

Oligo(dT) 磁珠 说明书

【产品简介】

Oligo(dT) 包被的磁珠能够分离和提取多种样本中的 mRNA，用于 RT-PCR、cDNA 文库构建、 cDNA 微阵列、亲和纯化、引物延伸、消减杂交等应用。Rebeads® Mag oligo dT 磁珠还具有高表面积、高亲和力和高特异性的特性，来提取高纯度的 mRNA。利用标准杂交条件，可以很容易地将聚腺苷酸化的 RNA (poly-A+ RNA)结合到 oligo dT 上面，其他 RNA 种类(rRNA 和tRNA)不包含 poly A+序列，因此不会与 oligo(dT)磁珠结合。

【产品信息】

产品名称	Oligo(dT)磁珠
货号	NG-MB0089
基质	聚合物
浓度	5 mg/mL
保存液	PBS pH 7.4, 0.05% ProClin 300
保存条件及效期	2-8°C, 两年

【注意事项】

1. 需提前准备所有需要的材料，以减缓 RNA 的降解。
2. 在提取 RNA 过程中，需及时更换手套，以减少 RNase 的污染。
3. 在使用缓冲液时，应使用干净的 RNase-free 的一次性枪头。
4. 在可能的情况下，从单独分离出的总 RNA 中进行mRNA 提取。
5. 杂交温度从室温到 40°C 均可，杂交时间控制在 5-15min 内。

【操作步骤】

1. 其他的材料试剂要求:

Binding Buffer: 20mM Tris-HCl, pH 7.5, 1.0 M LiCl, 2mM EDTA.

Lysis/Binding Buffer: 100mM Tris-HCl, pH 7.5, 500mM LiCl, 10 mM EDTA, 1% LiDS, 5 mM dithiothreitol (DTT). 如有沉淀产生，加热摇晃至澄清。

Washing Buffer A: 10mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.15 M LiCl, 1mM EDTA, 0.1% LiDS.

Washing Buffer B: 10mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.15 M LiCl, 1mM EDTA.

注：如洗脱下来的mRNA 需要保存，在洗脱过程中加入 RNase 抑制剂。

2. 洗涤磁珠

- 1) 重悬试剂瓶中的磁珠（涡旋 30s 以上或者旋转混合 5mins 以上）；
- 2) 吸取需要的磁珠体积（推荐磁珠用量：一般总RNA 量在 25μg 以下磁珠用量为 20μL，总RNA 量增加磁珠用量相应增加，磁珠用量可根据预实验进行调节）至新的 EP 管或 PCR 管中；
- 3) 加入相同体积的 Binding Buffer，涡旋混匀；
- 4) 将 EP 管或 PCR 管置于磁力架上静置 1min，待澄清后吸弃上清液；

5) 从磁力架上将 EP 管或 PCR 管取下，加入相同初始体积的 Binding Buffer 重悬磁珠。

3. 样品准备

3.1 准备裂解产物（动物组织、植物、细胞）

推荐用量：动物组织 20-50mg，植物 100mg，细胞 $1\text{-}4 \times 10^6$ 个。也可根据需求放大或缩小比例。

3.2 固体动植物组织裂解产物准备

- 1) 称取建议用量的动物或植物组织，过多的组织会减少 mRNA 的产量和纯度；
- 2) 在液氮中研磨冷冻的组织，确保组织一致保持冷冻状态避免 RNA 降解；
- 3) 将研磨后的冷冻样本转移至 EP 管中，加入 1mL Lysis/Binding Buffer，匀浆 1-2 分钟，直至组织完全裂解。

注：应尽快完成匀浆防止 RNA 降解；如果样本粘性比较大，用匀浆机匀浆更佳

- 4) 将上述裂解物离心 30-60s 移除多余组织碎片，所得裂解物可用于 mRNA 的分离或-80°C 中备用。

3.3 细胞悬浮液裂解产物准备

- 1) 用 PBS 清洗细胞悬液，离心获得细胞沉淀，立即将细胞置于-80°C 液氮中备用；
- 2) 加入 1mL Lysis/Binding Buffer 到上述细胞 ($1\text{-}4 \times 10^6$ 个) 中，吹打数次确保细胞完全裂解。细胞裂解后会释放 DNA，导致溶液粘度增加，可视作裂解完全；
- 3) 可通过剪切力剪切 DNA 以减小粘度。用 1-2mL 的注射器 (21 号针头) 吹打 3 次。如果产生气泡，可离心 30s 消除气泡，气泡的存在并不影响 mRNA 的产量；
- 4) 所得裂解物可用于 mRNA 的分离，或存于-80°C 中备用。

3. 从粗裂解液中分离 mRNA

- 1) 去除磁珠清洗后的溶液（见“洗涤磁珠”步骤），加入准备好的裂解产物；
- 2) 混合磁珠和裂解产物：室温下用震荡器混匀 3-5mins，如果溶液呈粘稠状，则延长结合时间，该过程能够使 mRNA 结合到 oligo dT 链上；
- 3) 将上述离心管置于磁力架上静置 2mins 后吸弃上清液；
- 4) 将 1mL Washing Buffer A 加入上述离心管中，重悬磁珠，然后置于磁力架上 2mins，彻底吸弃上清液；
- 5) 用 1mL Washing Buffer B 洗涤磁珠一次，步骤同上；
- 6) 以下操作二选一：
 - a. 如果磁珠结合的 mRNA 用于酶促下游应用（如固相 cDNA 合成），用 500μL 的 Washing Buffer B 再洗涤一次，然后再用后续的酶缓冲液洗涤磁珠一次。
 - b. 将 mRNA 从磁珠上洗脱：加入 10-20μL 10mM Tris-HCl，75°C-80°C 孵育 2mins，然后迅速将管子置于磁力架上，澄清后立即将上清转移至新的 RNase-free 管中，最终得率会根据样本而稍有不同。

4. 从总 RNA 中纯化 mRNA

- 1) 用 Elution Buffer 将 0.01-25μg 纯度较好的总 RNA 体积调整至 50μL；
- 2) 加入 50μL Binding Buffer；

注：如果总 RNA 体积调整超过 50 μ L，则加入相同体积的 Binding Buffer 即可；

- 3) 将上述总 100 μ L 总 RNA 溶液加入到处理好的的磁珠（见“洗涤磁珠”步骤）中，用移液器吹打 6 次以上以彻底混匀；
- 4) 将样品置于 PCR 仪，65°C 5mins，25°C 5mins，4°C hold，使 mRNA 与磁珠结合；
- 5) 将样品置于磁力架上 1-2min，待溶液澄清后吸弃上清液；
- 6) 将样品从磁力架上取出，加入 200 μ L Washing Buffer B，小心吹打数次混匀，置于磁力架上1-2min，待溶液澄清后吸弃上清液；
- 7) 将样品从磁力架上取出，加入 50 μ L Elution Buffer 重悬磁珠，用移液器吹打 6 次以上彻底混匀；
- 8) 将样品置于 PCR 仪中，80°C 2mins，25°C hold，将 mRNA 洗脱下来；
- 9) 结束后加入 50 μ L Binding Buffer，用移液器吹打至彻底混匀，室温放置结合 5mins；
- 10) 将样品置于磁力架上 1-2min，待溶液澄清后吸弃上清液；
- 11) 将样品从磁力架上取出，加入 200 μ L Washing Buffer B，吹打数次混匀。置于磁力架上1-2min，待溶液澄清后吸弃上清液。
重复操作 1 次；
- 12) 根据后续实验流程选择处理方式：
 - a. 若纯化产物用于逆转录反应，将样品从磁力架上取出，加入 10-15 μ L Elution Buffer，用移液器吹打 6 次充分混匀，80°C 2min 洗脱，置于磁力架上 1-2min，待溶液澄清后，小心吸取上清转移至新的 Nuclease-free PCR 管中。
 - b. 若纯化产物用于 RNA 文库构建，可根据相关试剂盒说明书加入相应体积 Frag/Prime Buffer 进行文库构建。
 - c. 样品产物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-80°C 保存。