

使用 RiboMAX™ System 合成含有 5' Cap 1 结构和多达两种修饰核苷酸的转录本

使用 RiboMAX™ Large Scale RNA Production System-T7 合成含有 5' Cap 1 结构和修饰核苷酸的转录本。

试剂盒: RiboMAX™ Large Scale RNA Production System-T7 (目录号 P1300)

分析:

- 基于荧光染料的定量分析
- TapeStation RNA ScreenTape 检测
- 翻译

所需材料:

- 含 T7 启动子和 AGG 启动序列的纯化线性 DNA 模板
- RiboMAX™ Large Scale RNA Production System-T7 (Promega, 目录号 P1300)
- CleanCap® Reagent AG 或 CleanCap® Reagent AG (3' OMe) (TriLink Biotechnologies, 目录号分别为 N-7113 或 N-7413)
- 5- 甲基胞苷 -5'- 三磷酸 (TriLink Biotechnologies, 目录号 N-1014)
- N¹- 甲基假尿嘧啶 -5'- 三磷酸 (TriLink Biotechnologies, 目录号 N-1081)
- 将加热块或热循环仪设置为 37°C

该方案由 Promega Applications Scientists 开发, 仅供研究使用。

用户有责任确定方案对其应用程序的适用性。

如需更多信息, 请参阅技术手册 TB166, 可在以下网址获取手册:

www.promega.com/protocols

或联系技术服务:

chinatechserv@promega.com

方案：

参考 RiboMAX™ Large Scale RNA Production System-T7 操作手册 TB166，制备用于转录的高质量 / 高纯度的模板 DNA。避免产生 3' 端突出。

1. 解冻所有组分。冰上放置 caps、核苷酸和酶混合物（T7）。制备单次使用的等分试样。
2. 轻弹混匀含各组分的试管，短暂离心。
3. 根据表 1 准备转录反应体系，按指定顺序加入各组分。加入 cap 后涡旋振荡并短暂离心，加入 T7 的 5X 转录缓冲液后再次涡旋振荡并离心。为方便起见，可制备与所需核苷酸等体积的贮备混合物。
4. 使用移液器轻轻吹打 10 次或轻弹反应管 10 次混匀，然后短暂离心。
5. 37°C 下孵育反应液 2~3 小时。
6. 如下所示，使用所需的纯化方法纯化转录本或消化 DNA 模板（可选）。

消化 DNA 模板（可选）：

1. 孵育后，直接向反应液加入 RQ1-RNase-Free DNase，至终浓度为 1U/μg 模板 DNA。
2. 在 37°C 下孵育 15 分钟。
3. 选择所需的方法纯化转录本。

表 1. 反应组分和加入顺序。根据这些参数放大或缩小反应。可能需要优化 DNA 模板浓度。

体积（微升）	最终浓度 / 投入	组份
终体积 20	--	无核酸酶水
1	5mM	rATP（100mM）
1	5mM	rGTP（100mM）
1	5mM	rUTP 或 N ¹ - 甲基 - 假 UTP（100mM）
1	5mM	rCTP 或 5- 甲基 -CTP（100mM）
0.8	4mM	CleanCap® Reagent AG（100mM）
4	1X	T7 的 5X 转录缓冲液
变量	1μg	线性 DNA 模板
2	1X	酶混合物（T7）

结果：使用 RiboMAX™ Large Scale RNA Production System-T7 合成含有 N¹- 甲基 - 假 UTP 或同时含有 N¹- 甲基 - 假 UTP 和 5- 甲基 -CTP 的高质量 RNA 转录本。根据本文描述的方案，使用 CleanCap® Reagent AG (3' OMe) 对转录本进行共转录加帽。

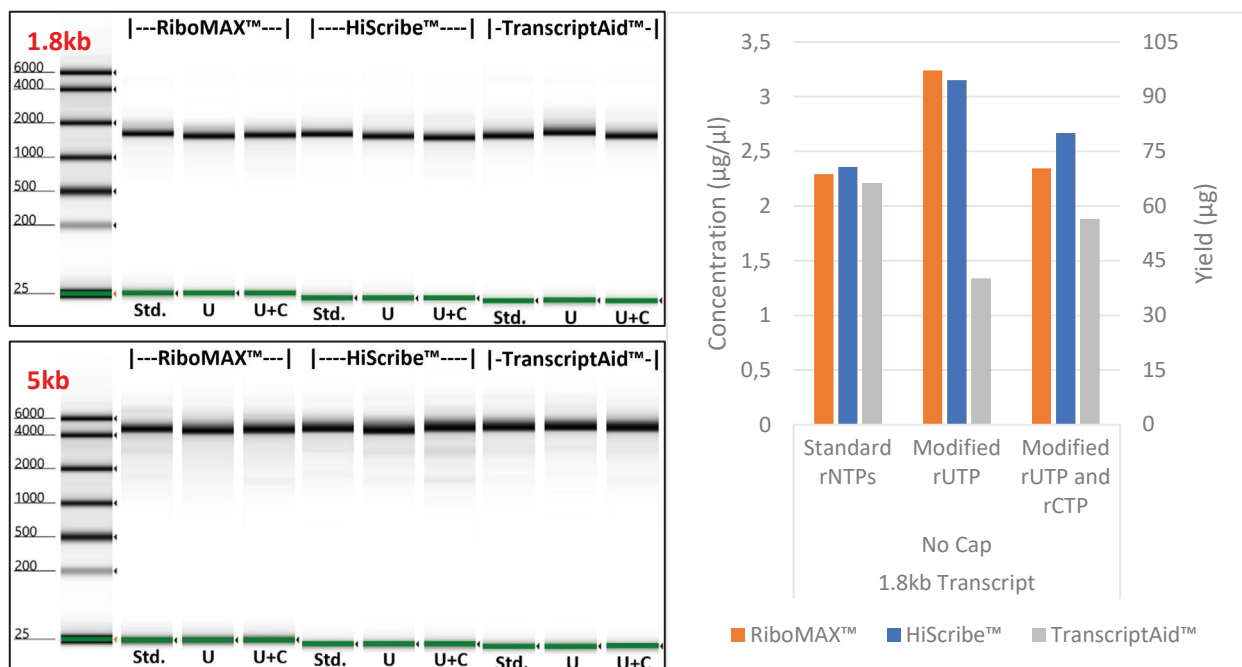


图 1. 使用 RiboMAX™ Large Scale RNA Production System-T7、HiScribe™ T7 High Yield RNA Synthesis Kit 和 TranscriptAid™ T7 High Yield Transcription Kit 合成含有标准核苷酸 (Std.)、N¹- 甲基 - 假 UTP (U) 和同时含 N¹- 甲基 - 假 UTP + 5- 甲基 -CTP (U + C) 的 1.8kb 表达萤光素酶的转录本和 5kb 的 run-off 转录本。根据本文描述的方案，使用 CleanCap® Reagent AG (3' OMe) 对转录本进行共转录加帽。**左上：**用无核酸酶水按 1:100 比例稀释转录产物，并使用 RNA ScreenTape Assay 分析。显示每个试剂盒合成的转录本的凝胶图像。将泳道中的最高峰峰值作为内参对条带进行归一化 (标本归一化)。**右上：**使用柱式 RNA 纯化试剂盒纯化 1.8kb 的转录本，并使用 QuantiFluor® RNA System (目录号 E3310) 对转录本定量。显示 1.8kb 纯化转录本的浓度和产量。**左下：**使用 Rabbit Reticulocyte Lysate, Nuclease Treated (目录号 L416A) 合成 1.8kb 的含萤光素酶的转录本，然后采用 ONE-Glo™ Luciferase Assay System (目录号 E6110) 测定萤光素酶的表达，以平均值 ± 标准方差 (n = 2) 表示，评估转录本的体外翻译效率。**右下：**将 1.8kb 的含萤光素酶的转录本转染到 HEK293 细胞，然后采用 ONE-Glo™ + Tox Luciferase Reporter and Cell Viability Assay (目录号 E7110) 测定细胞活力校正后的萤光素酶的表达，以平均值 ± 标准方差 (n = 4) 表示，评估转录本的体内翻译效率。