

# Biolinkedin® Oligo-dT 包被磁珠

## 包装清单

名称	货号	包装
Oligo-dT 包被磁珠	L-3002	2mL
	L-3002A	10mL

## 产品概述

Biolinkedin® 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,可用于分子生物学的各种下游实验中,如 RT-PCR、cDNA 文库构建、Northern Blot 分析、引物延伸、基因表达分析等。操作简单易行,尤其适合高通量、自动化操作。

## 产品特性

磁珠粒径	200 nm
磁珠浓度	5 mg/mL
结合能力	~2 ug mRNA/mg 磁珠
保质期	在 2~8°C 稳定保存两年

## 操作流程

### 对应样品

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

### 1. 使用前准备

1.1 缓冲液：自行准备或直接购买我司基础 mRNA 纯化试剂盒。

1.2 RNase-free 1.5mL 离心管、移液器及吸头

1.3 磁性分离器：可选用 Biolinkedin®磁力架

1.4 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 **10mM Tris-HCl pH7.5 或 RNase-Free H<sub>2</sub>O**, 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 H<sub>2</sub>O** 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, Mg<sup>2+</sup>) 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 H<sub>2</sub>O**, 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 $\mu$ L RNase-free ddH<sub>2</sub>O,用移液器吹打混匀,65°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°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°C下浸泡 12h,然后再进行高温高压湿热灭菌(121°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

### 问题解决

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,并使用本磁珠纯化 mRNA。

#### 2. RNA 被分解

原因	对策
样品保存状态欠佳	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,请避免和使用带有 RNase 的器具及场所等。
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。
试剂还没有完全恢复到室温状态	对于酶以外的试剂请先待其恢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,请通过移液器进行混合。

#### 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。
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。