取效果稳定、纯度高、速度快、操作便捷等优点, mRNA 提取体系经过反复测试和优化, 能从 10⁶ 个细胞中抽提约 0.1-1 μg mRNA, 20 mg 小鼠肝组织能抽提约 0.2-2 μg mRNA, 20 mg 小鼠肺组织能抽提约 0.1-1 μg mRNA。仅需孵育、洗涤、洗脱等简单的操作, 整个纯化过程不超过 15 min 即可完成, 所有操作都在同一个离心管中完成, 操作便捷。Oligo (dT)₂₅ 磁珠粒径约为 200 nm, 浓度约为 5 mg/ml。每毫克磁珠偶联的 Oligo (dT)₂₅ 约为 300-400 pmol, 每毫克磁珠可纯化约 2-3 μg mRNA, 每毫升磁珠可以纯化约 10-15 μg mRNA。提取的 mRNA 可直接应用于 RT-PCR、qPCR、高通量测序、mRNA 文库的构建、固相 cDNA 文库构建、Northern blot 分析、RACE 等分子生物学实验, 还可用于 mRNA 疫苗的研发等。

产品应用

使用 Oligo (dT)₂₅ 包被的磁珠, 配合优化的缓冲体系, 用于稳定、高效、便捷地从动物组织或培养的动物细胞中快速分离纯化获得高纯度完整 mRNA 的试剂盒。

储存条件

4°C 保存, 一年有效, -20°C 可以保存更长时间。其中 Buffer Beads 长期不使用时, -20°C 保存, 可以保存更长时间。

产品信息

组分编号	组分名称	规格 50 T	规格 200 T	规格 800 T
HX3019-1	Buffer Beads (Oligo (dT) ₂₅ 磁珠悬浮液)	1 ml	4 ml	16 ml
HX3019-2	Buffer P1 (裂解液)	30 ml	120 ml	480 ml
HX3019-3	Buffer P2 (结合液)	30 ml	120 ml	480 ml
HX3019-4	Buffer WB1 (洗涤液 I)	30 ml	120 ml	480 ml
HX3019-5	Buffer WB2 (洗涤液 II)	60 ml	240 ml	480 ml×2
HX3019-6	Buffer EB (洗脱液)	5 ml	20 ml	80 ml

注意事项

1. 本产品的所用试剂和耗材都要求是 RNase-free 和 DNase-free 的,操作过程要严格保证无 RNA 酶和 DNA 酶污染。如果耗材可能有 RNase 污染,可考虑用 0.01% 的 DEPC 水浸泡过夜,然后高温高压灭菌并烘干。如果可能有 DNase 污染,通常高温高压灭菌可以使 DNase 灭活。
2. 温度较低时, Buffer P1 可能会有沉淀产生。使用前必须检查一遍。如有沉淀,可置于室温或者 37°C 水浴溶解,混匀后使用。
3. 需自备磁分离装置,分装或使用磁珠时,请适当涡旋震荡或反复颠倒以确保磁珠充分混匀。磁分离前应适度震荡离心管使磁珠充分分散后再靠近磁场。如果出现磁珠挂壁现象,可以在磁珠聚集后晃动管内液体,使挂壁的磁珠流下。请使用推荐的细胞量或组织量,否则可能造成磁珠聚集,会影响洗涤进而影响抽提获得的 mRNA 纯度。发生磁珠聚集时,洗涤时需尽量分散磁珠,这样可有效改善提取效果。如果发生磁珠聚集现象,建议在后续实验中适当减少总细胞量和总组织量。
4. 由于 mRNA 容易降解,提取获得的 mRNA 推荐尽快用于 RT-PCR 等后续实验。如果不能尽快使用,需要 -80°C 保存。
5. 本产品仅限于专业人员的科学研究用,不得用于临床诊断或治疗,不得用于食品或药品,不得存放于普通住宅内。为了您的安全和健康,请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明

1. 准备工作:
 - a. Buffer P1、Buffer P2、Buffer WB1 和 Buffer WB2 使用前平衡至室温。Buffer EB 在使用前置于冰上或者 2-8°C 保存。如果溶液有沉淀,适当水浴或者振荡溶解。
 - b. 细胞样品的准备。
 - (a) 贴壁细胞用 PBS 洗涤一次;悬浮细胞 1000-2000×g 室温离心 5 min,弃上清,用 PBS 洗涤一次。

- (b) 按照细胞量加入推荐的 Buffer P1。用移液器吹打多次，裂解细胞至溶液变粘稠。
- (c) 选做：加入 Buffer P1 后样品可能会比较粘稠，可适当超声或使用 1 ml 注射器反复抽吸打断基因组 DNA 从而使粘稠感消失。此操作会产生泡沫，但不影响 mRNA 的得率。
- (d) 4°C 以 14,000×g 离心 5 min，并将上清转移至一个新的离心管。上清可用于 mRNA 纯化，或保存在 -80°C 备用。
- c. 动物组织样品的准备。
- (a) 取所需量的动物组织，置于液氮中研磨成粉末，立即加入推荐量的 Buffer P1。也可将组织置于 1.5 ml 离心管中，迅速加入推荐量的冰浴预冷的 Buffer P1，用微型电动匀浆器匀浆，或者用普通玻璃匀浆器进行匀浆。
- (b) 4°C 以 14,000×g 离心 5 min，并将上清转移至一个新的离心管。上清可用于 mRNA 纯化，或保存在 -80°C 备用。
- d. Oligo (dT)₂₅ 磁珠的准备。
- (a) 将 Buffer Beads 从 4°C 冰箱取出，适当涡旋震荡或反复颠倒以确保磁珠充分混匀。参考下表，根据总细胞量或组织重量和样品数量，取适量的 Buffer Beads 至一洁净离心管中。

细胞量	组织量	Buffer P1	Buffer Beads	Buffer WB1	Buffer WB2
< 5×10 ⁵	< 5 mg	100 μl	20 μl	500 μl	500 μl each time
1~2×10 ⁶	5~20 mg	300 μl	40 μl	500 μl	500 μl each time
3~5×10 ⁶	20~50 mg	600 μl	100 μl	500 μl	500 μl each time

- (b) 无论磁珠用量多少，按照每个样品 200 μl Buffer P2 的量，加入适量 Buffer P2 洗涤磁珠，用移液器轻轻吹打重悬磁珠。置于磁力架上分离 30 sec，去除上清。重复本步骤 1 次。

注：如果样品数量超过 5 个，可以考虑将适量 Buffer Beads 先直接置于磁力架上分离 30 sec，去除上清，然后根据样品数量再加入适量 Buffer P2 洗涤 2 次。

- (c) 按照每个样品 100 μl Buffer P2 的量，加入适量结合液重悬磁珠。

2. 从细胞或组织样品中抽提 mRNA。

- 取上述制备好的细胞或组织样品与 100 μl 洗涤后的磁珠在室温下旋转混合 5 min。
- 置于磁力架上分离 1 min，去除上清。
- 室温下用 500 μl Buffer WB1 洗涤磁珠，磁分离 30 sec，去上清。
- 室温下用 500 μl Buffer WB2 洗涤磁珠，磁分离 30 sec，去上清。重复本步骤 1 次。
- 根据后续实验需求，进行 mRNA 的洗脱：

- (a) 从磁珠上洗脱 mRNA：加入 10-20 μl Buffer EB 或 Nuclease-free 的水，75-80°C 孵育 2 min，磁分离

30 sec, 然后将上清转移到新的 Nulcease-free 的离心管中, 置于冰上待用。

注: 建议转移上清时保留少量液体以免吸到磁珠影响后续实验。纯化获得的 mRNA 极易降解, 建议尽快进行后续实验。短时间内不使用, 请置于-80°C 保存。

(b) 如果 mRNA 不洗脱直接用于后续实验, 如固相 cDNA 文库构建等, 用 500 μ l Buffer WB2 洗涤一次, 再用后续实验中相应的缓冲液再洗涤一次, 即可用于后续实验。