

## mRNA纯化试剂盒(磁珠法)

### Magnetic mRNA Isolation Kit

目录号: ZPM202

#### 产品组成:

| 试剂盒组成                         | ZPM202-1 50T |
|-------------------------------|--------------|
| Oligo(dT) beads(10mg/mL)      | 1 mL         |
| mRNA Lysis Buffer (LB)        | 25 mL        |
| 50 × DTT                      | 0.5 mL       |
| mRNA Bind Buffer(BB)          | 15 mL        |
| mRNA Wash Buffer 1(WB1)       | 25 mL        |
| mRNA Wash Buffer 2(WB2)       | 50 mL        |
| RNase Free ddH <sub>2</sub> O | 15 mL        |
| 说明书                           | 一份           |

#### 保存条件:

运输条件: 4℃运输。

保存条件: 50 × DTT于-20℃保存; 其它试剂4℃保存

注: 磁珠悬液应于 4℃ 避光保存, 切勿冷冻或使其干裂。

#### 自备材料与仪器:

RNase-Free 离心管、移液器及 RNase-Free 吸头; 磁力架 (磁性分离架); 涡旋混匀仪或可倾斜、翻转混匀的样品混匀器; 可加热至 65~80℃ 的恒温孵育装置或 PCR 仪; 台式离心机。处理组织样本时另需液氮、研钵 (或电动/玻璃匀浆器); 如需打断高粘稠基因组 DNA, 可备 1~2 mL 注射器及 21G 针头。

#### 产品简介与原理:

本试剂盒适用于从培养细胞、动物组织或纯化的总 RNA 中, 快速分离获得高完整性、高纯度的信使 RNA (mRNA)。纯化产物可不经额外沉淀浓缩, 直接用于 cDNA 文库构建、高通量测序、基因表达分析、RT-PCR、Northern 印迹及微阵列等下游分子生物学实验, 还可用于 mRNA 疫苗的研发, 如 mRNA 疫苗的纯化等。

试剂盒的核心元件为表面共价偶联 Oligo(dT) 序列的顺磁性磁珠。绝大多数真核 mRNA 的 3' 末端带有 Poly(A) 尾, 当样品与磁珠在适宜的盐离子条件下共孵育时, 磁珠上的 Oligo(dT) 即与 mRNA 的 Poly(A) 尾通过碱基互补配对形成稳定的杂交体, 从而将 mRNA 特异性地锚定在固相载体上; 本身不含 Poly(A) 尾的核糖体 RNA (rRNA)、转运 RNA (tRNA) 及大部分基因组 DNA 不能与磁珠结合, 可在后续洗涤步骤中被有效去除。随后以低盐的洗脱液和加热的方式使杂交体解链, 即获得纯净的 mRNA。

## 注意事项:

### 请务必在使用本试剂盒前阅读此注意事项

1. 全程须预防核糖核酸酶 (RNase) 污染: 建议使用 RNA 专用实验台面, 勤换手套并穿戴 RNA 专用实验服, 操作时尽量避免说话与来回走动, 防止物品从离心管上方经过; 所用容器、耗材与试剂均应确保无 RNase 污染。
2. 磁珠切勿冷冻或使其干裂, 否则可能出现磁珠团聚、官能团脱落及形态改变, 不仅降低结合能力, 还可能导致磁珠非特异性吸附核糖体 RNA。
3. 投入的总 RNA 应保持良好完整性且无 RNase 污染, 这是获得高收量、高质量 mRNA 的前提。
4. 磁性分离时, 应确保磁珠与缓冲液彻底分离后再吸取上清, 且注意不要触碰磁珠, 以避免磁珠损失影响得率。不同磁力架的磁场强弱不同, 分离时间可依据实际情况调整, 一般 1 分钟即可, 以磁珠完全吸附于管壁为准。
5. 吸取上清后应尽快进入下一步操作, 避免磁珠长时间暴露于空气中导致干裂。
6. 本试剂盒部分组分含去垢剂等变性剂, 操作前请穿戴实验服、护目镜、口罩与手套; 如缓冲液不慎溅出, 立即用清水擦拭干净。实验废液应收集于专用废液桶中集中处理。

## 实验前准备:

### 1. 组分恢复与磁珠悬浮

使用前将所有组分取出, 恢复至室温。mRNA Lysis Buffer (LB) 按照实验用量取出并加入终浓度  $1 \times$  DTT (每 1 mL LB 加入 20  $\mu$ L 的  $50 \times$  DTT), 现配现用。

磁珠在静置后会沉降, 取用前必须充分悬浮: 涡旋振荡使其充分悬浮, 或用移液器反复吸打约 10 次, 直至磁珠均匀分散。磁珠悬浮是否充分直接影响吸取量的一致性以及磁珠表面 Oligo(dT) 的暴露程度, 进而影响 mRNA 的结合能力, 请务必操作到位。

### 2. 试剂用量选择

磁珠用量需依据样本来源及总量确定。一般而言, 1 mg 磁珠 (约 100  $\mu$ L 悬液) 可结合至多 2  $\mu$ g 的 mRNA, 实际得率随样本类型而异; 典型哺乳动物单个细胞约含 10~30 pg 总 RNA, 其中 mRNA 约占 1%~5%。下表给出常见样本量的参考用量, 供初次实验估算, 实际可按得率需求按比例增减。注意: 投入样本量超过表建议范围时, 并不会成比例地提高 mRNA 得率, 反而可能引入更多组织碎屑与核糖核酸酶, 建议控制在下表范围内。



| 样本类型与投入量                   | 磁珠悬液用量 (参考)       | LB用量 (参考)         |
|----------------------------|-------------------|-------------------|
| 总RNA 约 10 $\mu\text{g}$    | 20 $\mu\text{L}$  | -                 |
| 总RNA 约 50 $\mu\text{g}$    | 100 $\mu\text{L}$ | -                 |
| 哺乳动物细胞 约 $5 \times 10^5$ 个 | 20 $\mu\text{L}$  | 100 $\mu\text{L}$ |
| 哺乳动物细胞 约 $5 \times 10^6$ 个 | 100 $\mu\text{L}$ | 600 $\mu\text{L}$ |
| 动物组织 约 10 mg               | 20 $\mu\text{L}$  | 100 $\mu\text{L}$ |
| 动物组织 约 50 mg               | 100 $\mu\text{L}$ | 600 $\mu\text{L}$ |

## 操作步骤:

以下操作以一个样本为例进行描述。若需同时纯化多个样本, 可将磁珠预处理及各类缓冲液的用量按样本个数等比例放大, 统一操作以提高效率。全程应在 RNase-Free 条件下进行。

### 1. 磁珠的预处理与平衡

(1) 将磁珠充分悬浮后, 吸取所需用量的磁珠悬液至干净的 RNase-Free 离心管中, 置于磁力架上分离30秒, 直至所有的磁珠都吸附在管壁上。

(2) 吸弃上清, 向磁珠中加入mRNA Bind Buffer(BB) (每样本 200  $\mu\text{L}$ ) , 以移液器轻轻吹打重悬磁珠, 置于磁力架上磁分离约 30 秒, 吸弃上清。

(3) 向洗涤后的磁珠中加入BB (每样本 100  $\mu\text{L}$ ) , 吹打重悬, 备用。

**提示:** 当同时处理样本较多时, 可先将磁珠悬液整体置于磁力架分离并弃去保存液, 再统一按样本数加入BB洗涤后分装, 以简化操作。

### 2. 细胞样本的裂解制备

(1) 贴壁细胞: 弃去培养基, 用PBS洗涤细胞一次; 悬浮细胞: 于 1000~2000 $\times g$ 、室温离心 5 分钟, 弃上清, 用PBS 洗涤一次。

(2) 按细胞量加入推荐用量的LB, 以移液器反复吹打, 使细胞充分裂解, 直至溶液变粘稠。若粘稠度过高, 可选做以下处理: 以超声或 1 mL 注射器反复抽吸以剪切基因组 DNA, 使粘稠感明显下降; 此操作可能产生泡沫, 但不影响 mRNA 得率。

(3) 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、14000 $\times g$  离心 5 分钟, 将上清转移至新的 RNase-Free 离心管。所得上清可直接用于后续 mRNA 纯化, 亦可于 -80 $^{\circ}\text{C}$  冻存备用。

### 3. 组织样本的裂解制备

(1) 取所需量的动物组织，迅速置于液氮中研磨成粉末，立即加入推荐用量的LB混匀；或将组织放入盛有冰浴预冷LB的离心管中，用电动匀浆器或玻璃匀浆器匀浆。尽量缩短操作时间以防 mRNA 降解。

(2) 于 4 °C、14000×g 离心 5 分钟，将上清转移至新的 RNase-Free 离心管，可直接用于纯化或 -80 °C 冻存备用。

### 4. 从细胞或组织中纯化mRNA

(1) 将操作步骤2、3制备的样本上清与 100 μL 已平衡的磁珠（含 BB）混合，在室温下旋转混合5分钟，置于磁力架1-2分钟，弃去上清。

(2) 加入500 μL洗涤液mRNA Wash Buffer 1(WB1) 洗涤磁珠，磁分离约 30 秒，弃去上清。

(3) 加入500 μL洗涤液mRNA Wash Buffer 2(WB2)洗涤磁珠，磁分离约 30 秒，弃去上清；重复一次。

(4) 根据后续实验需要，可选择下述两种处理方式之一：

**方式1（直接洗脱）：**向磁珠中加入 10~20 μL RNase-Free ddH<sub>2</sub>O，于 65~80 °C 孵育 2 分钟，磁分离约 30 秒，将上清转移至新的离心管并置于冰上待用。转移上清时建议保留少量液体，以免吸入磁珠影响后续实验。

**方式2（不洗脱直接用于后续实验）：**如需将磁珠连同 mRNA 直接用于后续固相操作（如固相 cDNA 文库构建等），可用洗涤液WB2洗涤一次，再以后续实验所用的相应缓冲液洗涤一次，即可直接投入下游反应。

纯化所得 mRNA 易降解，建议尽快进行后续实验；短时间内暂不使用时应于 -80 °C 保存。

### 5. 从总 RNA 中纯化 mRNA

(1) 不超过75 μg 总 RNA 的样品用 RNase-Free ddH<sub>2</sub>O补足至 100 μL（若样品体积已超过 100 μL，可按比例放大各试剂用量），再加入 100 μL BB混匀。

(2) 将上述混合液于 65 °C 孵育 2 分钟打开二级结构，迅速置于冰上。随后与 100 μL 已平衡的磁珠（含BB）混合，室温混匀约 5 分钟，使 mRNA 与磁珠杂交。

(3) 磁分离约 30 秒，弃上清，用WB2洗涤磁珠两次（每次磁分离后弃上清）。之后按步骤4的方法洗脱即得 mRNA。

**注：此方法亦适用于体外转录的RNA纯化（需含有poly(A)尾）。**