

LZCap®AG(3'Ma-Cy5) Capping Kit (N1-Me-pUTP)

产品介绍: LZCap®AG(3'Ma-Cy5) mRNA 共转录加帽及纯化试剂盒, 用于在体外共转录合成含有 Cap1 结构的 mRNA, 核心组分 LZCap®AG(3'Ma-Cy5)是一种带 Cy5 荧光基团的 Cap1 类似物, 在 T7 聚合酶作用下以共转录的方式合成到 mRNA 的 5' 端。试剂盒内包含了 DNase I 和 LiCl, 用于 mRNA 纯化。检测 LZCap®AG(3'Ma-Cy5) mRNA 的 Cy5 荧光推荐波长: (640/675)。

规格及组份: 20 次/盒 (20µL 体系)

序号	组分	原浓度	20 Test
1	LZCap®AG(3'Ma-Cy5)	25 mM	64 µL
2	ATP	100 mM	20 µL
3	N1-Me-UTP	100 mM	20 µL
4	CTP	100 mM	20 µL
5	GTP	100 mM	20 µL
6	10×Fluro Transcription Buffer	/	40 µL
7	Enzyme Mix	/	80 µL
8	Recombinant DNase I(RNase-free)	5 U/µL	40 µL
9	LiCl	7.5 M	1 mL
10	Control	0.5 µg/µL	4 µL
11	RNase Free Water	/	2 mL

保 存: 低于-15°C 保存。

DNA 模板设计: 本试剂盒以 LZCap®AG(3'Ma-Cy5)为核心, 适用于 AG 起始的序列, 如下图所示, T7 启动子 (下划线标识部分) 后接 AG 序列能够有效起始转录。

```

5' TAATACGACTCACTATA AG GNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN 3'
3' ATTATGCTGAGTGATAT TC CNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN 5'
    
```

T7 聚合酶转录+ LZCap®AG(3'Ma-Cy5)

```

5' GAGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN 3'
    
```

实验流程:

1. 参考以下产品组份表室温配置转录体系;

组分	体积	终浓度
ATP (100 mM)	1 μ L	5 mM
N1-Me-UTP (100 mM)	1 μ L	5 mM
CTP (100 mM)	1 μ L	5 mM
GTP (100 mM)	1 μ L	5 mM
LZCap®AG(3'Ma-Cy5) (25mM)	3.2 μ L	4 mM
10 \times Fluro Transcription Buffer	2 μ L	1 \times
Enzyme Mix	4 μ L	/
Linear DNA+ RNase Free Water	6.8 μ L	50 ng/ μ L
终体积	20 μ L	

2. 将配置好的反应液混匀, 短暂离心后, 置于 37°C 孵育 2-3 小时, 若转录本长度小于 100nt, 增加反应时间至 4-8h;

3. 反应结束后, 各管再加入 2 μ L 的 DNase I, 37°C 反应 15min, 消化 DNA 模板;

4. LiCl 沉淀法纯化

1) 反应后 20 μ L 的转录产物内分别加入 50 μ L 的 LiCl 和 10 μ L RNase Free Water (LiCl 终浓度需保持在 4.5-4.8M), 混匀后放入 -20°C 沉淀至少 0.5h;

2) 取出沉淀后产物, 12000rpm 离心 15min, 去除上清液, 保留沉淀;

3) 加入预冷的 75%乙醇 (现配现用) 600 μ L 清洗, 12000rpm 离心 8min, 去除上清;

4) 放超净台静置 10min 至乙醇完全挥发, 用 30-100 μ L RNase Free Water 溶解 RNA 沉淀, 即获得纯化后的目标 mRNA。

注意事项:

1. LZ Cap®AG(3'Ma-Cy5)适用于以 5' AG 起始序列的 T7 启动子转录载体, 在载体构建时需要加以考虑。

2. LZ Cap®AG(3'Ma-Cy5)和其 mRNA 产物的储存使用应当注意避光。

3. 实验所用的试剂耗材和容器等无 RNase 污染。

4. 建议使用线性化的 DNA 模板进行转录, 每个反应中可加 1 μ g; 若使用 PCR 产物作为转录起始模板, 可加 0.1 μ g~1 μ g; 合成的 DNA 模板, 可加 0.1 μ g~0.5 μ g。

5. 使用修饰核苷酸代替野生型核苷酸时, 反应终浓度不变; mRNA 产物的 OD260/280 比值与常规 mRNA 可能会有所不同。

6. 推荐用预冷的 75%乙醇洗一次 mRNA 沉淀, 反复多次洗涤会影响荧光基团。

7. 由于 10 \times Fluro Transcription Buffer 浓度偏高, 高盐环境会导致聚合酶失活, 同时 buffer 中含有成分, 会与模板 DNA 形成沉淀, 配制反应液时需调整组分加样顺序, 计算好体系, 先加水, 然后加 buffer, NTP, 最后加模板和酶 mix, 以防止 10 \times 的高浓度盐离子对酶造成影响。