



HiScribe™ T7 mRNA 合成试剂盒 (含 CleanCap® Reagent AG)

产品概述

对于大多数真核生物来说，mRNA 需要 5' 端带有 7-甲基鸟苷 (m7G) 帽结构，3' 端带有 poly (A) 尾才能有效翻译。HiScribe™ T7 mRNA 合成试剂盒 (含 CleanCap® Reagent AG) 优化了 RNA 合成配方，利用三核苷酸帽结构类似物技术，通过一步共转录加帽即可获得带有天然的 Cap-1 结构的 mRNA，且不会影响 RNA 产量。使用含 T7 启动子序列、AG 起始的目标序列和 poly (A) 尾编码序列的 DNA 模板，即可转录带有 5' -m7G Cap-1 和 poly (A) 尾的 mRNA，该 mRNA 能够有效翻译并能逃避细胞先天免疫反应。

HiScribe™ T7 mRNA 合成试剂盒 (含 CleanCap® Reagent AG) (E2080) 包含单独包装的 NTP 和 CleanCap Reagent AG，适用于全部/部分修饰 NTPs 替换，试剂盒总产量为 1.8 mg mRNA。使用该试剂盒合成的 Cap-1 mRNA 适用于多种应用，包括：转染、显微注射、体外翻译、临床前 mRNA 治疗研究以及 RNA 结构和功能分析。

该试剂盒可完成 20 次共转录反应 (20 µl 体系)。使用 1 µg CLuc AG 对照模板 DNA 进行标准反应，可转录 ≥90 µg RNA。每个试剂盒的产量 ≥1.8 mg RNA。

产品优势

- 可一步完成共转录加帽流程，加帽效率 > 95%
- 使用 CleanCap Reagent AG 三核苷酸帽技术可获得带有天然的 Cap1 结构的 mRNA，极大的提高了翻译效率，减少了自身免疫反应
- 经优化设计，mRNA 产量高，使用 1 µg 对照模板，单次反应可转录高达 90 µg Cap-1 mRNA
- 独立包装的 NTP 适用于全部/部分修饰 NTPs 替换

产品组分

- T7 RNA Polymerase Mix
- 10X T7 CleanCap Reagent AG Reaction Buffer
- ATP
- GTP
- CTP
- UTP
- CleanCap Reagent AG
- CLuc AG Control Template
- DNaseI (RNase-free)
- LiCl Solution

图 1: CleanCap Reagent AG 分子结构

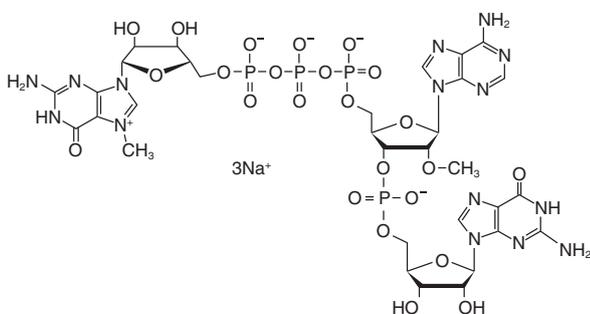
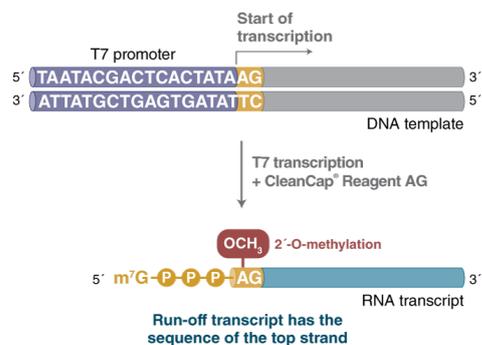


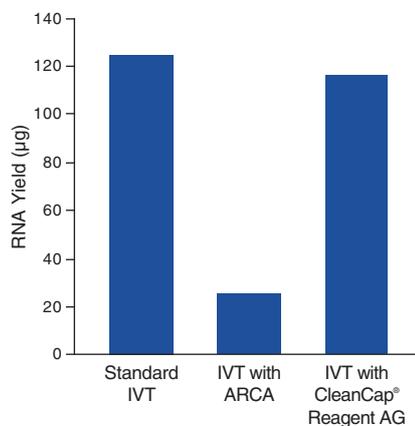
图 2: 使用 CleanCap Reagent AG 时，启动子和起始序列示意图



HiScribe™ T7 mRNA 合成试剂盒 (含 CleanCap® Reagent AG)

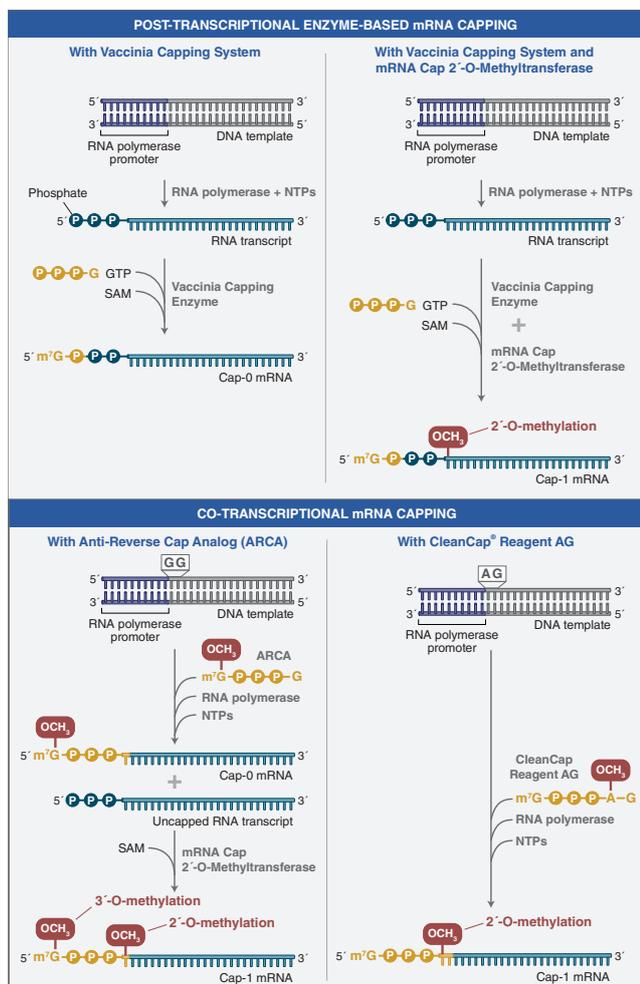


图 3: 比较不同体外转录试剂 (无帽结构类似物、ARCA 抗逆转帽 或 CleanCap Reagent AG) 的 RNA 产量



所有反应均使用 5 mM CTP、5 mM UTP 和 6 mM ATP 进行。标准 IVT 反应使用 5 mM GTP, 不添加帽结构类似物。ARCA 反应使用 4: 1 的 ARCA: GTP (4 mM: 1 mM)。含 CleanCap Reagent AG 的 IVT 反应使用 5 mM GTP 和 4 mM CleanCap Reagent AG, 反应体系分别参照以下说明书配制: 标准 mRNA 合成和 HiScribe T7 mRNA 合成试剂盒 (含 CleanCap Reagent AG)。反应在 37°C 下孵育 2 小时, 通过 NanoDrop 检测纯度和定量。

图 4: 体外转录加帽的方法比较



酶法加帽 (上图) 即在体外转录完成后, 使用 5'-三磷酸 RNA、GTP 和 S-腺苷甲硫氨酸 (SAM) 在 mRNA 的 5' 末端加帽。使用 mRNA 帽结构 2'-O-甲基转移酶 (MTase) 和 SAM 可以将 Cap-0 mRNA 转化为 Cap-1 mRNA, 该步骤可与酶法加帽同时进行, 也可在其后进行。由甲基转移酶转到转录本第一个核苷酸 2'-O 位置的甲基用红色表示。使用酶法加帽通常可将 ~100% 的 5'-三磷酸转录本转化为加帽 mRNA。

共转录加帽 (下图) 即在转录反应中使用 mRNA 帽结构类似物 (用黄色表示)。ARCA (抗逆转帽) (左图) 作为转录的第一个核苷酸掺入。在 ARCA 中的 7-甲基鸟苷上含有一个额外的 3'-O-甲基, 以确保掺入方向正确。3'-O-甲基修饰在天然 mRNA 帽中不存在。该反应与无帽结构类似物相比, 转录产量较低。在之后的反应中, 可使用 mRNA 帽结构 2'-O-甲基转移酶和 SAM 将含 ARCA 帽的 mRNA 转化为 Cap-1 mRNA。CleanCap Reagent AG (右图) 使用三核苷酸帽结构类似物, 因此需要修改模板的起始序列。仅需一步反应即可获得含天然 Cap-1 结构的 mRNA。

www.neb-china.com



be INSPIRED
drive DISCOVERY
stay GENUINE

NEB (北京) 100083
北京海淀区王庄路 1 号清华同方科技广场 B 座 0612
客服热线: 400-811-2220 / 400-690-3366

网址: www.neb-china.com
官方微信: NEBiolabs 电邮: support@neb-china.com

