

1、适用场景

MagneStar® MP1-Oligo(dT)磁珠表面偶联有(dT)20寡核苷酸，用于从真核生物总RNA或直接从细胞、动物和植物组织的粗提取物中快速分离高度纯化的完整mRNA。

2、基本原理



MagneStar® MP1-Oligo(dT)磁珠是一款基于真核细胞mRNA含有poly(A)尾端的共性特点，利用碱基互补配对原则设计用于mRNA分离纯化的超顺磁性单分散磁珠。

真核细胞mRNA仅占总RNA的1%至5%，因此高效的mRNA纯化至关重要。MagneStar® MP1-Oligo(dT) 磁珠可以通过mRNA的3'端的Poly(A) 尾巴与磁珠表面上共价结合的dT寡核苷酸基团配对来进行mRNA的特异性捕获。mRNA纯化过程使用标准杂交条件即可轻松实现。MagneStar® MP1-Oligo(dT)磁珠只需一次提取即可从总RNA中去除90%以上的rRNA残留。

分离得到的mRNA可直接用于分子生物学的大多数下游应用：RT-qPCR、cDNA文库构建、S1核酸酶分析、核糖核酸酶保护分析、引物延伸、斑点杂交、体外翻译实验、RACE、削减杂交、Northern Blot、基因克隆等。

3、注意事项

- 应避免对磁珠进行冷冻等操作，避免磁珠与冰块直接接触。
- 建议提取得到的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进行冻存。
- 所有用于mRNA提取的buffer和耗材都应该是RNase-free级别。
- 移取磁珠前应充分振荡重悬均匀，并避免吸取到泡沫。
- 如果纯化后的rRNA残留量对下游应用影响较大，可进行第二轮mRNA纯化。
- 建议使用低吸附的移液枪头和EP管，避免因粘附磁珠及溶液而造成损失。
- MagneStar® MP1-Oligo(dT) 磁珠可进行重复使用，但不推荐。

4、基本流程

① 配置缓冲液：以下为常用的缓冲液，用户可根据需要调整缓冲液配方，所有试剂均用DEPC水配制：

结合缓冲液（B Buffer）： 20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 1.0 M LiCl, pH 7.5。

洗涤缓冲液（W Buffer）： 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0.15 M LiCl, pH 7.5。

洗脱缓冲液（E Buffer）： 10 mM Tris-HCl, pH 7.5。

② 清洗 磁珠

- 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。
- 将离心管置于磁性分离器上，磁性分离，用移液器弃去上清液，加入相同体积的B Buffer，重悬磁珠，从磁性分离器上取下离心管。
- 重复步骤②一次。
- 加入初始体积相同体积的B Buffer，备用，磁珠浓度为10 mg/mL。

③ 从总RNA（总量约100 µg）中纯化 mRNA

- 用E Buffer稀释 100 µg 总RNA 至总体积为 100 µL（浓度1 mg/mL）。
- 加入等体积（100 µL）的B Buffer，65°C加热5 min 以打开RNA的二级结构，然后迅速转移至冰上。
- 取磁珠100 µL（10 mg/mL），向磁珠中加入准备好的200 µL 总 RNA 溶液，混匀后，室温孵育10 min。
- 磁吸分离，弃去上清，加入W Buffer洗涤2次。
- 磁吸分离，弃去上清，加入20 µL 的 E Buffer洗脱，75°C孵育2 min后，磁吸分离，收集洗脱液。

5、常见问题

Q： 在使用MagneStar® MP1-Oligo(dT) 磁珠分离mRNA时出现rRNA残留过多现象，该如何处理？

A： 通过从洗脱液中再次提取mRNA，可以有效清除rRNA。可重复利用初始分离时所使用的相同量的磁珠。使用洗涤缓冲液B清洗磁珠2次。以4倍体积的结合缓冲液稀释洗脱mRNA，随后加入磁珠，在室温下混匀并孵育3 – 5 分钟，随后继续执行直接mRNA分离实验方案。

Q： 分离出来的mRNA需要多大体积洗脱液才可以被洗脱？

A： 高浓度的mRNA可在65 ~ 80°C (2 min)的条件下以所需的体积洗脱，一般为10至20 µL。如果用小体积洗脱，当磁珠迁移到对着磁铁的试管一侧时，要注意移去含有上清的mRNA，避免损失。

Q： MagneStar® MP1-Oligo(dT)磁珠磁珠能否灭菌？

A： 只有未包被的环氧基或甲苯磺酰基活化的磁珠可根据需要使用70%乙醇进行清洗除菌。包被的磁珠不可灭菌。