

Biolinkedin® mRNA 纯化试剂盒

包装清单

名称	货号	包装
Biolinkedin® mRNA 纯化试剂盒	NK-1001	盒

产品概述

Biolinkedin® mRNA 纯化试剂盒提供的 Oligo-dT 包被磁珠分散性好, 磁响应快。通过磁珠表面的 oligo-dT 与 mRNA 的 polyA 杂交, 用于从动物组织、植物或细胞中提取的总 RNA 中快速纯化出高纯度且完整的 mRNA, 可用于分子生物学的各种下游实验。试剂盒配有经过优化预制的缓冲液, 为 mRNA 纯化提供最佳的稳定条件。

试剂盒组成

Oligo dT 包被磁珠	10 mL
结合缓冲液	50 mL
洗涤液	50 mL
RNase-Free H ₂ O	50 mL
磁力架	双排 16 孔

操作流程

对应样品

对应样品	样品量
培养细胞	~1 × 10 ⁷
动物组织	~50 mg
植物组织	~100 mg
总 RNA	10ng~100 ug (RIN 值 ≥ 7)

1. 使用前准备

- 1.1 RNase-free 1.5mL 离心管、移液器及吸头
- 1.2 漩涡振荡器、旋转混合仪、金属浴或 PCR 仪

2. 磁珠预处理

注：样品纯化所需磁珠的量可能需要优化达到最佳。

- 2.1 将磁珠悬液漩涡振荡 30s, 使磁珠充分震荡重悬;
- 2.2 取出 100~200μL 磁珠悬液至合适的反应管 (1.5mL EP 管或 PCR 管) 中; 将反应管置于磁性分离器上, 待溶液变澄清后【后续该操作简称为“磁性分离”】, 移去上清液, 从磁性分离器上取下反应管;
- 2.3 加入 200uL 结合缓冲液重悬磁珠, 用移液器缓慢吹打 5~10 次或漩涡震荡 30s。

2.4 磁性分离去上清, 加入 50μL 结合缓冲液重悬磁珠。

3. Total RNA 中纯化 mRNA

以下实验方案针对纯化 75ug Total RNA, 根据需要可以按比例调整。

- 3.1 取 50uL 含有 75ug Total RNA, 65°C 孵育 2min, 打开 RNA 二级结构, 结束后迅速置于冰上。
- 3.2 将 50μL 总 RNA 溶液加入至 50μL 洗涤后的磁珠, 吹打混合均匀。即每 75μg 总 RNA 使用 1mg 洗涤后且溶于 50μL **结合缓冲液**的磁珠结合 (步骤 2)。
- 3.3 将上述混合液室温下旋转混合 10~15min。
- 3.4 磁性分离, 静置 1min, 去上清。
- 3.5 室温下用 200uL **洗涤液**清洗磁珠, 小心吹打混匀, 磁性分离, 去除可能的污染物。重复操作一次。
- 3.6 加入 10~20μL **RNase-Free H₂O**, 65~75°C 孵育 2min, 然后快速将含有 mRNA 的上清液转移到新的 RNase-free EP 管。

4. 应用于 RNA 测序文库

- 4.1 准备 RNA 样品: 用 **RNase-Free H₂O** 将 10ng~100ug 总 RNA 稀释成 50uL, 冰上备用。

注: 总 RNA 应无 DNA, 有机溶剂 (酚, 乙醇等), 盐离子 (胍盐, Mg²⁺) 残留, 否则会导致 RNA 降解或 mRNA 捕获效率下降

- 4.2 按照步骤 2 磁珠预处理进行磁珠处理, 将 50uL 磁珠与 50uL RNA 样品用移液器吸吹混匀 6 次。
- 4.3 将样品置于 PCR 仪中, 65°C 5min, 25°C 5min, 4°C Hold.
- 4.4 将上述样品磁性分离, 静置 1min, 去上清; 用 200uL **洗涤液**清洗磁珠, 小心吹打混匀, 磁性分离, 去上清。
- 4.5 加入 50uL **RNase-Free H₂O**, 充分悬浮磁珠, 置于 PCR 仪中 65°C 2min, 20°C 5min, 将 mRNA 洗脱下来。
- 4.6 加入 50uL **结合缓冲液**, 反复吹打充分混匀, 室温或旋转仪上放置 5~10min。
- 4.7 磁性分离, 静置 1min, 去上清。
- 4.8 用 200uL **洗涤液**清洗磁珠, 小心吹打混匀, 磁性分离, 去上清。

4.9 若纯化产物用于逆转录反应,加入 10~20 μ L **RNase-free ddH₂O**,用移液器吹打混匀,65 $^{\circ}$ C 2min,磁性分离 1min,待溶液澄清后,小心吸取上清至一个新的 Nuclease-free PCR 管中。

4.10 样品可置于冰上继续进行 NGS 文库构建或其他分析应用(建议立即进行后续反应),也可置于-85~-65 $^{\circ}$ C保存。

注意事项

1. **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,故建议戴上口罩和手套。

2. **器材**:在实验器材允许的情况下,请对一次性塑料制品进行高温高压湿热灭菌处理。在使用玻璃器皿的情况下,请使用干热灭菌,或者在 0.1% DEPC 溶液中,37 $^{\circ}$ C下浸泡 12h,然后再进行高温高压湿热灭菌(121 $^{\circ}$ C,30min)。

3. **RNA 质量**:总 RNA 完整度要良好(RIN 值 \geq 7),不完整或降解的总 RNA 模板会导致部分 poly(A)+RNA 信息的缺失。

相关产品

货号	产品名称
L-3002	Oligo-dT 包被磁珠
NK-1001	mRNA 纯化试剂盒
NK-1002	基础 mRNA 纯化试剂盒