



CWseq® mRNA Capture Kit 2.0

CWseq® mRNA捕获磁珠试剂盒 2.0

Cat. No. CW3090

产品简介

CWseq® mRNA Capture Kit 2.0包含偶联Oligod (T)的顺磁性微球,可与带polyA尾的mRNA结合,从纯化后的总RNA中有效分离mRNA,整个实验操作可在1 h内完成。

保存条件

2 ~ 8°C。

产品内容

Component	CW3090S (24 rxns)	CW3090M (96 rxns)
mRNA Capture Beads	240 µL	960 µL
mRNA Binding Buffer 1	2.4 mL	9.6 mL
mRNA Binding Buffer 2	1.2 mL	4.8 mL
mRNA Elution Buffer	1.2 mL	4.8 mL
mRNA Washing Buffer	8.7 mL	35 mL
RNase-Free Water	1 mL	1 mL

适用范围

本产品适用于人、动物、植物、真菌等真核生物2.5 ng - 1 µg完整度良好的总RNA (RIN值≥7)中mRNA的分离。

自备材料

磁力架, 低吸附Nuclease-free PCR管等实验室常见耗材。

注意事项

1. 使用前需将试剂从2 ~ 8°C取出后平衡至室温 (~20 min), 否则影响捕获效率。
2. 所有缓冲液试剂在使用前都应上下颠倒充分混匀, 但不可涡旋振荡以防气泡。
3. 应使用Qubit®荧光仪或相关仪器对RNA进行准确定量, 使用安捷伦2100生物分析仪对RNA完整性进行检测。确保总RNA RIN值 ≥ 7 , mRNA完整度较低或降解会影响后续实验结果。确保RNA样品中无DNA、盐离子 (例如 Mg^{2+} 、胍盐)、螯合剂 (例如EDTA、EGTA) 和有机物 (例如苯酚或乙醇) 残留, 否则可能导致非预期内的RNA降解或RNA捕获效率低。
4. 实验过程中务必佩戴口罩、手套进行操作, 并使用新鲜的RNase-Free Water, 避免污染。
5. 移除mRNA Washing Buffer时, 尽量移除干净, 并避免吸到磁珠, 以防影响整体效果。

使用方法

1、样本准备

将RNA取出置于冰上溶解, 用无核酸酶水 (Nuclease-free ddH₂O) 将2.5 ng-1 μ g总RNA稀释至50 μ L于Nuclease-free PCR管中, 冰上放置备用。

2、磁珠清洗

- 2.1 将试剂从2 ~ 8°C取出, 室温下平衡 20 min, 将mRNA Capture Beads旋涡振荡5-10 sec至磁珠充分悬浮。将缓冲液组分上下颠倒约20次至充分混匀。
- 2.2 吸取10 μ L mRNA Capture Beads至Nuclease-free PCR管中, 置于磁力架上, 待溶液澄清后, 轻柔吸弃上清 (**注意不要触动磁珠**)。
- 2.3 从磁力架上取下PCR管, 加入50 μ L mRNA Binding Buffer 1, 使用移液器反复吹打10次以上彻底混匀磁珠, **注意避免起泡**。将PCR管置于磁力架上, 待溶液澄清后, 轻柔吸弃上清 (**注意不要触动磁珠**)。
- 2.4 从磁力架上取下PCR管, 加入50 μ L mRNA Binding Buffer 1, 使用移液器反复吹打10次以上彻底混匀磁珠, **注意避免起泡**。

3、mRNA捕获及纯化

- 3.1 将稀释好的50 μ L Total RNA样本加入到50 μ L清洗好的磁珠中。

3.2 将反应体系旋涡振荡混匀，短暂离心使所有液体流至PCR管底部。

3.3 将样品放入提前预热的PCR仪（热盖可设置85℃），如下表进行反应，使mRNA与捕获磁珠结合：

步骤	温度	时间
变性	75 °C	2 min
杂交	25 °C	8 min
HOLD	25 °C	HOLD

3.4 反应结束后，从PCR仪中取出样品置于磁力架上，待溶液澄清后彻底吸弃上清，不要触动磁珠。

3.5 向PCR管中轻轻加入180 μL mRNA Washing Buffer，待溶液澄清后吸弃上清，不要触动磁珠。静置1min，若仍有液体残留，则换用小体积枪头吸弃干净残留液体。

注：若使用的PCR管体积为300 μL，则需加入250 μL mRNA Washing Buffer，以便充分清洗吸附到管壁上的RNA。

3.6 将PCR管从磁力架上取下，加入50 μL mRNA Elution Buffer，涡旋振荡彻底混匀磁珠，瞬间后将样本置于PCR仪中80℃反应2min。

4、mRNA再次捕获及纯化

4.1 向步骤3.6反应产物中加入50μL mRNA Binding Buffer 2，涡旋振荡彻底混匀磁珠，瞬间后放入提前预热的PCR仪中（热盖可设置85℃），按下表程序进行孵育：

步骤	温度	时间
变性	75 °C	2 min
杂交	25 °C	8 min
HOLD	25 °C	HOLD

4.2 反应结束后，从PCR仪中取出样品置于磁力架上，待溶液澄清后吸弃上清，不要触动磁珠。

4.3 向PCR管中轻轻加入180 μL mRNA Washing Buffer，待溶液澄清后彻底吸弃上清，不要触动磁珠。静置1min，若仍有液体残留，则换用小体积枪头吸弃干净残留液体。

注：若使用的PCR管体积为300 μL，则需加入250 μL mRNA Washing Buffer，以便充分清洗吸附到管壁上的RNA。

5、mRNA最终洗脱

- 5.1 若纯化产物用于逆转录反应，则从磁力架上取下样品，加入10 μ L RNase-Free Water，使用移液器反复吹打10次充分混匀磁珠。瞬时离心后，将样品置于PCR仪中80°C，2 min后，立即置于磁力架上静置至溶液澄清，小心吸取8 μ L上清至新的Nuclease-free PCR管中待用或置于-80°C中保存。
- 5.2 若纯化产物用于RNA文库构建，按照文库构建试剂说明书加入相应体积的Frag/Prime Buffer进行文库构建。