

Oligo-dT 包被磁珠

产品描述

本产品用于从总 RNA 或直接从动物组织、植物或细胞中快速分离出高纯度且完整的 mRNA。可以广泛的应用到各种样品中。磁珠上的 oligo-dT 与 mRNA 的 polyA 杂交。操作简单易行，仅需几步洗脱和磁分离，所有操作都在单管中一次完成。磁操作最大的优点就是容易清洗、分离以及浓缩磁珠结合的材料。

产品信息

项目	特性
粒径	200 nm
结合能力	~10 ug mRNA/mg 磁珠
浓度	10 mg/mL
保存液	0.1 M Tris-HCl, pH 7.5, 20 mM EDTA, 含 0.1% (v/v) Tween -20, 0.1% (w/v) NaN ₃
保质期	在 2-8°C 稳定保存, 保质期两年

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	~100 ug

推荐 buffer 组份

项目	组份
结合缓冲液	20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1.0 M LiCl, 2 mM EDTA.
裂解/结合缓冲液	100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 500 mM LiCl, 10 mM EDTA, 1% LiDS, 5 mM dithiothreitol (DTT).
洗涤液 I	10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.15 M LiCl, 1 mM EDTA, 0.1% LiDS.
洗涤液 II	10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.15 M LiCl, 1 mM EDTA 10 mM Tris-HCl, pH 7.5.

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°C 下浸泡 12 小时，然后再进行高温高压湿热灭菌 (121°C, 30 分钟)。

操作流程

1. 磁珠预处理

- (1) 将磁珠悬液漩涡振荡 30 s, 使磁珠充分震荡重悬;
- (2) 取出 100 μ L 磁珠悬液至合适的反应管 (1.5 mL 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；

- (3) 加入 1mL 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 30 s。
- (4) 磁性分离，去上清，加入 100 μ L 结合缓冲液重悬磁珠。

2. 样品前处理

(1) 动物/植物组织

- a. 将所需量的植物或动物组织快速并完全均质化在液氮中。
- b. 将冷冻粉收集并转移到新鲜的管中。每 100 毫克组织添加 1mL 结合缓冲液，充分混匀，并在室温下旋转混合 5 分钟。
- c. 通过用针头通过数次的吸入和吸出剪切 DNA 来降低溶液粘度。
- d. 在室温下以 14,000rpm 离心 5min，并将所有上清液转移至一个新鲜的 EP 管。上清液可以进行 mRNA 纯化，或保存在-80°C 以备将来使用。

(2) 细胞悬浮液

- a. 室温下以 4,000rpm 离心 5min 沉淀细胞并丢弃上清液。每 $5-10 \times 10^6$ 个动物或植物细胞加 1ml 结合缓冲液。
- b. 通过移液多次溶解细胞直至溶液变粘稠。通过用针头通过数次的吸入和吸出剪切 DNA 来降低溶液粘度。
- c. 在室温下以 14,000rpm 离心 5min，并将所有上清液转移至一个新鲜的 EP 管。上清液可以进行 mRNA 纯化，或保存在-80°C 以备将来使用。

3. 提取 mRNA

- a. 制备动物/植物组织裂解液或从培养细胞和细胞悬浮液中制备裂解液。
- b. 按照“一、磁珠预处理步骤”对磁珠进行处理。
- c. 将裂解液与磁珠混合，室温下旋转混合 3-5 分钟。
- d. 磁性分离，静置 2min，去上清。
- e. 室温下分别用 1ml 洗涤液 I 和 1ml 洗涤液 II 清洗磁珠，去除可能的污染物。
- f. 如果分离 mRNA 用于酶促下游应用（例如固相 cDNA 合成），洗涤液 II（500 μ L）洗涤一次，随后用酶缓冲液洗涤一次，可用于下游应用。

如果从磁珠中洗脱 mRNA，洗涤液 II 洗涤后并加入 10~20 μ L 10mM Tris-HCl, 75°C-80°C 孵育 2 分钟，然后快速将含有 mRNA 的上清液转移到新的 RNase-free EP 管。

4. Total RNA 中纯化 mRNA

以纯化 75ug Total RNA 为例

- a. 取 100ul 含有 75ug Total RNA 与 100ul 结合缓冲液混合，
- b. 65°C 孵育 2min，打开 RNA 二级结构，结束后迅速置于冰上。
- c. 将上述混合液室温下旋转混合 3-5 分钟。
- d. 磁性分离，静置 2min，去上清。
- e. 室温下分别用 1ml 洗涤液 I 和 1ml 洗涤液 II 清洗磁珠，去除可能的污染物。
- f. 加入 10~20 μ L 10mM Tris-HCl, 75°C-80°C 孵育 2 分钟，然后快速将含有 mRNA 的上清液转移到新的 RNase-free EP 管。

常见问题及对策

发生问题时，请参照以下的对策。

1. RNA 的回收率低

原因	对策
样品保存状态欠佳	在采取完样品材料后请立即冻结保存。
溶解处理不充分	样品在溶解液内溶解时，请充分匀浆，并使其通过装有注射针的针筒以降低粘性。另外，对于组织，请事先进行充分的冻结破碎工作。
样品过于坚硬	请充分进行冻结破碎，或进行匀浆。
样品量过剩	样品量过剩时，会使粒子凝集，粘性变高，回收量下降。请降低样品量。
样品中所含 RNA 量过少	请通过 AGPC 法等其他方法对大量的样品进行处理，以制备 Total RNA，并使用本试剂盒制备 mRNA。

2. RNA 被分解

原因	对策
样品保存状态欠佳	在采取完样品材料后请立即冻结保存。
冻结样品在使用前已经融解	样品尽可能保存在液氮中，使用时请迅速放入溶解液中溶解。
混入 Rnase	请戴上手套和口罩。另外，请避免和使用 RNase 的其他实验使用同一个器具及场所等。
对 RNA 加温处理	如果 RNA 在反应缓冲剂中长时间加温则会分解。若需要长时间加温，请使用添加了 RNase Inhibitor 的反应缓冲剂。另外，加温时请尽量控制温度在 72°C 以下。

3. RNA 的纯度低

原因	对策
样品量过剩	请考虑减少样品量。
试剂还没有完全回复到室温状态	对于酶以外的试剂请先待其回复到室温后再加以使用。
洗净时的磁珠混合不充分	仅通过倒转混合有时并不能充分混匀。在没有使用漩涡混合器的情况下，请通过 pipetting 进行混合。

4. RT-PCR 结果不良

原因	对策
混入基因组 DNA	已证实没有进行 DNase I 处理的情况下特别容易混入基因组 DNA。请先进行 DNase I 处理。另外，在进行 RT-PCR 时，推荐对未进行逆转录反应的样品也进行 PCR 操作，以便确认来自基因组 DNA 的增幅产物是否存在。
RNA 的分解	参照相关操作程序 [9] 2.
洗净不充分	溶解液中含有蛋白变性剂。请对溶解液充分洗净，并仔细去除上清液。如果觉得溶出后的样品内混入了蛋白变性剂（若 A_{260}/A_{280} 的数值变高），请在酶反应前进行乙醇沉淀。

5. 磁珠凝结，无法分开

原因	对策
溶解处理不充分	样品溶解时，请透过装有注射针的针筒。根据样品的破碎状态，此项操作可能会比较困难。这种情况下请通过 pipetting 来降低液体的粘性。
样品量过剩	如果处理时样品量过剩，就可能引起粒子凝集，回收率低。请考虑减少样品量。

注意：本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。