

使用 RiboMAX™ 合成含修饰核苷酸的转录本

RiboMAX™ Large Scale RNA Production Systems 可将修饰核苷酸合成到转录本中。修饰核苷酸通常用于改变转录本在体内的免疫原性和 / 或稳定性。

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

RiboMAX™ Large Scale RNA Production System-
SP6 (目录号 P1280)

分析: TapeStation RNA ScreenTape

所需材料:

- 线性 DNA 模板
- 修饰核苷酸 (参见 TriLink Biotechnologies)
- 加热块 / 恒温混匀仪® / 热循环仪, 设置为 37°C, 孵育反应液

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

实验方案:

请参阅 RiboMAX™ Large Scale RNA Production Systems 技术公告 TB166, 了解体外转录体系中 DNA 模板的制备指导。

注意: 如果 DNA 模板经 PCR 的扩增或质粒的限制性酶切消化产生, 则应使用 ReliaPrep™ DNA Clean-Up and Concentration System (目录号 A2892) 或类似产品纯化 DNA。

1. 如表 1 所示, 准备核苷酸混合物。

A. 为完成转录本中修饰核苷酸的 100% 替换, 用相似的修饰核苷酸替换天然核苷酸*。(例如: 为 100% 掺入 N¹-甲基-假 UTP, 去除混合物中的 rUTP, 并替换为表 1 中所示的修饰核苷酸)。

* 注意: 为获得全长转录本的最佳产量, 可能需要调整反应中修饰核苷酸的相对浓度。

表 1. 制备用于体外转录的核苷酸混合物

	对照：天然核苷酸	示例：加入 N ¹ - 甲基 - 假 UTP
rATP, 100mM	20μl	20μl
rUTP, 100mM	20μl	--
rCTP, 100mM	20μl	20μl
rGTP, 100mM	20μl	20μl
Other, 100mM	--	20μl 的 100mM N ¹ - 甲基 - 假 UTP

2. 根据表 2 配置体外转录反应体系。按表中列出的顺序添加试剂，然后轻轻移液混合。
 - a. 根据需要回收的转录本量，缩放反应体系。通常 1ml 反应体系在 2~4 小时内可产生 2~5mg 的 RNA。

表 2. 配置完整的体外转录反应体系。

	体积 (微升)	
	T7 反应体系	SP6 反应体系
5X 转录缓冲液	20	20
核苷酸混合物 (表 1)	30	20
5μg 模板加无核酸酶水	40	50
T7 酶混合物	10	10
最终体积	100	

3. 37°C 下孵育反应液 2~4 小时。
4. 将 RQ1 RNase-free DNase 以浓度为 1U/μg 对应模板量加入反应液中，并轻轻移液混合。
5. 在 37°C 下孵育 15 分钟。
6. 如果需要，按照 TB166 第 4B 节中的说明进行纯化反应。

结果:

Results:

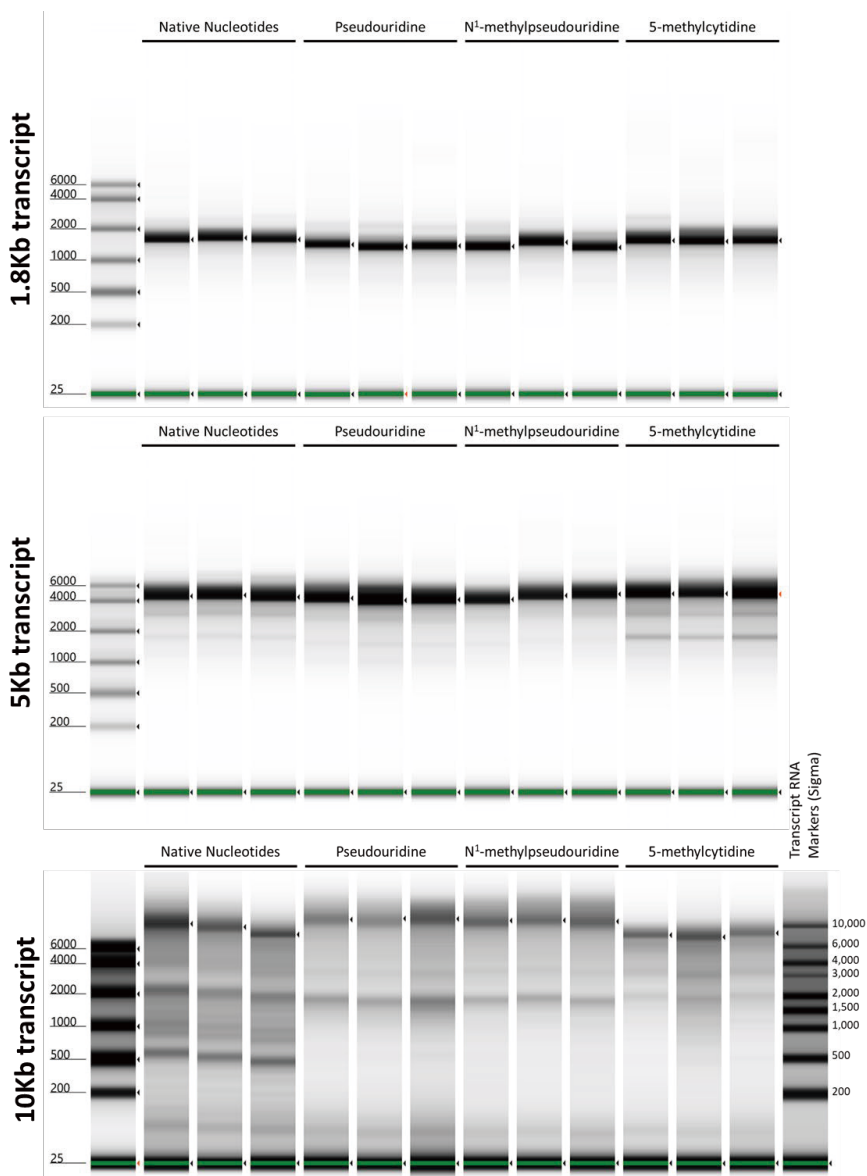


图 1. 用修饰核苷酸分析体外转录产生的转录本。 RiboMAX™ Large Scale RNA Production System (目录号 P1300) 中含足够的试剂用于转录三种 DNA 模板的 20μl 反应体系, 其中加入了 1μg 的模板, 产生 1.8Kb、5Kb 和 10Kb 的转录本。制备含无修饰核苷酸 (即天然核苷酸)、假 UTP (TriLink Biotechnologies, 目录号 N-1019-5), N¹-甲基-假 UTP (TriLink Biotechnologies, 目录号 N-1081-5) 或 5-甲基-CTP (TriLink Biotechnologies, 目录号 N-1014-5) 的各个转录反应体系。对于 1.8Kb 和 5Kb 的转录本, 反应体系中修饰核苷酸以 1X 浓度 (相对于天然核苷酸), 即 7.5mM, 代替天然核苷酸。对于 10Kb 的转录本, 反应体系中修饰核苷酸需以 2X 浓度 (15mM) 代替天然核苷酸, 因为仅含有 1X 的修饰核苷酸时几乎无转录本产生 (数据未显示)。应用 RQ1 RNase-Free DNase 去除 DNA 模板, 然后稀释反应液, 通过 TapeStation RNA ScreenTape 分析。小箭头表示用于分析浓度的条带, 以确定表 3 中报告的反应产率。

表 3. 相对于仅包含天然核苷酸的对照反应，使用修饰核苷酸进行体外转录反应的转录产量。根据 RNA ScreenTape 分析（图 1）确定的全长转录本浓度计算转录产量，根据样品稀释度调整浓度并乘以反应体积（20 μ l）。相对于仅包含天然核苷酸的对照反应，计算含有修饰核苷酸的反应的产率百分比。显示每个反应的条件和测试的转录本长度，数据为三次重复实验的平均值 $\pm$ 标准偏差。

	1.8Kb 的转录本		5Kb 的转录本		10Kb 的转录本	
	mg/ml	相对于对照反应的产率百分比	mg/ml	相对于对照反应的产率百分比	μ g/ml	相对于对照反应的产率百分比
对照反应	3.99 $\pm$ 0.25	100	5.47 $\pm$ 0.35	100	252.0 $\pm$ 63.0	100
假 UTP	4.17 $\pm$ 0.08	104	6.95 $\pm$ 1.39	127	167.6 $\pm$ 17.4	67
N ¹ - 甲基 - 假 UTP	4.92 $\pm$ 0.34	123	4.7 $\pm$ 0.67	86.0	213.2 $\pm$ 18.7	85
5- 甲基 -CTP	5.22 $\pm$ 0.38	131	6.55 $\pm$ 1.05	120	172.7 $\pm$ 34.7	69