

Oligo DT 磁珠

Oligo (DT)



产品货号: M7416S, M7416M, M7416L

产品规格: 1 mL, 5 mg/mL, 1 μ m; 5 mL, 5 mg/mL, 1 μ m; 100 mL, 5 mg/mL, 1 μ m

储存条件: 在 2~8°C 下保存, 有效期见外包装

产品介绍

Oligo DT 磁珠, 分散性好, 磁响应快, 亲水性好。磁珠表面共价偶联的 Oligo DT 可与真核生物 mRNA 尾部的 Poly A 互补配对, 可高效地从真核生物总 RNA 或直接从动植物组织或细胞裂解物中快速分离出完整、高纯度的 mRNA。分离得到的 mRNA 可用于多种分子生物学实验: RT-PCR、固相 cDNA 文库构建、RACE、Northern 等。产品信息见表 1。

表1. Oligo DT磁珠信息

产品信息	Oligo DT 磁珠 (1 μ m)
Oligo DT 偶联量	~ 500 pmol/mg 磁珠
mRNA 结合量	1-2 μ g/mg 磁珠
磁珠浓度	5 mg/mL
保存溶液	1 \times PBS, 0.01% Tween-20, 0.1% proclin-300

实验步骤

一. 使用前准备

1. 缓冲液: 以下为常用的缓冲液成分, 用户可根据需要调整缓冲液配方, 例如SSC等。

结合缓冲液	10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1.0 M NaCl, 1 mM EDTA
裂解/结合缓冲液	100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 500 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1% SDS, 5 mM DTT
洗涤液 I	10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.15 M NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% SDS
洗涤液 II	10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.15 M NaCl, 1 mM EDTA
洗脱液	Nuclease-Free Water

注: 所有试剂需用DEPC处理的纯化水配制, 使用时平衡至室温, 如有沉淀, 可37°C预热10 min。

2. RNase-free 1.5 mL离心管
3. 磁性分离器: 可选用UElandy磁性分离器, 货号M7429
4. 漩涡振荡器
5. 旋转混合仪
6. 移液器及吸头



UElandy Inc.

Tel:0512-88965152

Web:www.uelandy.com

二. 清洗Oligo DT磁珠

1. 将磁珠瓶置于漩涡振荡器上20 s, 振荡充分重悬磁珠。用移液器移取所需体积的磁珠到新的离心管中。加入相同体积的结合缓冲液, 重悬磁珠。
2. 将离心管置于磁性分离器上, 静置1 min (此操作后续简称为磁性分离), 用移液器吸去上清液, 从磁性分离器上取下离心管。
3. 加入初始体积相同体积的结合缓冲液, 备用。

注: 如从总RNA中纯化mRNA, 加入一半的初始体积, 即磁珠浓缩至10 mg/mL。

三. 从总RNA中纯化mRNA

1. 例如从100 μg 总RNA中纯化mRNA。用DEPC水将100 μg 总RNA体积调整到100 μL 。
2. 加入相同体积的结合缓冲液 (100 μL) 。
3. 65°C加热2 min以打开二级结构, 然后迅速转移至冰上。将200 μL 总RNA溶液加入至100 μL 洗涤后的磁珠。即每100 μg 总RNA使用1 mg洗涤后且溶于100 μL 结合缓冲液磁珠 (步骤2), 吹打混合均匀。
4. 室温, 旋转孵育10 min。
5. 磁性分离1 min, 小心移去上清。从磁性分离器上取下离心管。
6. 加入200 μL 洗涤液II, 小心吹打混匀。
7. 磁性分离1 min, 小心移去上清。从磁性分离器上取下离心管。
8. 重复洗涤一次 (步骤6和7), 共洗涤两次。

注: 洗涤需将磁珠彻底重悬, 并第二次洗涤后尽量去除干净上清。

9. 根据后续实验, 选择下列其一:

(1) 如不需要将mRNA从磁珠上洗脱下来, 需用下游实验的酶缓冲液再洗涤磁珠一次。

(2) 如需从磁珠上洗脱mRNA: 小心去除干净洗涤缓冲液II (注意不要吸到磁珠), 然后添加10~20 μL 无酶水或10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 吹打充分混匀, 室温孵育2 min。然后将离心管放在磁力架上, 将含有mRNA的上清液转移至新的RNase-free的离心管中。

注: 可65°C~75°C加热洗脱, 来提高洗脱效率。

四. 从细胞裂物中分离mRNA

1. 用PBS洗涤细胞悬液, 离心获得细胞沉淀。细胞沉淀可以立即使用, 也可以在液氮中冷冻后储存在-80°C备用。
2. 向细胞沉淀 (1~4 $\times 10^6$ 细胞) 中加入1 mL裂解/结合缓冲液。反复吹打几次以确保裂解完全。裂解过程中释放的DNA会导致溶液变粘, 表明裂解完成。
3. 通过DNA剪切步骤降低粘度。裂解液使用1-2 mL注射器通过21号针头处理3次。反复剪切可能会导致裂解物起泡沫, 但起泡沫不应影响mRNA的产量。可以通过30s离心来减少泡沫。
4. 裂解物可立即用于mRNA分离, 或将其冷冻并保存在-80°C备用。
5. 将清洗过的Oligo DT磁珠, 磁吸去除上清。加入裂解物, 混合均匀。
6. 室温旋转混合5 min进行结合。如果溶液粘稠, 则增加结合时间。
7. 将离心管放在磁力架上1-2 min, 除去上清液。
8. 磁珠清洗两次: 用1 mL洗涤液I洗涤一次, 然后用1 mL洗涤液II洗涤一次。



注：洗涤需将磁珠彻底重悬，并在洗涤步骤之间完全去除上清。

9. 根据后续实验，选择下列其一：

(1) 如果不需要将mRNA从磁珠上洗脱下来（如后续进行固相cDNA合成），请用洗涤液II（500 μ L）再洗涤一次，然后用下游实验中使用的酶缓冲液洗涤一次。

(2) 从磁珠上洗脱mRNA：去除干净洗涤液II，然后添加10~20 μ L无酶水或10 mM的Tris-HCl（pH 7.5）。65°C~75°C孵育2 min，然后将离心管放在磁力架上，并迅速将含有mRNA的上清液转移至新的RNase-free的离心管中。

注：根据mRNA的丰度，最终产量在不同组织/细胞之间可能会有所不同。一个哺乳动物细胞一般约有10~30 pg RNA，其中mRNA约占其中1~5%。

注意事项

1. 应避免对磁珠进行冷冻等操作。
2. 为减少磁珠损失，每次磁性分离的时间应不少于1 min。
3. 建议提取到的mRNA立即用于RT-PCR。如果需要保存，建议洗脱液中添加RNase抑制剂，将mRNA从磁珠上洗脱下来并且冻存。
4. 所有用于mRNA提取的buffer和耗材都应该是RNase-free。
5. 从磁珠保存管中移取磁珠前应充分震荡重悬均匀。
6. 如果纯化后的rRNA残留量对下游应用过高，可进行第二轮mRNA纯化。
7. 建议使用质量好的移液器吸头和反应管，避免因粘附磁珠及溶液而造成损失。
8. 本产品仅供研究使用。

