

# mRNA Poly(A) Tailing Kit

## mRNA加尾酶试剂盒

使用前请仔细阅读说明书

目录号: LA201

版本号: Version 2.0

保存: -18℃及其以下温度下保存一年。

### 产品说明

本产品反应时不依赖模板的存在, 催化ATP转化为AMP并依次掺入到RNA的3'末端, 即在mRNA的3'端加Poly(A)尾。多聚腺苷酸化修饰提高了RNA在细胞中的稳定性, 增强了转染或显微注射后RNA的表达效率。本产品具有很高的加尾效率, 且可平行放大体系用于在体外转录(JT101)及加帽后(LC101)mRNA的加尾修饰, 制备可用于细胞转染的RNA样品。

### 适用范围

- 1、mRNA体外合成(T7 High Efficiency Transcription Kit, 货号: JT101)及加帽修饰(mRNA Capping Kit, 货号: LC101)后在3'端添加Poly(A)尾, 可稳定5'帽结构, 提高mRNA在真核生物细胞中的稳定性及翻译效率。
- 2、加Poly (A)尾用于cDNA的反转录, 提供oligo-dT引物结合位点。
- 3、通过修饰的ATP或其类似物给RNA 3'末端添加标记。

### 试剂盒组成(30 µl反应体系)

| Component                      | LA201-01 (25 rxns) | LA201-02 (100 rxns) |
|--------------------------------|--------------------|---------------------|
| mRNA Poly(A) Tailing Enzymes   | 50 µl              | 200 µl              |
| 10×mRNA Poly(A) Tailing Buffer | 80 µl              | 320 µl              |
| RNase-free Water               | 1 ml               | 2×1 ml              |

**操作流程**(本步骤用于30 µl反应体系对≤10 µg RNA进行Poly(A)修饰, 可将使用mRNA Capping Kit (LC101)修饰过的20 µl加帽mRNA直接用于下述加尾反应)

- 1、取≤10 µg RNA至PCR管, 按照下表配制反应体系:

| 反应组分                           | 用量       |
|--------------------------------|----------|
| mRNA                           | ≤10 µg   |
| 10×mRNA Poly(A) Tailing Buffer | 3 µl     |
| mRNA Poly(A) Tailing Enzymes   | 0.5~2 µl |
| RNase-free Water               | To 30 µl |
| Total Volume                   | 30 µl    |

- 2、37℃孵育30分钟。65℃加热10~20分钟终止反应, 也可以直接对反应体系进行纯化。

### 产物纯化:

制备的RNA产物可以选用磁珠纯化 (EC501)、柱纯化 (ER701), 也可以采用酚/氯仿抽提法或氯化锂沉淀法, 以去除蛋白和游离的核苷酸。纯化后的RNA可用于下游实验或保存于-80℃。

#### 1、磁珠纯化

磁珠法可去除蛋白和游离核苷酸。操作流程请参考*MagicPure*® RNA Beads (EC501)说明书。

#### 2、柱纯化

柱法纯化可去除蛋白和游离核苷酸。纯化前先加入RNase-free Water将产物稀释至100 µl, 然后按照*EasyPure*® RNA Purification Kit (ER701)说明书进行纯化, 建议增加一次洗脱步骤以提高回收量。



\*注意：柱式纯化法的回收率相比磁珠法会低一些。

### 3、酚/氯仿纯化

酚/氯仿抽提法可以去除蛋白和大部分游离核苷酸，纯化步骤如下：

- 1) 加入RNase-free Water稀释产物至180  $\mu$ l；
- 2) 加入20  $\mu$ l 3 M的醋酸钠( pH 5.2)到上述稀释后的产物中，用移液器充分混匀；
- 3) 加入200  $\mu$ l的酚/氯仿(体积比1:1)混合液进行抽提，室温10,000 rpm离心5分钟，将上层水相溶液转移至新的1.5 ml离心管；
- 4) 加入与水等体积的氯仿抽提两次，收集上层水相；
- 5) 加入2倍体积的无水乙醇，混匀，在-20℃静置至少30分钟，4℃低温条件下15,000 rpm离心15分钟，弃上清；
- 6) 加入500  $\mu$ l预冷的70%乙醇洗涤RNA沉淀，4℃ 15,000 rpm离心5分钟，弃上清；
- 7) 在无RNase的环境中开盖干燥2分钟，加入20~50  $\mu$ l RNase-free Water溶解RNA沉淀。

### 4、氯化锂纯化

此方法要求RNA产物长度 > 300 nt且浓度不低于100 ng/ $\mu$ l，步骤如下：

- 1) 在30  $\mu$ l加尾反应混合物中加入45  $\mu$ l 氯化锂溶液(7.5 M LiCl, 50 mM EDTA)、45  $\mu$ l RNase-free Water，移液器充分混匀；
- 2) 在-20℃放置至少30分钟；
- 3) 15,000 rpm，在4℃离心15分钟，弃上清，收集沉淀；
- 4) 加入500  $\mu$ l预冷的70%乙醇洗涤RNA沉淀，4℃ 15,000 rpm离心，弃上清，洗三次；
- 5) 用RNase-free Water溶解RNA沉淀，检测后保存于-80℃。

### 注意事项

- 避免RNase污染：请务必使用RNase-free的水、移液枪头(带滤芯)和离心管，操作过程穿戴实验服和手套。
- 不同实验需要的加A数量不同，可通过调整酶量、反应时间及RNA底物浓度控制Poly(A)长度。使用本产品对10  $\mu$ g mRNA(0.4 k左右)进行加尾反应，一般加入2  $\mu$ l酶在37℃反应30分钟可以在RNA的3'端加上约150个A碱基，60分钟可加上约200个A碱基。初次使用本产品时，建议根据下文数据参考及预期Poly(A)长度摸索具体反应条件。
- 使用本产品，相同的反应体系并不会对所有的RNA加入等量的A碱基，加A数量也与RNA自身长度有关，对等质量但不同长度的RNA加尾，由于体系中RNA的摩尔数不同，在相同反应条件下长片段的加A数量大于短片段(例如，10  $\mu$ g长度为3 k的RNA摩尔数少于0.4 k的摩尔数，长片段游离的3'末端更少，因此能加入更多的A碱基)。
- 加尾结束后，若RNA产物需要用于细胞转染或显微注射，必须进行纯化处理。
- 反应体系可根据实验需要按比例进行放大或缩小，例如，在利用mRNA Capping Enzymes Kit(LC101)进行加帽修饰(100  $\mu$ l加帽mRNA)后的mRNA可直接用于下表推荐的加尾反应：

| 反应组分                           | 体积                               |
|--------------------------------|----------------------------------|
| mRNA                           | 100 $\mu$ l ( $\leq$ 50 $\mu$ g) |
| 10×mRNA Poly(A) Tailing Buffer | 15 $\mu$ l                       |
| mRNA Poly(A) Tailing Enzymes   | 2.5~10 $\mu$ l                   |
| RNase-free Water               | To 150 $\mu$ l                   |
| Total Volume                   | 150 $\mu$ l                      |



## 数据参考

### 1、本产品加A长度与酶量、反应时间及底物RNA投入量的关系图

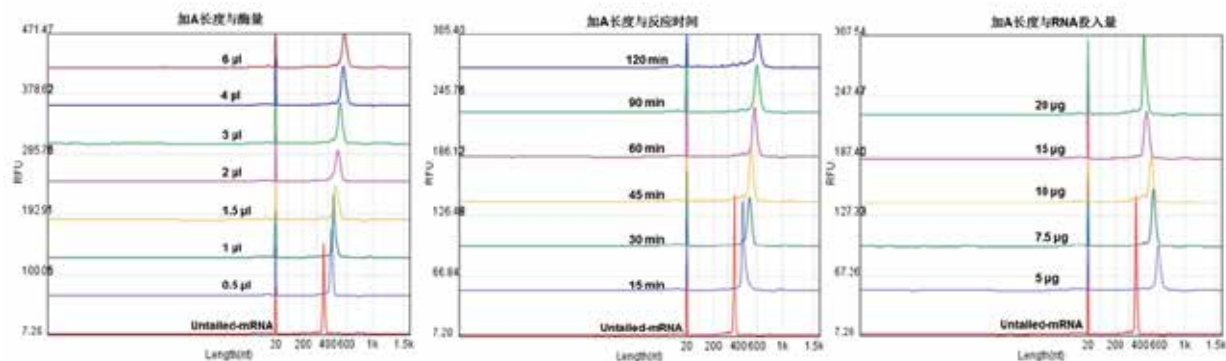


图1. 本产品反应性能结果展示 (一)

相同反应时间 (30分钟) 及底物RNA投入量 (10  $\mu$ g) 条件下加尾长度随酶量增加而增大；等量酶 (2  $\mu$ l) 及底物RNA用量 (10  $\mu$ g) 条件下加A数量随反应时间延长而增加；等量酶 (2  $\mu$ l) 及相同反应时间 (30分钟) 条件下加A数量随RNA底物浓度增加而减小。本数据展示中加尾前的mRNA长度约0.4 k。

### 2、本产品加A数量与酶量、反应时间及底物RNA投入量的定量关系图

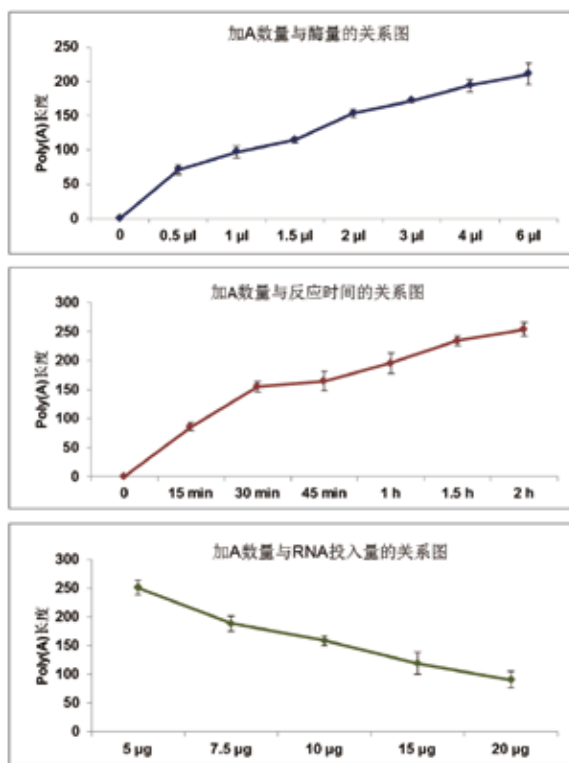


图2. 本产品反应性能结果展示(二)



## 常见问题与解决方案

### 1、Poly(A)尾太长

若获得的Poly(A)尾比预期长，可通过减少酶量、缩短反应时间来减少加A数量，也可以在反应体系中引入更多的RNA以提高体系中底物RNA的浓度或减小反应体系的体积来实现。

### 2、Poly(A)尾太短

若获得的Poly(A)尾比预期短，可通过增加加大酶量、延长反应时间来增加Poly(A)长度，也可以在反应体系中减少RNA投入量以降低体系中底物RNA的浓度或增大反应体系的体积来实现，或者额外加入一些ATP原料。

### 3、加尾失败

加尾反应失败可能由以下原因导致：①RNA的3'端结构复杂，易形成二级结构；②RNA底物降解或被污染；③酶失活。加尾反应前可通过适当加热（70℃处理3分钟）以解除二级结构的影响，重新制备或再次纯化RNA以保证底物完整性及纯度；确认酶是否一直保存于-20℃且实验操作时酶需置于冰上。

## 质量控制

| 项目        | 标准         | 方法                                                            |
|-----------|------------|---------------------------------------------------------------|
| 产品外观      | 透明澄清       | 目视检查                                                          |
| 纯度        | ≥95%       | SDS-PAGE或SEC-HPLC                                             |
| 核酸外切酶活性   | 未检出        | 10 U酶与1 μg Hela gDNA在37℃孵育16小时                                |
| 核酸内切酶活性   | 未检出        | 10 U酶与1 μg pUC19质粒在37℃孵育16小时                                  |
| 非特异性核酸酶活性 | 未检出        | 10 U酶与1 μg的1 kb DNA Ladder在37℃孵育16小时                          |
| RNase残留   | 未检出        | 10 U酶与1 μg Hela RNA/体外转录RNA在37℃孵育4小时                          |
| 细菌残留      | 未检出        | 涂板于LB培养基于37℃培养2天无菌落形成，或于SOC液体培养基过夜培养检测OD <sub>600</sub> 无明显变化 |
| 细菌内毒素含量   | < 10 EU/mg | 中国药典2020版第四部凝胶限度实验 (通则1143)                                   |
| 大肠杆菌DNA残留 | ≤1拷贝/U     | 荧光定量PCR法                                                      |
| 支原体检测     | 阴性         | 支原体检测试剂盒                                                      |

本产品仅供研究，不用于临床诊断。

版本号: V2.0-202206

服务电话 +86-10-57815020

服务邮箱 complaints@transgen.com

