

版本号: NR210831

TIANSeq mRNA Capture Kit

TIANSeq mRNA捕获试剂盒

目录号: NR105

产品内容

产品组成	NR105-01 (24 rxn)	NR105-02 (96 rxn)
磁珠结合缓冲液TM (Beads Binding Buffer TM)	6 ml	24 ml
磁珠漂洗缓冲液TD (Beads Washing Buffer TD)	12 ml	48 ml
mRNA捕获磁珠 (mRNA Capture Beads)	240 μ l	960 μ l
无核酸酶双蒸水 (Nuclease-Free ddH ₂ O)	15 ml	15 ml

储存条件

2-8℃保存, 保质期为一年。

产品简介

TIANSeq mRNA capture Kit采用特殊设计偶联Oligo (dT)的磁珠专一性的捕获信使RNA (mRNA)，经过磁珠漂洗缓冲液洗涤去除非特异结合的非mRNA，能够获得人、小鼠、大鼠、植物总RNA中完整的mRNA。

该试剂盒对于完整的总RNA均具有良好的mRNA捕获效果，所获得的mRNA可用于高通量测序，可显著提高测序结果中有效数据比例。此外，纯化的mRNA也可用于随机引物cDNA合成或其它下游应用。

产品特点

样本广泛：适用于高质量（完整）样本中mRNA的捕获，建议RNA的RIN > 7。

数据全面：保留了完整的mRNA信息，提高转录组数据的有效性。

适用范围广：适用于100 ng-1 µg的RNA的捕获。

自备试剂：

mRNA富集：8-Tube Strip (0.2ml) Magic Frame (TIANGEN Cat# OSE-MF-04)、Nuclease-Free离心管及Nuclease-Free PCR管。

PCR检测mRNA捕获效率：rRNA Primer Mix, mRNA Primer Mix, FastKing RT Kit (With gDNase) (TIANGEN Cat#KR116), SuperReal PreMix Plus (SYBR Green) (TIANGEN Cat#FP205)。

注意事项 请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项

1. 操作过程请注意避免核酸样品和产物之间的交叉污染。
2. 请在无核酸的操作环境中操作实验，尤其是操作环境中核酸气溶胶污染要及时清除。
3. 请使用不含RNA酶或DNA酶的枪头、离心管进行实验。
4. 实验开始前，请清洁操作台，建议使用RNA酶及DNA酶清除试剂处理台面。确保没有RNA酶和DNA酶的污染。

操作步骤

1. 处理磁珠：将mRNA捕获磁珠从2-8℃冰箱取出，室温平衡5 min，期间涡旋混匀，吸取10 μl mRNA捕获磁珠于200 μl Nuclease-Free PCR管中，置于在磁力架上1 min，待溶液澄清后，小心吸弃上清。将EP管从磁力架上取出，加入50 μl磁珠结合缓冲液TM，反复吸吹6次洗涤磁珠，之后放置在磁力架上1 min，待溶液澄清后，小心吸弃上清，重复洗涤步骤一次，最后将磁珠重悬于50 μl 磁珠结合缓冲液TM中，室温放置备用。
2. 在200 μl Nuclease-Free PCR管中，用Nuclease -Free ddH₂O将100~1000 ng总RNA稀释至50 μl，冰上放置备用。

注意：总RNA样品中应无DNA、盐离子（例如Mg²⁺、胍盐）、有机试剂（例如酚、乙醇）残留，否则可能导致非预期的RNA降解或mRNA捕获效率降低。

3. 参照下表配制mRNA捕获反应体系：

组分名称	体积
处理后的mRNA捕获磁珠	50 μl
总RNA	50 μl
Total	100 μl

4. 将步骤3的mRNA捕获磁珠与RNA反应液用移液器吸吹混匀6次。
5. 将步骤4的反应液置于PCR仪中（启用热盖99~105℃均可），按以下程序操作，总共耗时约10 min。

步骤	温度	时间
1	65℃	2 min
2	20℃	5 min

6. 将步骤5的反应液置于磁力架上1 min，待溶液澄清后，小心吸弃上清。将管从磁力架上拿起，加入200 μ l磁珠漂洗缓冲液TD，反复吸吹几次充分洗涤，置于磁力架上1 min，待溶液澄清后，小心吸弃上清。
7. 加入50 μ l Nuclease-Free ddH₂O充分悬浮磁珠，之后置于PCR仪中（启用热盖99~105℃均可），按以下程序操作，总共耗时约10 min。

步骤	温度	时间
1	75℃	2 min
2	20℃	5 min

8. 向步骤7的反应液中加入50 μ l 磁珠结合缓冲液TM，反复吸吹数次以充分混匀，20℃放置5 min。
9. 将步骤8的反应液置于磁力架上，待溶液澄清后小心吸弃上清。
10. 将管从磁力架上取出，加入200 μ l磁珠漂洗缓冲液TD，反复吸吹几次充分洗涤，置于磁力架上，待溶液澄清后，小心吸弃上清。
11. 将样品从磁力架上取出，加入6.5 μ l Nuclease-Free ddH₂O，用移液器吹打10次混匀磁珠，室温静置2 min。

注意：上述洗脱体积适用于TIANSeq RNA文库构建试剂盒NR102或NR103，如搭配其他RNA建库产品，请根据产品说明书选择合适的洗脱体积。

12. 在磁力架上静置2 min，待溶液澄清后，不要触动磁珠，小心吸取5 μ l上清（可根据步骤11选择的实际洗脱体积进行相应调整，尽量充分利用洗脱产物）至新的Nuclease-Free PCR管。
13. 洗脱样品可立即用于RNA测序文库构建或其他分析应用，也可在-20℃保存过夜或在-80℃保存30天。

Real-time PCR检测（可选步骤）

本试剂盒提供两对定量PCR引物，分别为针对18S rRNA的rRNA Primer Mix和针对beta-actin的mRNA Primer Mix，建议以未进行mRNA捕获处理的等量初始总RNA为对照（需用Nuclease-Free ddH₂O或洗脱缓冲液稀释至洗脱体积），以评估mRNA捕获效率和rRNA残留比例。

两步法示例：逆转录用1 µl 的RNA产物作模板，合成第一链cDNA，然后定量PCR用2 µl cDNA作模板。试剂盒使用FastKing RT Kit (With gDNase) (TIANGEN Cat#KR116)和SuperReal PreMix Plus (SYBR Green) (TIANGEN Cat#FP205)。

1. 逆转录

1) 参照下表在冰上配制逆转录反应液：

组分名称	体积
RNase-Free ddH ₂ O	12 µl
5 × gDNA Buffer	2 µl
10 × King RT Buffer	2 µl
FQ-RT Primer Mix	2 µl
FastKing RT Enzyme Mix	1 µl
RNA	1 µl
Total	20 µl

2) 用移液器吸吹混匀并短暂离心，置于PCR仪中（热盖99-105℃），42℃孵育15 min，随后95℃孵育3 min。

3) 取出瞬时离心，得到的cDNA可用于后续定量实验，或在-20℃保存。

2. 定量PCR（以Bio-Rad CFX96为例）

1) 使用Nuclease-Free PCR管，参照下表在冰上配制定量PCR反应液：

组分名称	体积
2 × SuperReal PreMix Plus	10 µl
50 × ROX Reference Dye	0 µl ▲
rRNA Primer Mix或mRNA Primer Mix（自备）	1 µl
cDNA模板	2 µl
RNase-free ddH ₂ O	至20 µl

2) 用移液器吸吹混匀并短暂离心。

3) 将各管反应样品置于定量PCR仪中，参照下表开始进行检测：

阶段	循环	温度	时间	内容	荧光信号采集
预变性	1×	95℃	15 min	预变性	否
PCR反应	40×	95℃	10 sec	变性	否
		60℃	30 sec ▲	退火/延伸	是
熔解曲线分析（Melting/Dissociation Curve Stage）					

▲ 此处以Bio-Rad CFX96 Real Time System为例，其它定量PCR仪器请参照仪器使用说明书或SuperReal PreMix Plus (SYBR Green) (TIANGEN Cat#FP205) 试剂盒说明书的建议。

3. 供参考的两步法RT-PCR结果示例：以小鼠RNA为例

引物	RNA样品	Ct值
rRNA Primer Mix	未经mRNA捕获	9.11
	经mRNA捕获	21.37
mRNA Primer Mix	未经mRNA捕获	18.08
	经mRNA捕获	19.62



TIANGEN 官方微信，专业服务助力科研：

- 可视化操作指南
- 技术公开课合辑
- 全线产品查询
- 在线专家客服
- 微信直播课堂
- 最新优惠活动

浓缩国际权威精华， 铸就TIANGEN优秀品质！

TIANGEN为您提供国际化标准的生物学产品和服务

- PCR、RT-PCR系列
- 核酸DNA、RNA分离纯化系列
- DNA分子量标准
- 克隆载体、感受态细胞
- 细胞生物学产品
- 蛋白分子量标准
- 蛋白质染色、检测及定量相关产品