

血液 mRNA 提取试剂盒（磁珠法）

HX3025

产品简介

血液 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、便捷地从新鲜、冻存、经 EDTA、肝素等抗凝处理或经过血液 RNA 稳定保存液保存的血液中快速分离纯化出高纯度完整 mRNA 的试剂盒。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。一个典型的哺乳血液细胞中，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，当血液的裂解液与 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。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 100 μl 新鲜小鼠血液提取约 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。本试剂盒中的 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。

产品应用

使用 Oligo (dT)₂₅ 包被的磁珠，配合优化的缓冲体系，稳定、高效、便捷地从新鲜、冻存、经 EDTA、肝素等抗凝处理或经过血液 RNA 稳定保存液保存的血液中快速分离纯化出高纯度完整 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。

储存条件

4°C 保存，一年有效。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	规格	规格
		50 T	200 T	800 T
HX3025-1	Buffer Beads (Oligo (dT) ₂₅ 磁珠悬浮液)	1 ml	4 ml	16 ml
HX3025-2	Buffer P1 (裂解液)	30 ml	120 ml	480 ml
HX3025-3	Buffer P2 (结合液)	30 ml	120 ml	480 ml
HX3025-4	Buffer WB1 (洗涤液 I)	30 ml	120 ml	480 ml
HX3025-5	Buffer WB2 (洗涤液 II)	60 ml	240 ml	480 ml×2
HX3025-6	Buffer EB (洗脱液)	5 ml	20 ml	80 ml

注意事项

1. 血液样品推荐使用血液 RNA 稳定保存液进行保存以保持 RNA 的完整性。
2. 操作过程要严格保证无 RNA 酶和 DNA 酶污染。本产品的所用试剂和耗材都要求是 RNase-free 和 DNase-free 的，操作时应小心，避免被污染。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。
3. 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。
4. 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。请使用推荐的血液量，否则可能造成磁珠聚集，会影响洗涤进而影响提取获得的 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。
5. 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。
6. 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. 血液的准备：

- (a) 收集 50-100 μl 新鲜的红细胞无细胞核的血液样品，或 5-10 μl 红细胞有细胞核的血液，加入含抗凝剂的抗凝管中，颠倒混匀。

注：

- 1) 人、猴、牛、兔、大鼠、小鼠等的红细胞无细胞核，鸟、鱼、蛙等的红细胞有细胞核。红细胞有细胞核会导致相同体积的血液内 RNA 的含量非常高。抗凝剂推荐使用 EDTA 钠盐或钾盐，肝素和柠檬酸盐也可以。
 - 2) 白细胞的收集和保存在血液 RNA 稳定保存液中的血液样品，请参考血液 RNA 稳定保存液的使用说明步骤 1、2 对血液样品进行处理。
- (b) 按照血液量加入下表中推荐的 Buffer P1。用移液器吹打多次，裂解细胞至溶液变粘稠。
- (c) **选做：** 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 $\times$ 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. Buffer Beads 的准备：

- (a) 将磁珠溶液从 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。

血液量	Buffer P1	Buffer Beads	Buffer WB1	Buffer WB2
<50 μl	100 μl	20 μl	500 μl	500 μl
50~100 μl	300 μl	40 μl	500 μl	500 μl
100~300 μl	600 μl	100 μl	500 μl	500 μl

- (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 洗涤两次。

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

2. 从血液中抽提 mRNA：

- a. 取上述制备好的血液样品与 100 μl 洗涤后的磁珠在室温下旋转混合 5 min。
- b. 置于磁力架上分离 1 分钟，去除上清。
- c. 室温下用 500 μl Buffer WB1 洗涤磁珠，磁分离 30 sec，去上清。

注：该步骤可能会出现絮凝物，增加洗涤次数，可使磁珠分散均匀，絮凝减少，絮凝不影响 mRNA 的抽提。

- d. 室温下用 500 μ l Buffer WB2 洗涤磁珠，磁分离 30 sec，去上清。重复本步骤 1 次。
- e. 根据后续实验需求，进行 mRNA 的洗脱：从磁珠上洗脱 mRNA：加入 10-20 μ l 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 Nuclease-free 的离心管中，置于冰上待用。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。

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。