

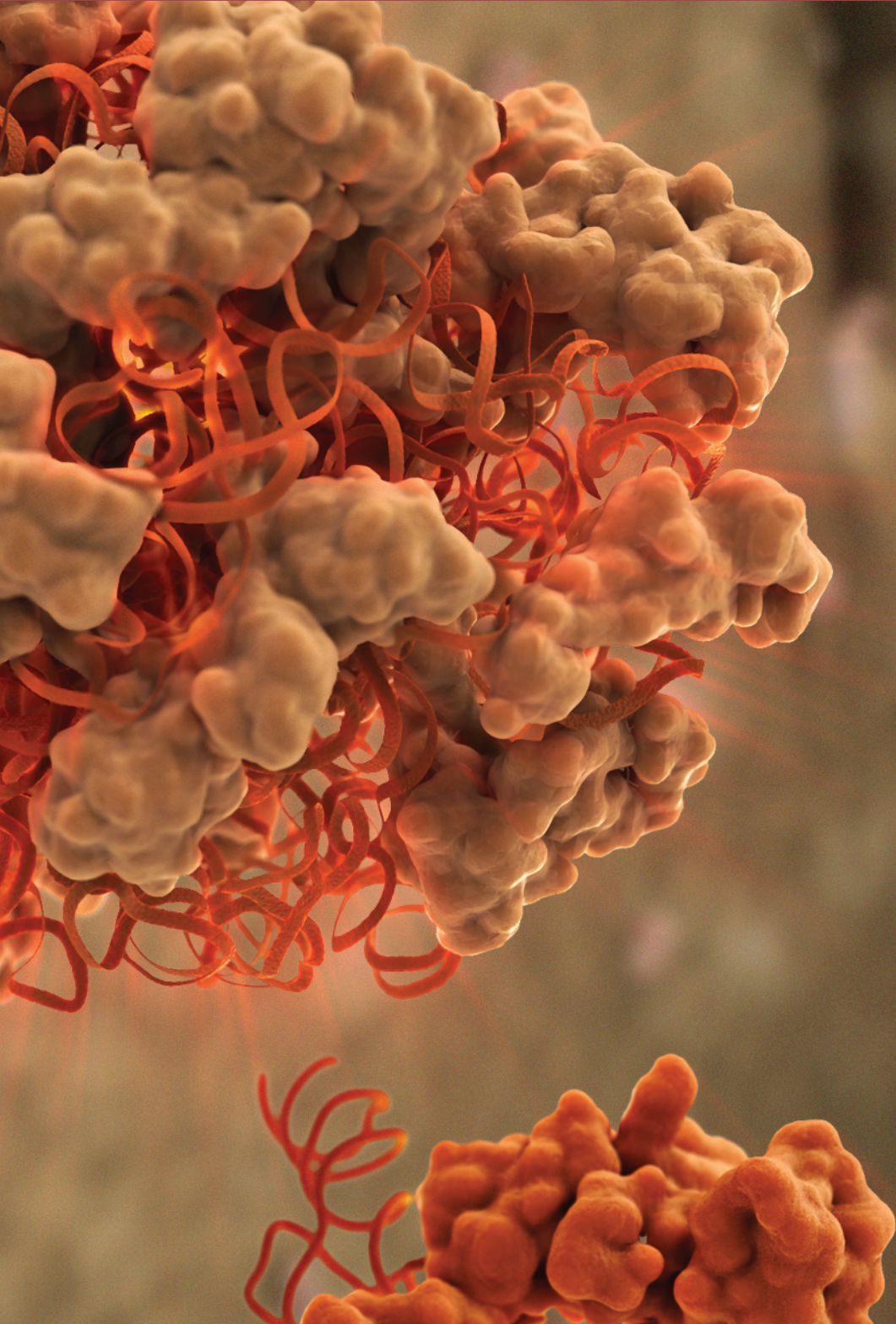


新产品

RNase R, RNase 4 & 修饰核苷酸

RNA 合成

从模板到转录



RNA 合成: 从模板到转录的工具

近 50 年来, NEB 一直是生命科学领域的领跑者, 在试剂的生产和研发方面成就卓越。从模板的合成、转录、加帽、加尾以及合成后的纯化, 都离不开有着丰富专业酶学经验的 NEB, NEB 为合成高质量 RNA 提供系列试剂。这些产品是依据数十年的分子生物学经验沉积而设计和生产的, 因此您可以完全放心的用于您的实验。



了解更多 RNA 相关产品和实验方案, 例如 RNA 合成, 请登录: NEBerna.com

体外合成单链 RNA 是一种常见实验方法, 对 RNA 研究和 RNA 药物至关重要。该技术应用广泛, 研究人员可按需合成转录本, 并同时引入修饰碱基。下游应用包括: 在 RNA-蛋白质相互作用和结构分析中研究 RNA 的生化特性和分子表征、合成 RNA 适配体、合成用于表达的功能性 mRNA、合成用于基因表达调控的小 RNA (例如: gRNA, RNAi)。此外, 体外转录还可用于 RNA 疫苗和 CRISPR/Cas9 基因编辑工具的开发、多能干细胞的生成、RNA 抑制剂的筛选以及基于 RNA 扩增的分子诊断。

对于体外转录来说, 研究人员需要对每个反应组分进行优化, 才能达到高产量和稳定的功效。NEB 提供五种体外 RNA 合成试剂盒, 这些试剂盒均经过优化, 可稳定合成高质量 RNA。此外, 组成试剂盒的体外转录 (IVT) 试剂和 mRNA 加帽试剂也可单独购买。

NEB 的研究级别和 GMP 级别*产品可以支持您从实验室规模到商业规模的 mRNA 生产。优化的 HiScribe™ mRNA 合成试剂盒可实现便捷的体外转录 (IVT) 流程。当需要扩大产能并优化反应组分时, 我们可提供独立的 GMP 级别试剂, 帮助您从基础科研无缝过渡到大规模治疗性生产。

* “GMP 级别” 是 NEB 的品牌用语, 用于描述由我公司位于美国马萨诸塞州 Rowley 市的工厂所生产的试剂, 我们通过控制生产程序和过程, 在更严谨的条件下生产试剂, 以达到更高的产品标准, 并符合 ISO9001 和 ISO13485 质量管理体系标准。NEB 不生产或销售活性药物成分 (APIs), 也没完全按照药品生产管理规范来生产其产品。

mRNA 合成流程及 NEB 相关产品

模板生成	体外转录	RNA 加帽	POLY (A) 加尾	RNA 纯化
Q5® Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase	HiScribe® T7 mRNA Kit with CleanCap® Reagent AG		<i>E. coli</i> Poly(A) Polymerase	Monarch® Spin RNA Cleanup Kit (10 µg)
	HiScribe T7 ARCA mRNA Synthesis Kit (with tailing)			
phi29 DNA Polymerase	HiScribe T7 ARCA mRNA Synthesis Kit			Monarch Spin RNA Cleanup Kit (50 µg)
TelN Protelomerase	HiScribe T7 High Yield RNA Synthesis Components	Faustovirus Capping Enzyme		Monarch Spin RNA Cleanup Kit (500 µg)
dNTP solution mixes		Vaccinia Capping System		
BspQ1*	HiScribe T7 Quick High Yield RNA Synthesis Kit	mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase		Lithium Chloride
NEBuffer™ 4	HiScribe SP6 High Yield RNA Synthesis Kit	ARCA and other mRNA cap analogs		
DNA Assembly: • NEBuilder HiFi DNA Assembly • Golden Gate Assembly	T3 & SP6 RNA Polymerases	S-Adenosylmethionine (SAM)		
	T7 RNA Polymerase			
	Hi-T7 RNA Polymerase			
	Companion Products			Companion Products
	RNase inhibitor (Murine)			Monarch Buffer BX
	RNase Inhibitor (Human Placental)			Monarch Buffer WX
	Pyrophosphatase, Inorganic (<i>E. coli</i>)			Nuclease-free Water
	Pyrophosphatase, Inorganic (Yeast)			
	DNase I (RNase-free)			
	DNase I-XT			
	NTPs			
	Modified NTPs			

= available in GMP-grade

* NEB can offer large-scale preparations of restriction enzymes using Recombinant Albumin (BSA-free)

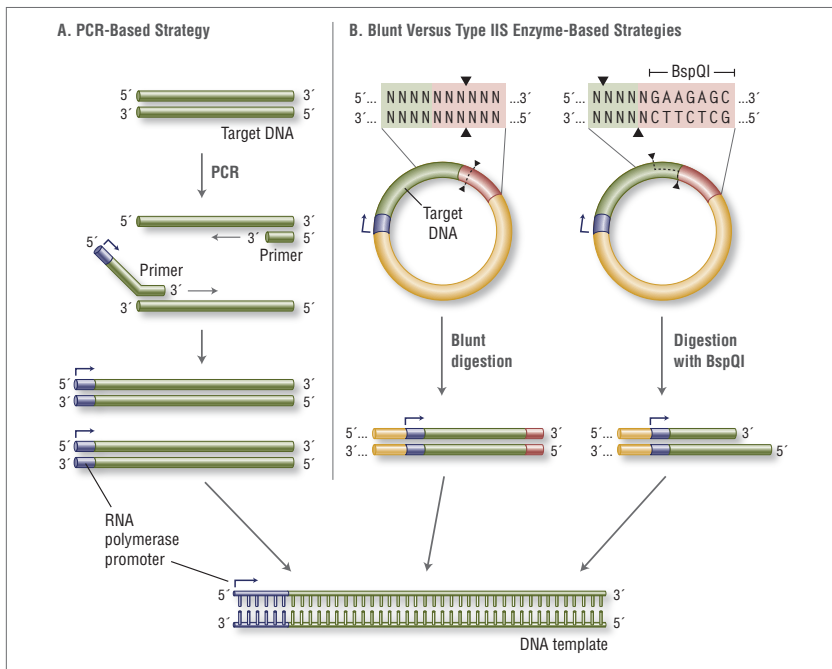
模板生成

高效的体外转录需要高质量的模板。模板质量不但影响体外转录的效率,还决定了合成 RNA 的完整性。合成产量也很大程度上取决于模板纯度。任何纯化方法都是可以的,只要纯化产物中没有 RNase、蛋白和盐的污染。

无论您的模板是线性质粒还是 PCR 扩增的 DNA, NEB 均可提供生成高质量模板的试剂,以使 RNA 合成产量最大化。

- 选择可靠的高保真 DNA 聚合酶进行扩增以确保模板准确,例如 Q5 超保真 DNA 聚合酶(NEB #M0491)。选择热启动酶以减少非特异扩增,例如 Q5 热启动超保真 DNA 聚合酶(NEB #M0493)。在 PCR 产物用于转录模板之前,应先进行纯化,并测量产物浓度及片段长度。
- 使用质粒 DNA 时,重要的是选用适当的限制性内切酶完全线性化含插入序列的 DNA,例如:SapI(NEB #R0569)或 BspQI(NEB #R0712)。如下图所示,使用 IIS 型内切酶可生成无痕模板。这样可以确保合成反应产生预设长度的 RNA 转录本,并有助于避免“模板转换”产物。NEB 可提供众多此类限制性内切酶。
- 如果您需要在模板中引入突变,推荐使用 Q5® 定点突变试剂盒(NEB #E0554),该产品可在 2 小时内完成双链质粒 DNA 的快速定点突变。

图 1: 转录模板生成



(A) PCR 可用于在转录前扩增目标 DNA。可以通过上游引物引入聚合酶启动子。选择高保真聚合酶进行扩增可确保模板准确无误。

(B) 当使用质粒 DNA 作为模板时,需先线性化质粒,选用产生平末端或 5' 粘末端的酶。使用 IIS 型限制性内切酶(例如: BspQI),合成的 RNA 不含限制位点序列。

推荐产品

NEB 限制性内切酶

- 登陆 NEBRestrictionEnzymes.com 获取完整列表

Q5 和 Q5 热启动超保真 DNA 聚合酶 (NEB #M0491 & #M0493)

- 保真度为 *Taq* DNA 聚合酶的 280 倍
- 特异性高、产量高,几乎无需优化
- 性能出色,适用于各种扩增子(从高 AT 到高 GC)
- 热启动酶可用于室温建立体系并减少非特异性扩增

Monarch PCR & DNA 纯化试剂盒 (5 µg) (NEB #T1130)

- 简单快速,纯化时间短至 5 min
- 高纯度,洗脱体积低至 6 µl

Q5 定点突变试剂盒 (NEB #E0554)

- 2 小时内即可快速完成双链质粒的定点突变

工具和资源

登陆 NEBPCRPolymerases.com & NEBRestrictionEnzymes.com 查看:

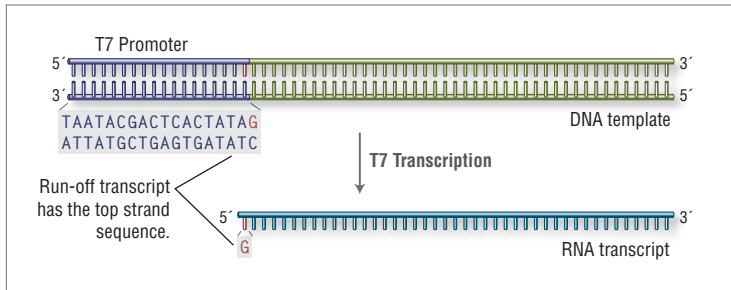
- 常见问题解答和实验指南
- 在线工具可进行实验设计
- 建立 PCR 反应或酶切反应的在线教程



体外转录

体外合成 RNA 需要：DNA 模板、酶、核苷酸和缓冲液组分。稳定的高产反应体系需要优化每个组分。NEB 提供了五种体外 RNA 合成试剂盒，所有试剂盒均经过严格配制，用于稳定合成高质量的 RNA。

图 2: T7 转录

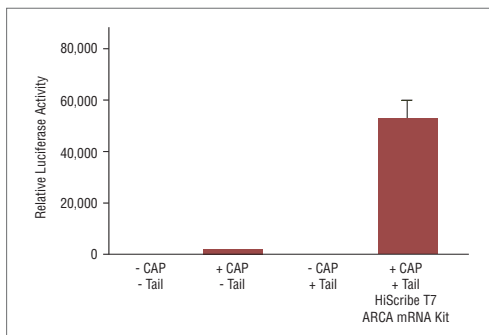


转录模板包含一个 T7 启动子序列，后面是目标序列。T7 启动子是转录所必需的。转录产物的序列与双链 DNA 上面的链相同，并从 T7 启动子 G 碱基开始转录。

大多数真核 mRNA 在 5' 端需要 7-甲基鸟苷(m⁷G)帽结构，在 3' 端需要 poly(A) 尾才能有效翻译。HiScribe™ T7 mRNA 合成试剂盒(含 CleanCap® Reagent AG) (NEB #E2080) 可合成含天然 Cap-1 结构的 mRNA，合成产量高，适用于多种下游应用。可以使用含编码 poly(A) 片段的 DNA 模板共转录，或使用 *E. coli* Poly(A) 聚合酶(NEB #M0276) 酶促加尾。此外，HiScribe T7 ARCA mRNA 试剂盒(带尾) (NEB #E2060) 使用抗逆转录(ARCA)和 T7 RNA 聚合酶共转录合成含 Cap-0 结构的 mRNA。然后通过 *E. coli* Poly(A) 聚合酶添加 poly(A) 尾。该试剂盒还有不含 *E. coli* Poly(A) 聚合酶的版本(NEB #E2065)。上述试剂盒均包含 DNase I 和 LiCl，用于去除 DNA 模板和快速纯化 mRNA。

HiScribe™ T7 高效 RNA 合成试剂盒(NEB #E2040)能够稳定合成不同长度的 RNA (图 4)。实验方案灵活，即使在非理想条件下也能达到稳定的效果，例如：在起始模板量低的情况下，可通过延长反应时间增加产量(图 6)。操作说明中还描述了在转录过程中如何部分或完全替代修饰或标记的核苷酸，以及加入 RNA 5' 端帽类似物。

图 3: 在细胞培养中，mRNA 行使翻译功能需要加帽和加尾

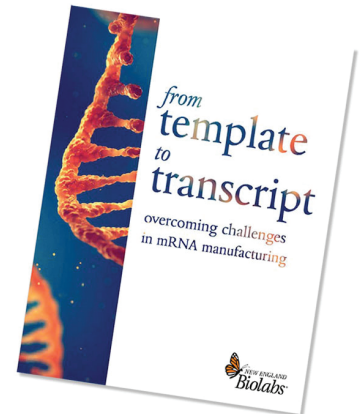


在 U2OS 细胞中表达萤光素酶。将纯化的 *Cypridina* 萤光素酶 (*Cluc*) RNA (如图示方法转录) 与纯化的 *Gaussia* 萤光素酶 (*Gluc*) mRNA 共转染到 U2OS 细胞中。mRNA 由 HiScribe T7 ARCA mRNA 试剂盒(带尾) 合成并加帽加尾。37°C 孵育 16 小时后，分析每个孔中细胞培养上清液的 *Cluc* 和 *Gluc* 活性。通过记录荧光值计算萤光素酶的相对活性。

推荐产品

HiScribe™ T7 mRNA 合成试剂盒 (含 CleanCap® Reagent AG) (NEB #E2080)

- 可一步完成共转录加帽流程
- 使用 CleanCap Reagent AG 三核苷酸帽技术可获得带有天然的 Cap-1 结构的 mRNA，极大地提高了翻译效率，减少了自身免疫反应
- 加帽效率高
- 经优化可获得更高产量
- 适用于全部/部分修饰 NTPs 替换



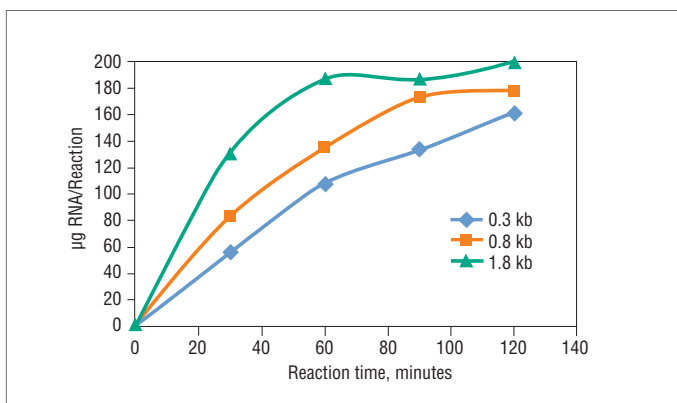
下载最新电子书: mRNA eBook, 从容应对 mRNA 制造和规模化生产的挑战



HiScribe T7 快速高效 RNA 合成试剂盒 (NEB #E2050) 为预混液形式, 可快速建立反应。只需要将两种预混液加入到模板和水中, 从而减少加样错误。试剂盒中的 DNase I 和氯化锂可用于 DNA 模板的去除和快速纯化 RNA。此外, 我们的 Monarch RNA 纯化试剂盒也可用于快速纯化转录本 (请参见第 11 页)。

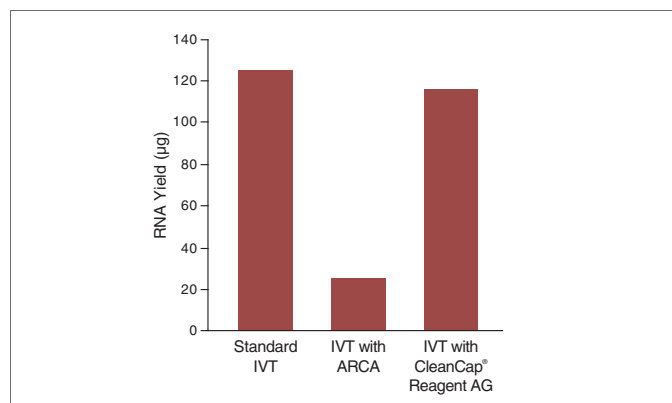
HiScribe SP6 RNA 合成试剂盒 (NEB #E2070) 使用 SP6 RNA 聚合酶进行 RNA 体外转录。该试剂盒用于合成高产量 RNA 转录本, 并可添加帽类似物 (试剂盒中不包含) 或修饰碱基 (试剂盒中不包含), 用于获得加帽、生物素标记或染料标记的 RNA。该试剂盒还能合成高比活的放射物标记 RNA, 可作为探针或靶标。

图 4: HiScribe T7 高效 RNA 合成试剂盒对于不同长度的模板均展现出强大的合成能力



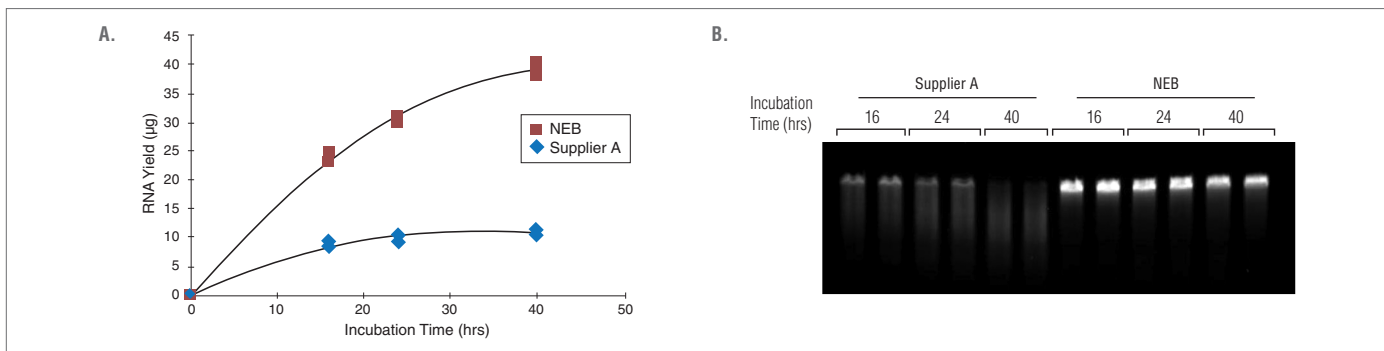
使用 HiScribe T7 高效 RNA 合成试剂盒以三种不同长度的 DNA 为模板合成 RNA, 合成产量的时间进程如图所示。根据使用说明建立反应体系, 并在 37°C 下孵育。转录产物用柱纯化, 并通过 NanoDrop™ 分光光度计定量, 计算合成产量。

图 5: 比较不同体外转录试剂 (无帽结构类似物、ARCA 抗逆转录帽或 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 (4mM: 1mM)。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 6: 对于低模板量, HiScribe T7 高效 RNA 合成试剂盒可通过延长的转录时间提高 RNA 的产量和完整性



根据各产品说明书建立反应体系 (设置两个重复), 使用 3 ng 的 dsDNA 为模板合成 1.8 kb 的 RNA, 37°C 孵育 16、24 和 40 小时。在每个时间点, 将相应的实验管转移至 -20°C 终止反应。

(A) 转录产量—柱纯化后, 使用 NanoDrop 分光光度计测量 RNA 浓度, 并计算总 RNA 产量。结果显示: HiScribe T7 高效 RNA 合成试剂盒的 RNA 产量显著高于竞争品牌试剂盒。

(B) 转录产物完整性—将 150 ng 柱纯化的 RNA 进行 1.2% 变性琼脂糖凝胶电泳, 使用溴化乙锭染色, 并在紫外光下观察。结果显示: 延长反应时间后, HiScribe T7 高效 RNA 合成试剂盒的转录产物完整性显著高于竞争品牌试剂盒。

体外转录(续)

HiScribe RNA 合成试剂盒应用选择表

HiScribe 高效 RNA 合成试剂盒是众多下游应用的理想选择。

根据下表选择适合您的应用的试剂盒。

应用	T7 试剂盒					SP6 试剂盒	
	HiScribe T7 高效 RNA 合成试剂盒 (#E2040)	HiScribe T7 快速高效 RNA 合成试剂盒 (#E2050)	HiScribe T7 ARCA mRNA 试剂盒 (#E2065)	HiScribe T7 ARCA mRNA 试剂盒 (加尾) (#E2060)	HiScribe™ T7 mRNA 合成试剂盒 (含 CleanCap® Reagent AG) (#E2080)	HiScribe SP6 RNA 合成试剂盒 (#E2070)	
探针标记	荧光标记: FAM、花青染料 (Cy) 等 • 荧光原位杂交 (FISH)	✓	✓			✓	
	非荧光标记: 生物素、地高辛 • 原位杂交 • 二次检测点杂交 • 微阵列	✓	✓			✓	
	高比活性放射性同位素标记 • 杂交分析 • RNase 保护	✓				✓	
mRNA 和 RNA 转染	用 ARCA 共转录加帽和酶法加 poly (A) 尾的 mRNA 合成 • 转染 • 显微注射 • 体外翻译				✓		
	简化的 ARCA 带帽 RNA 合成 • 模板编码 Ploy (A) 尾 • 非多腺苷酰化转染 • 转染 • 显微注射 • 体外翻译			✓			
	用帽结构类似物共转录加帽 • 转染 • 微注射 • 体外翻译		✓			✓	
	用 CleanCap Reagent AG 共转录加帽 • 转染 • 显微注射 • 体外翻译					✓	
	使用牛痘加帽酶或 FCE 加帽酶进行转录后加帽 • 转染 • 微注射 • 体外翻译	✓	✓			✓	
	完全替代 NTPs: 5-mC、假尿苷等	✓				✓	✓
	部分替代 NTP: 5-mC、假尿苷等	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	未修饰的 RNA		✓				✓
	发夹结构、短 RNA、dsRNA • 基因敲除	✓	✓				✓
结构、功能与结合研究	全部替代 NTP • 核酸适配体选择 • 同位素标记	✓				✓	
	部分替代一种或多种 NTP • 核酸适配体选择 • 结构测定	✓	✓			✓	
	未修饰的 RNA • SELEX • 结构测定	✓	✓			✓	

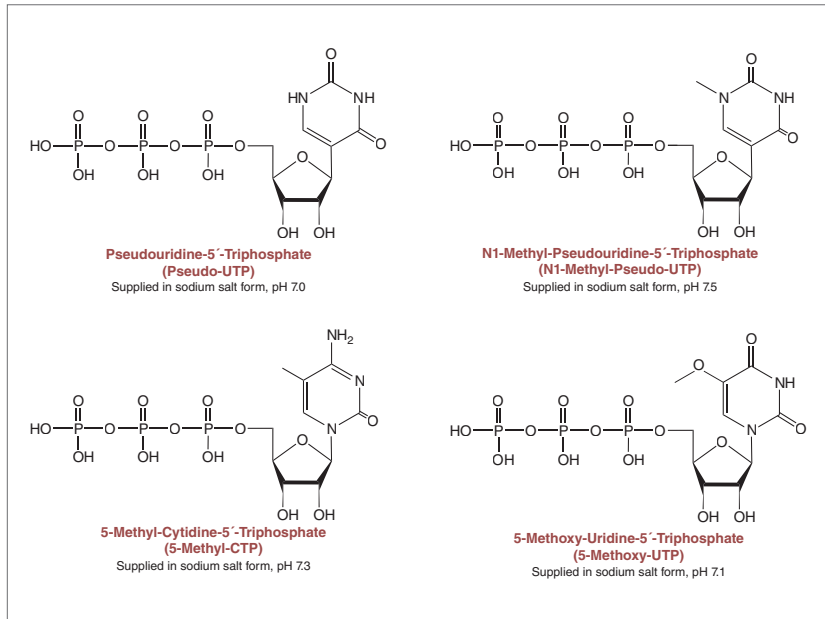
mRNA 修饰: 修饰碱基

mRNA 已成为一种高效的治疗手段。通过引入化学修饰的核糖核苷酸, 可以提高 mRNA 的稳定性、降低免疫原性并增强其翻译能力, 从而提升 mRNA 的应用价值。

NEB 提供四种关键修饰核苷酸, 助力您的 RNA 研究工作:

- 检测无 RNase、DNase、磷酸酶或蛋白酶污染活性。
- HPLC 测定纯度≥95%
- 活性和稳定性长达 24 个月。
- 与 HiScribe RNA 合成试剂盒完全兼容。

图 7. 修饰核苷酸



推荐产品

N1-甲基假尿苷-5'-三磷酸 (N1-Methyl-Pseudo-UTP) (NEB #N0431)

5-甲基胞苷-5'-三磷酸 (5-Methyl-CTP) (NEB #N0432)

假尿苷-5'-三磷酸 (Pseudo-UTP) (NEB #N0433)

5-甲氧基尿苷-5'-三磷酸 (5-Methoxy-UTP) (NEB #N0434)

- NTPs 提供 rNTP 套装 (NEB #N0450) 和 rNTP 混合液 (NEB #N0466) 剂型

应用方案



Scan here to download our technical note

如何实现 RNA 合成规模化放大?

请访问 NEB 应用方案网页 www.neb.com/application-notes, 下载 RNA 应用方案:

“Scaling of High-Yield In vitro Transcription Reactions for Linear Increase of RNA Production”

该文章详细介绍了如何通过体外转录 (IVT) 反应实现高质量 RNA 产物的产量线性放大, 满足从实验室到商业规模的 RNA 生产需求。



mRNA 的修饰:加帽

在基因功能研究中需要合成有活性 mRNA,加帽和加尾至关重要;这些修饰可有效防止降解并促进其在真核细胞中的的翻译。

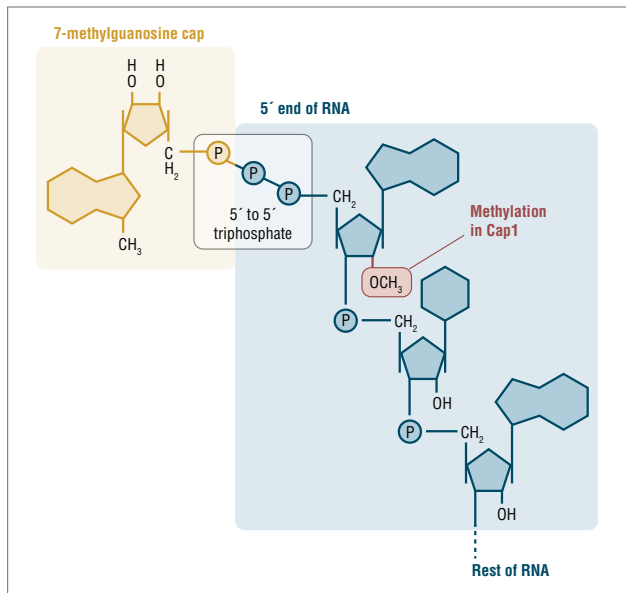
RNA 加帽

大多数真核细胞 mRNA 通过 5'→5' 三磷酸键,在其 5' 端第一个核苷酸上添加 7-甲基鸟苷(m⁷G)进行修饰。mRNA 帽结构是促进核糖体靶定到 mRNA 进行翻译的关键因子。

有两种方式可将帽结构添加到转录产物中:

- 转录完成后,通过加帽酶、GTP 和 S-腺苷甲硫氨酸(SAM)进行加帽
- 转录过程中加入帽结构类似物

图 8:5' 帽结构



mRNA 5' 帽结构的示意图,黄色表示 7-甲基鸟苷,蓝色表示 mRNA 的 5' 末端。红色表示 Cap 1 结构中的 2'-O-甲基。

转录后酶学法 mRNA 加帽

Faustovirus 病毒加帽酶(FCE) (NEB #M2081)可实现超高效率的 mRNA 加帽。该系统含三种酶活性(RNA 三磷酸酶,鸟嘌呤转移酶,鸟嘌呤甲基转移酶);均为加入完整 Cap-0 结构 m⁷Gppp5' N 所必需。在加帽酶、反应缓冲液、GTP 和甲基供体 SAM 的作用下,不到一小时即可完成体外转录产物的加帽。所有帽结构均以正确的方向添加,诣被翻译机制识别。这与共转录法添加帽类似物不同(2)。

推荐产品

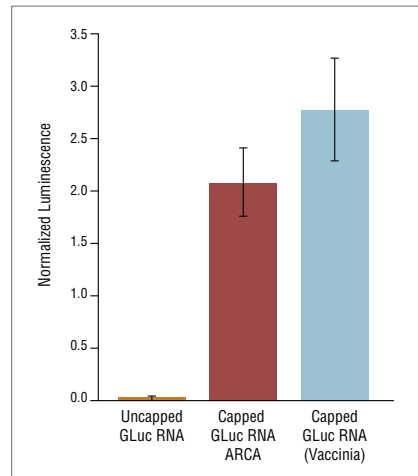
Faustovirus 病毒加帽酶 (FCE) (NEB #M2081)

- 有效提高加帽效率,适用于困难加帽底物
- 使用更少的酶即可高效加帽
- 反应温度范围更宽,更灵活

mRNA 帽结构 2'-O-甲基转移酶 (NEB #M0366)

- 提高 RNA 的翻译
- 改善 mRNA 的体内表达

图 9:Gluc 的表达



将纯化的加帽 Cap-0 和未加帽的 GLuc mRNA 转染到 HeLa 细胞中,37°C 孵育过夜 (16 小时)。测定每个孔中细胞培养上清液的 Gluc 和 Cluc 活性和荧光值。用 Cluc 荧光值作为背景校对 GLuc RNA 的荧光。

优势

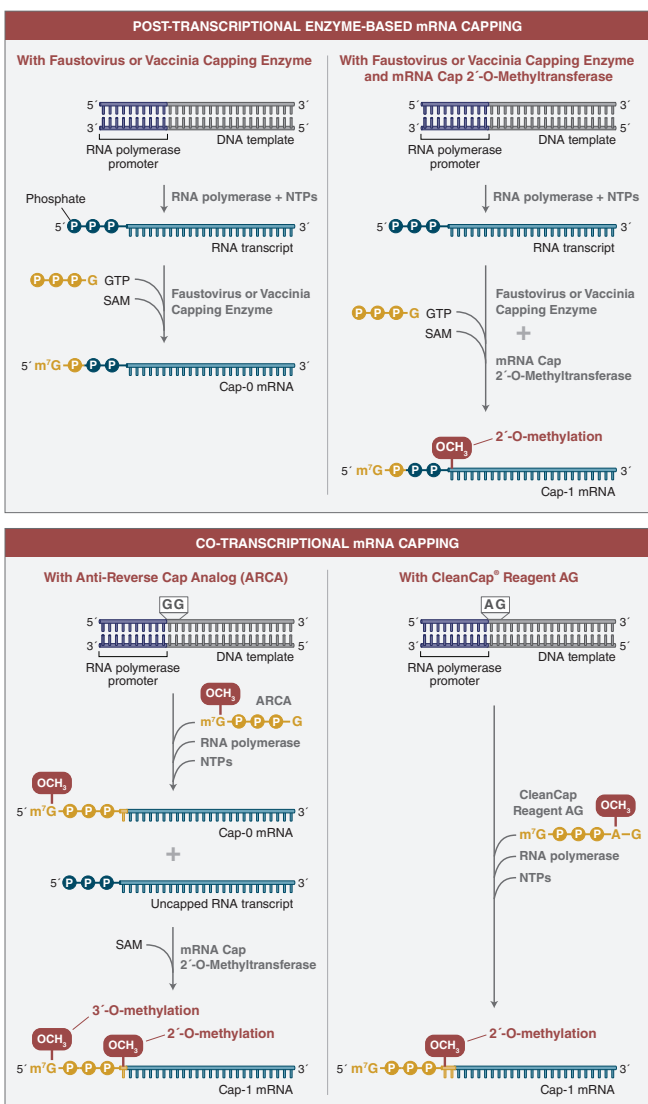
- 天然帽结构
- 使用 2'-O-甲基转移酶可在同一反应中将 Cap-0 转化为 Cap-1

使用双核酸帽结构类似物共转录加帽

抗逆转帽 (ARCA) [抗-反帽结构类似物 3'-O-Me-m⁷G(5')ppp(5')G (NEB #S1411)] 是用于共转录加帽的常用帽结构类似物。由于 ARCA 进行共转录时为定向整合, N7-甲基鸟苷位于 [m⁷G(5')pppG-RNA] 末端 (3, 4), 因此能够产生 100% 可翻译的带帽转录本。

而标准帽结构类似物 [标准帽结构类似物 m⁷G(5')ppp(5')G (NEB #S1404)] 能够以两种方向整合 [m⁷G(5')pppG-RNA] 或 [G(5')pppm⁷G-RNA], 产生转录本为混合物 (3, 5)。如果帽结构类似物以错误的方向掺入 mRNA 则无法有效翻译, 从而导致目标蛋白产量低 (2)。如果 RNA 产物为 5'-加帽和 5'-三磷酸的混合转录产物, 则需要将其进行纯化或使用磷酸酶处理, 以避免 5'-三磷酸 RNA 产生的免疫原性。

图 10: mRNA 合成流程图



推荐产品

HiScribe™ T7 mRNA 成试剂盒 (含 CleanCap® Reagent AG) (NEB #E2080)

- 可一步完成共转录加帽流程
- 使用 CleanCap Reagent AG 三核苷酸帽技术可获得带有天然的 Cap-1 结构的 mRNA, 极大的提高了翻译效率, 减少了自身免疫反应
- 加帽效率高
- 经优化可获得更高产量
- 适用于全部/部分修饰 NTPs 替换

HiScribe T7 ARCA mRNA 试剂盒 (加尾-NEB #E2060) (不加尾-NEB #E2065)

- 实验流程更快捷, 从加帽到纯化完成仅需 2 小时
- 可以掺入修饰碱基
- 使用定向整合的 ARCA 加帽效率高
- 全套试剂盒提供的试剂是其它品牌试剂盒的两倍

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。

mRNA 的修饰:加帽(续)

Cap-1 修饰

已有研究表明 Cap-1 结构能够增强 mRNA 的翻译效率(6),从而提高 mRNA 在转染和显微注射实验中的表达。

通过体外酶促反应可将 Cap-0 转录本转化为 Cap-1。mRNA 帽结构 2'-O-甲基转移酶(NEB #M0366)可在 RNA 5' 末端紧邻帽结构的第一个核苷酸的 2'-O 处添加一个甲基基团。该酶利用 S-腺苷甲硫氨酸(SAM)作为甲基供体,使加帽的 RNA(Cap-0)甲基化,获得 Cap-1 结构。

此外,还可以使用三核苷酸帽结构类似物(例如:CleanCap Reagent AG)共转录合成 Cap-1 mRNA。与传统的二核苷酸帽结构类似物相比,使用 CleanCap Reagent AG 共转录加帽更具优势。CleanCap Reagent AG 是一种三核苷酸,其中 5'-m⁷G 通过 5'-5' 三磷酸连接与 AG 序列相连。腺嘌呤的 2'-O 位上含有一个甲基。这种三核苷酸掺入转录起始位点,即可产生 Cap-1 结构。

图 11: CleanCap Reagent AG 分子结构

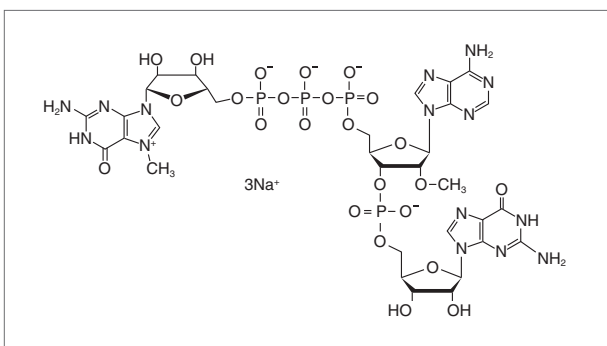
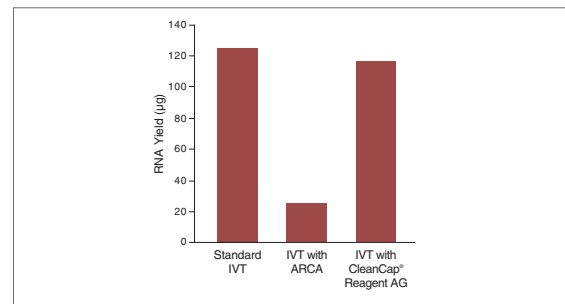


图 12: 比较不同体外转录试剂(无帽结构类似物、ARCA 抗逆转帽或 CleanCap Reagent AG)的 RNA 产量



RNA 帽结构选择表

大多数真核 mRNA 的 5' 末端存在 m⁷G 帽结构,可在起始水平上促进体外翻译。对于大多数 RNA,帽结构可增加稳定性,降低对核酸外切酶的敏感性,促进形成 mRNA 翻译起始复合物。在真核无细胞蛋白表达系统中,某些具有 5' 帽结构的原核 mRNA 的翻译效率与真核 mRNA 一样。有研究表明某些真核 RNA 底物的剪接也需要帽结构。

产品名称	应用
HiScribe™ T7 mRNA 成试剂盒(含 CleanCap® Reagent AG) * *仅提供试剂盒	<ul style="list-style-type: none"> • 高产量 • 天然 Cap-1 帽结构 • 合成 100% 可翻译的转录产物 • 加帽效率极高
抗逆转帽(ARCA)	<ul style="list-style-type: none"> • 产生 100% 可翻译的加帽转录产物 • 与以下聚合酶共转录加帽: T7 (NEB #M0251)、Hi-T7 (NEB #M0658)、SP6 (NEB #M0207) 和 T3 RNA 聚合酶 (NEB #M0378) • 为体外剪接实验合成含 m⁷G 帽结构的 RNA • 为转染或显微注射合成含 m⁷G 帽结构的 RNA
标准帽 m⁷G(5')ppp(5')G	<ul style="list-style-type: none"> • 与以下聚合酶共转录加帽: T7、Hi-T7、SP6 和 T3 RNA 聚合酶 • 为体外剪接分析合成含 m⁷G 帽结构的 RNA • 为转染或显微注射合成含 m⁷G 帽结构的 RNA

产品名称	应用
未甲基帽 G(5')ppp(5')G	<ul style="list-style-type: none"> • 与以下聚合酶共转录加帽: T7、Hi-T7、SP6 和 T3 RNA 聚合酶 • 合成含未甲基化 G 帽结构的 RNA
标准帽 m⁷G(5')ppp(5')A	<ul style="list-style-type: none"> • 使用 T7 RNA 聚合酶从 phi2.5 启动子共转录加帽,启动子在转录起始点包含一个 A • 为体外剪接分析合成含 m⁷G 帽结构的 RNA • 为转染或显微注射合成含 m⁷G 帽结构的 RNA
未甲基帽 G(5')ppp(5')A	<ul style="list-style-type: none"> • 使用 T7 RNA 聚合酶从 phi2.5 启动子共转录加帽,启动子在转录起始点包含一个 A • 合成含未甲基化 G 帽结构的 RNA • 合成含 A 帽结构的 RNA

mRNA 的修饰:加尾

Poly(A)加尾

体外转录的 RNA 转染后, Poly(A)加尾是提高其稳定性和翻译效率的另一个关键步骤。在体内环境中, poly(A)尾将 poly(A)结合蛋白聚集到 mRNA 上, 通过抑制核酸外切酶提高 mRNA 的稳定性。此外, poly(A)结合蛋白与细胞翻译机制的相互作用是决定翻译效率的重要因素。

通过以下两种方式获得带有 3'-poly(A)尾的体外转录本

- 转录后酶促加尾
- 在转录模板中编码 poly(A)尾

Poly(A)尾可在转录完成后, 使用 Poly(A)聚合酶(NEB #M0276)和 ATP 进行添加。这种情况下, Poly(A)尾的添加是不需要模板的。

Poly(A)尾可以编码在质粒转录模板中。但建议设计模板时需谨慎, 确保质粒酶切线性化后的模板所编码的 poly(A)尾不含其它碱基。建议将 BspQI(NEB #R0712)位点设计在 poly(A)下游的紧邻位置, 以达到这一目的。

此外, poly(A)尾还可以通过 PCR 的方法添加到转录模板上。这种方法需使用 5' 端含有 poly(dT)(例如: dT120)的反向引物(7)。

推荐产品

Poly(A)聚合酶(NEB #M0276)

- 增强转染到真核细胞中的 RNA 的翻译

HiScribe T7 ARCA mRNA 试剂盒(带尾)(NEB#E2060)

- 包含 Poly(A)聚合酶,用于酶促加尾

HiScribe™ T7 mRNA 合成试剂盒(含 CleanCap® Reagent AG)(NEB# E2080)

- 用于编码有 poly(A)尾的模板

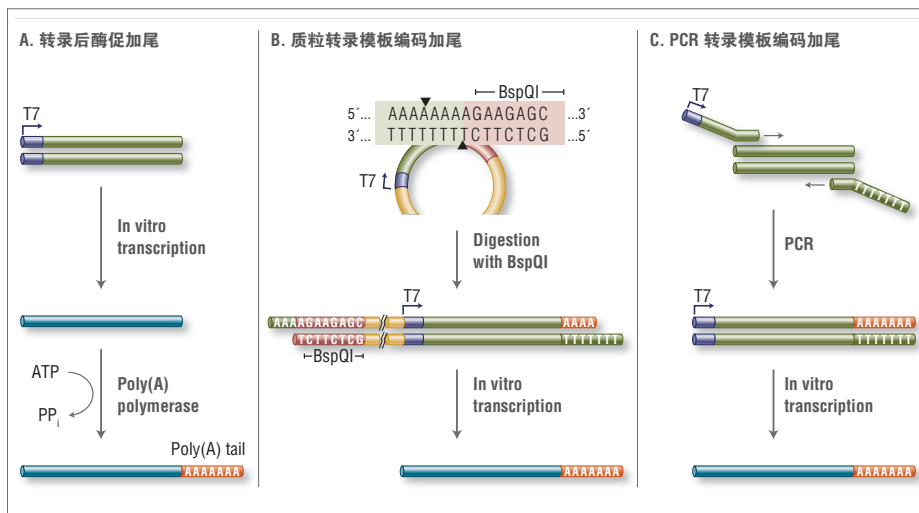
优势

- 模板编码有 poly(A)尾时, 无需其它步骤
- 使用 *E. coli* Poly(A)聚合酶进行酶促加尾时, 模板无需 poly(A)编码

不足

- 模板编码有 poly(A)尾时, 构建模板较为复杂
- 使用 *E. coli* Poly(A)聚合酶进行酶促加尾时, 需要额外步骤, A尾长度不一致

图 13:加尾步骤



通过上述几种方法完成加尾: (A) 转录后酶促加尾; (B) 用 BspQI 将模板线性化后进行转录; (C) 通过 PCR 将尾添加到模板中。

mRNA 修饰: 模板去除

IVT 后去除模板 DNA 可极大简化下游处理。酶切消化操作简单, 是去除模板模板 DNA 的首选方法。NEB 提供 DNase I (无 RNase) (NEB #M0303) 和 DNase I-XT (耐盐) (NEB #M0570), 二者可高效消化 IVT 后的模板 DNA。DNase I (无 RNase) 在盐浓度在 >50 mM 时活性受抑制, NEB 科学家经过基因工程改造, 开发的 DNase I-XT (耐盐) 在 50-100 mM 盐浓度下仍保持最佳活性, 并在 200 mM 和 300 mM 盐浓度下分别保留 65% 和约 40% 的活性。这种高耐盐特性无需调整缓冲液即可进行消化, 进一步简化操作流程。经过 DNase I 消化后, IVT 反应液可以进入下游处理步骤, 去除 IVT 试剂、酶和 DNase I, 以纯化合成 mRNA。NEB 的 Monarch RNA 纯化试剂盒 (NEB #T2030, T2040, T2050) 采用便捷的离心柱形式, 适用于快速纯化 10-500 µg IVT RNA。

推荐产品

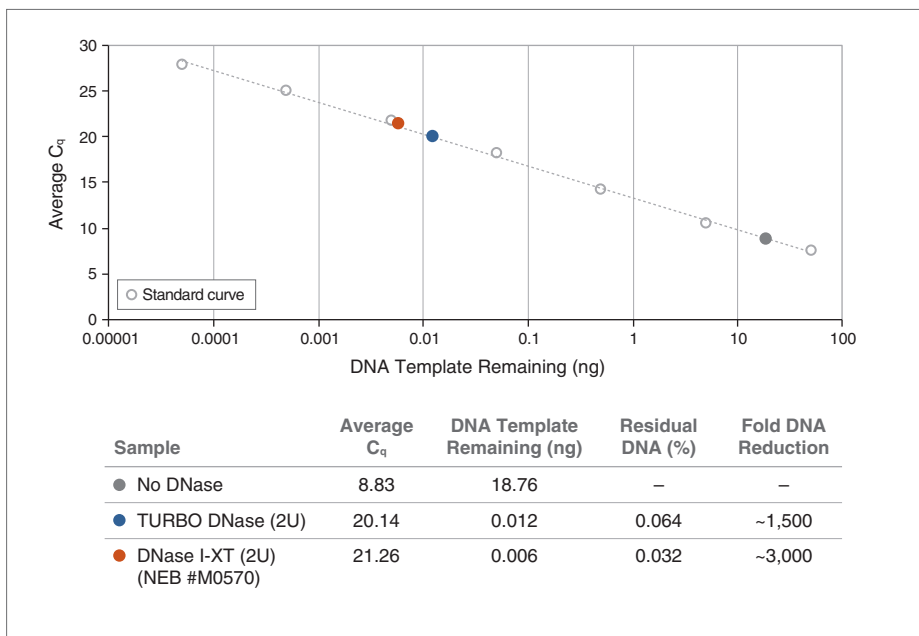
DNase I-XT (耐盐) (NEB #M0570)

- 降解体外转录反应中的 DNA 模板

DNase I (无 RNase) (NEB #M0303)

- 从 RNA 样品中去除基因组 DNA 的首选产品

图 14. DNase I-XT (耐盐) (#M0570) 能够更完全的去除 IVT 反应和 RNA 中的 DNA



20 µl 体外转录产物用以下三种方法检测去除残留 DNA 的效果: 1) 无 DNase I; 2) 2 U TURBO® DNase 或 3) 2 U DNase I-XT (耐盐), 37°C 条件下孵育 15 分钟。分别使用 Monarch RNA 纯化试剂盒 (500 µg) (NEB #T2050) 纯化, 以无核酸酶水 (50 µl) 洗脱。使用 Luna 通用探针法 qPCR 预混液 (NEB #M3004) 通过 qPCR 检测 DNA 残留水平。将每个样品的平均 C_q 值与标准曲线 (灰色) 进行比较, 以评估可 PCR-扩增 DNA 的百分比。TURBO DNase 和 DNase I-XT (耐盐) 的使用都不需要对 IVT 反应产物进行稀释, 但是, DNase I-XT (耐盐) 对 IVT 反应中的 DNA 模板去除更彻底, 难以通过 qPCR 检测到。

mRNA 修饰: RNA 分析

串联液相色谱-质谱联用(LC-MS)是少数可以直接检测的方法之一,它可以提供可重复且准确的鉴定,以及RNA的定性和定量分析。LC-MS可以直接分析mRNA,无需扩增或转化为DNA(8)。基于序列的检测方法难以分析修饰(如:N1-甲基假尿苷、5'加帽和3' poly(A)尾),这种情况下可以使用LC-MS分析进行检测,并且在某些情况下可以定量(9)。

对于总核苷酸含量的分析,核苷酸消化混合物(NEB #M0649)将RNA分子降解为核苷酸,从而可以准确鉴定和定量RNA修饰。

图 15. RNase 4 在U/A 和 U/G位置切割

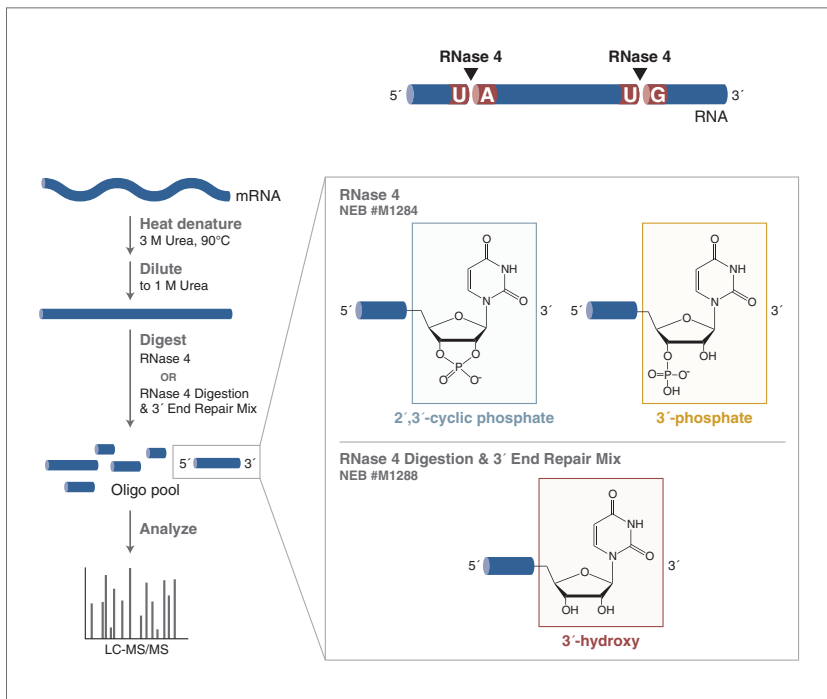
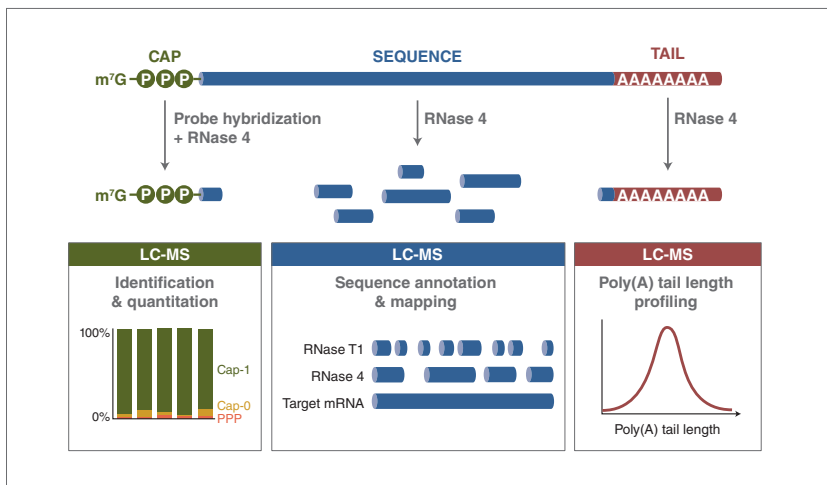


图 16. 使用 RNase 4 产品可基于 LC-MS/MS 对 mRNA 进行综合分析



推荐产品

RNase 4 酶切和 3' 末端修复预混液 (NEB #M1288)

- RNase 4 酶切和 3' 末端修复预混液是 RNase 4 (酶切位点:U/A 和 U/G) 和 T4 多聚核苷酸激酶 (T4 PNK) 的混合剂型,可将 RNase 4 酶切产物简化成为全部以 3'-羟基尿苷 (U) 结尾的 RNA 寡核苷酸池。

RNase 4 (NEB #M1284)

- RNase 4 是一种单链核糖核酸内切酶,在尿苷-嘌呤 (U/R) 二核苷酸位点切割 RNA。

核酸消化混合物 (NEB #M0649)

- 将 RNA 分子消化成核苷酸,从而可以准确识别和定量 RNA 修饰。

工具和资源

- 对于 mRNA 5'-帽子结构分析,可使用单独的 RNase 4 配合我们 DNA 探针导向 mRNA 5'-帽结构分析的实验方案使用

<https://www.neb.cn/zh-cn/protocols/2024/03/04/rnase-4-neb-m1284-dna-probe-directed-analysis-of-mrna-5-cap-structures>

使用 RNase 4 或 RNase 4 酶切和 3' 末端修复预混液进行酶切的实验流程示例图。RNA 样品在 3 M 尿素 (用户自备) 中, 90°C 加热变性 10 分钟。尿素浓度稀释至 1 M 后, 在 1X NEBuffer™ r1.1 中进行 RNase 4 酶切反应。NEBuffer r1.1 以 10X 原液形式提供。将寡核苷酸混合物通过 LC-MS 直接进行分析。方框展示了使用 RNase 4 (NEB #M1284) 以及 RNase 4 酶切和 3' 末端修复预混液 (NEB #M1288), 分别对 RNA 进行酶切, 所获得的寡核苷酸产物具有不同 3' 末端。

mRNA 加帽检测: 互补的 DNA 探针能够识别 5' mRNA 末端并检测其相对丰度, 同时阻断 RNase 4 切割。使用含有亲和标签的探针可分离切割产物, 用于后续的 LC-MS/MS 分析。仅需通过简单的实验设计, RNase 4 即可产生可预测的、位点特异性的 5' 端产物。

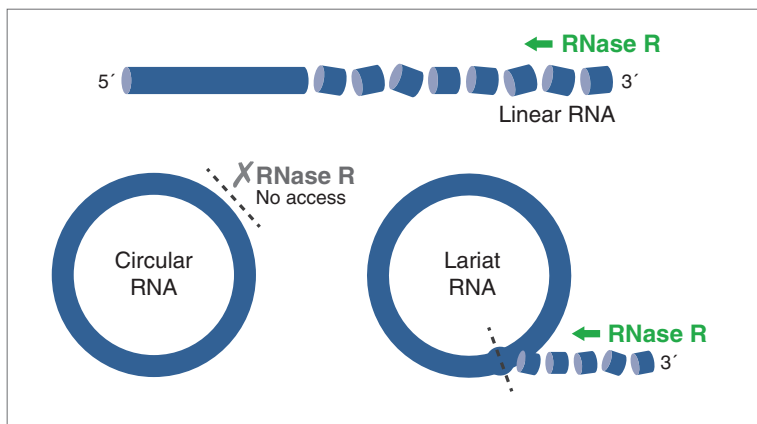
序列分析: 为了验证 mRNA 序列及其修饰状态, 使用 RNase 4 充分消化样品, 产生一系列大小适中的特定寡核苷酸进行 LC-MS/MS 分析。通过将观察到的寡核苷酸与参考序列进行比对, 可以生成覆盖图谱。RNase 4 酶切和 3' 末端修复预混液通过产生具有 3' 羟基末端的 RNA 酶切产物, 简化图谱绘制工作。使用一种或多种 RNases (例如 RNase T1) 进行平行消化实验, 可以提升 mRNA 的整体覆盖度。

尾长度分析: 通过切割和释放 poly(A) 尾并进行长度分析, RNase 4 可用于评估 mRNA 3' 端。

Circular RNA

环状 RNA (circRNA) 作为一种有前景的治疗方式出现, 在需要增强稳定性和蛋白表达的场景表现卓越。环状 RNA 不含 3' poly(A) 尾和 5' 端的帽结构, 因此对外切酶更具抗性。

图 17. RNase R 消化含 3' 末端的线性 RNA



RNase R 能够消化具有可及 3' 末端的线性 RNA, 用于富集环状和套索 RNA。RNase R 用于消化线性 RNA。环状 RNA 是封闭的 RNA 分子, 能够耐受外切酶的消化。套索 RNA 具有环状结构, 其 3' 末端有一个单链 RNA 区域。RNase R 可以消化线性 RNA 的 3' 末端, 但在套索的分支点停止, 从而保留环状 RNA。

推荐产品

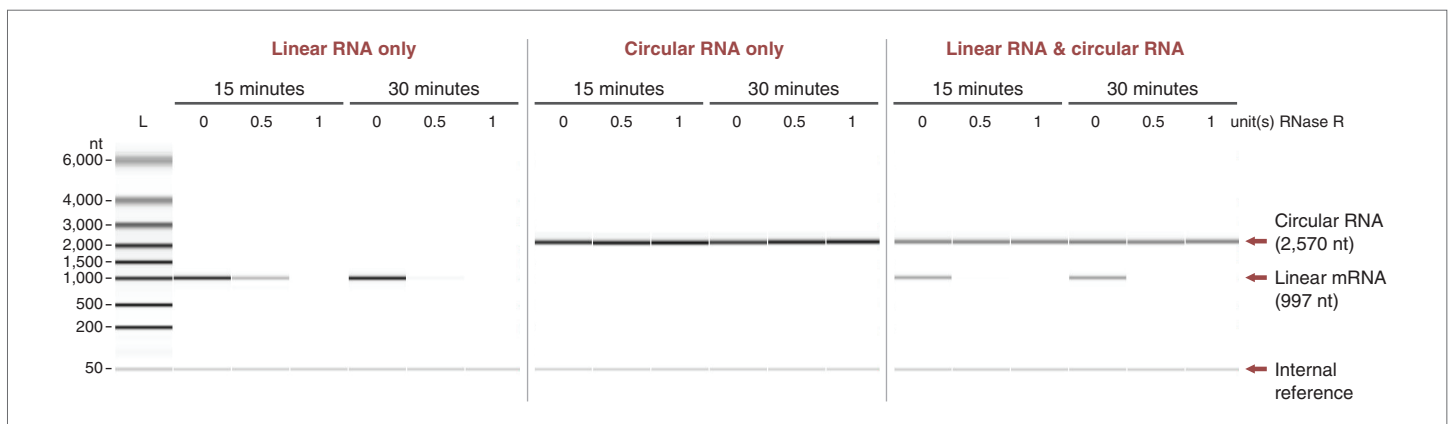
RNase R (NEB #M0100)

- 高过程性 3'→5' 方向核糖核酸外切酶
- 可酶切几乎所有含可及 3' 突出末端的线性 RNA, 包括 rRNA 和 mRNA
- 从总 RNA 制备物中富集环状 RNA 和套索 RNA
- 需要镁离子才能发挥活性
- 通过添加过量 EDTA 可使酶失活

工具和资源

T4 RNA 连接酶 1 (ssRNA 连接酶) (NEB #M0204)

图 18. RNase R 高效降解线性 RNA, 同时保留完整环状 RNA



NEB® RNase R 高效降解线性 RNA, 同时保留完整环状 RNA。在仅含线性 RNA、仅含环状 RNA 或同时含有线性 RNA 和环状 RNA 的 RNA 样本中, 在每微克 RNA 添加 1 单位 NEB RNase R, 结果表明: 消化后, 环状 RNA 得以保留, 线性 RNA 被完全降解。该反应在 37°C 下孵育 15 或 30 分钟, 使用 1X RNase R 反应缓冲液

RNA 合成后纯化

经合成或修饰的 RNA 在下游应用之前,需要进行纯化。RNA 经体外转录合成后,需要先将其中的剩余核苷酸、未合成完的短序列转录本、酶和缓冲液成分去除,才可用于下游实验,包括转染、显微注射或形成 RNP。在进行 RNA 标记、DNase I 处理、蛋白酶 K 处理和 mRNA 加帽后,也需要通过纯化完全去除小分子和酶反应成分。

RNA 可以通过多种方式纯化,包括酚/氯仿抽提和乙醇沉淀、氯化锂沉淀或胶纯化。然而,最常见且最易用的快速 RNA 纯化方法是硅胶柱纯化法。柱纯化法还可以通过使用低洗脱体积来浓缩纯化 RNA。NEB 可提供一系列高性能且使用便捷的 RNA 纯化试剂盒。

Monarch RNA 纯化试剂盒是柱纯化法,为 RNA 的纯化和浓缩提供了快速、便捷的解决方案,可用于体外转录或其它反应后的 RNA。为了方便和灵活的应用,Monarch RNA 纯化试剂盒提供三种不同的结合容积:10 µg、50 µg 和 500 µg,均包含 NEB 特殊设计的纯化柱,可避免缓冲液残留,以确保无污染,还可以避免 RNA 纯化中常见的硅胶颗粒脱落问题。产品中的洗涤缓冲液简化为一种,简单地结合-洗涤-洗脱步骤可以在数分钟内完成。

Monarch® RNA Cleanup Kits 参数

Monarch RNA 纯化产品	NEB #T2030 (10 µg)	NEB #T2040 (50 µg)	NEB #T2050 (500 µg)
结合容积	10 µg	50 µg	500 µg
RNA 片段大小	≥25 nt (调整 protocol 可回收 ≥15 nt 的 RNA)		
典型回收率	70–100%		
洗脱体积	6–20 µl	20–50 µl	50–100 µl
RNA 纯度	$A_{260/280} > 1.8$ 和 $A_{260/230} > 1.8$		
实验时间	离心和孵育时间 5 分钟		离心和孵育时间 10–15 分钟
常见下游应用	RT-PCR, NGS RNA 文库构建, NGS 小 RNA 文库构建, RNA 标记	RT-PCR, NGS RNA 文库构建, 基因编辑核糖核蛋白复合体制备, 显微注射, RNA 标记, 转染	RT-PCR, NGS RNA 文库构建, RNAi, 显微注射, RNA 标记, 转染

推荐产品

Monarch RNA 纯化试剂盒 (10 µg)
(NEB #T2030)

Monarch RNA 纯化试剂盒 (50 µg)
(NEB #T2040)

Monarch RNA 纯化试剂盒 (500 µg)
(NEB #T2050)

优势

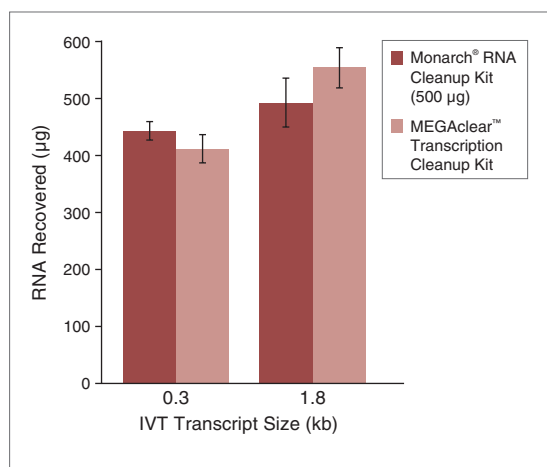
- 三种结合容积的试剂盒可覆盖各种应用
- 产品中的洗涤缓冲液简化为一种, 结合-洗涤-洗脱步骤仅需 5-10 分钟即可完成
- 优化设计的纯化柱可防止缓冲液残留和硅胶颗粒的脱落
- 高产量-回收率可达 70-100%
- 高纯度- $A_{260/280}$ 和 $A_{260/230} \geq 1.8$
- RNA 的结合容积高达 500 µg (NEB #T2050)
- 洗脱低至 6 µl (NEB #T2030)
- 试剂盒中的纯化柱和每种缓冲液均可单独购买 (见 12 页)

工具和资源

登陆 www.neb.com/MonarchRNACleanup 查看以下信息:

- 产品使用和优化方法的视频
- 性能数据
- RNA 纯化问题指南, 见 17 页

图 19: Monarch RNA 纯化试剂盒(500 μg)纯化大量体外转录物的产量与其它品牌一致



使用 HiScribe T7 快速高效 RNA 合成试剂盒 (NEB #E2050) 转录 0.3 kb 和 1.8 kb 的 RNA。经 DNase I 处理后 (4 U DNase I, 37°C, 15 分钟), 将转录产物合并为 200 μl, 分别使用 NEB 的 Monarch RNA 纯化 Kit (500 μg) (深红色) 和 Thermo Fisher Scientific 的 MEGAClear Transcription Clean-Up 试剂盒 (浅红色) 进行纯化。体外转录的 RNA 在纯化柱上孵育 5 分钟后 (Monarch 为室温, MEGAClear 为 65°C), 使用 100 μl 无核酸酶的水洗脱两次。使用 Trinean DropSense[™] 16 测量 A260 值, 计算合成 RNA 的回收量。结果显示: 在对大量体外转录物的纯化实验中, Monarch RNA 纯化试剂盒 (500 μg) (NEB #T2050) 与 MEGAClear 试剂盒产量一致, 且无需高温孵育。

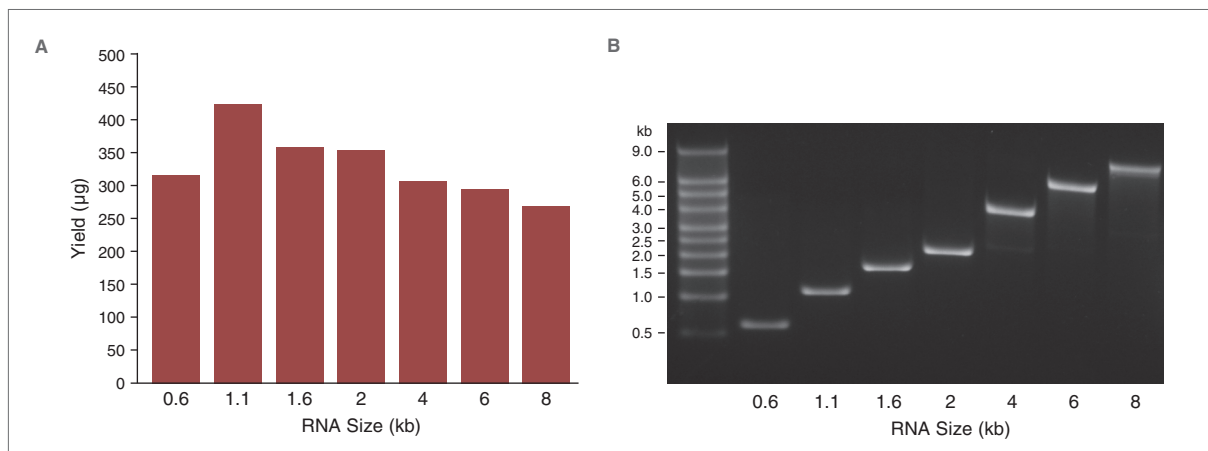
推荐产品

Monarch 离心柱 S1A (10 μg) (NEB #T2037)

Monarch 离心柱 S2A (50 μg) (NEB #T2047)

Monarch 离心柱 S2B (500 μg) (NEB #T2057)

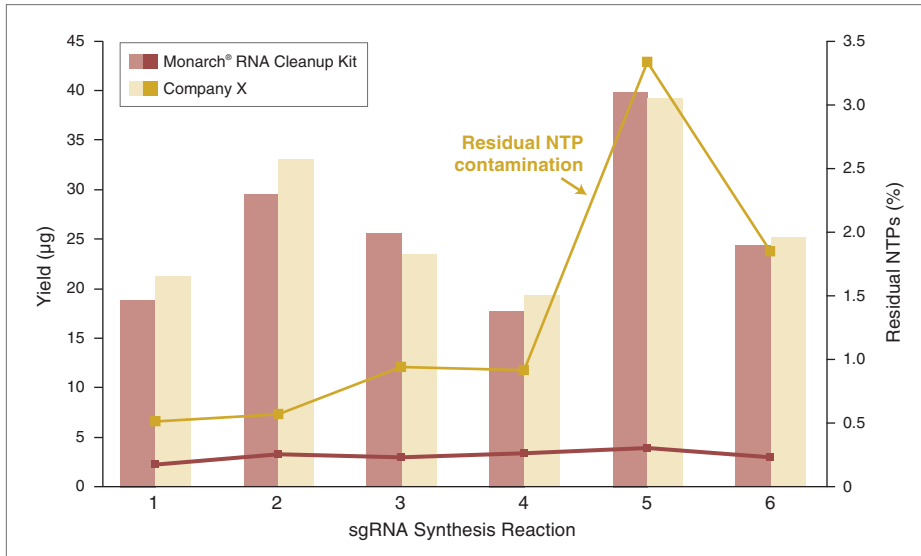
图 20: Monarch RNA 纯化试剂盒(500 μg)适用于纯化体外转录物的大量 RNA (>250 μg)



A. 使用 HiScribe[™] T7 快速高效 RNA 合成试剂盒 (NEB #E2050) 合成不同长度 (0.6-8 kb) 的 RNA 转录本。使用 Monarch RNA 纯化试剂盒 (500 μg) (NEB #T2050) 对每 40 μl 体外转录 (IVT) 产物进行纯化。使用 Nanodrop 分光光度计测量 A260 计算出 RNA 的产量, 每个 IVT 反应的 RNA 产量范围为 268-425 μg。

B. 使用 SYBR[®] Gold 染色的 1% 琼脂糖 TBE 凝胶评估 RNA 完整性 (200ng/lane)

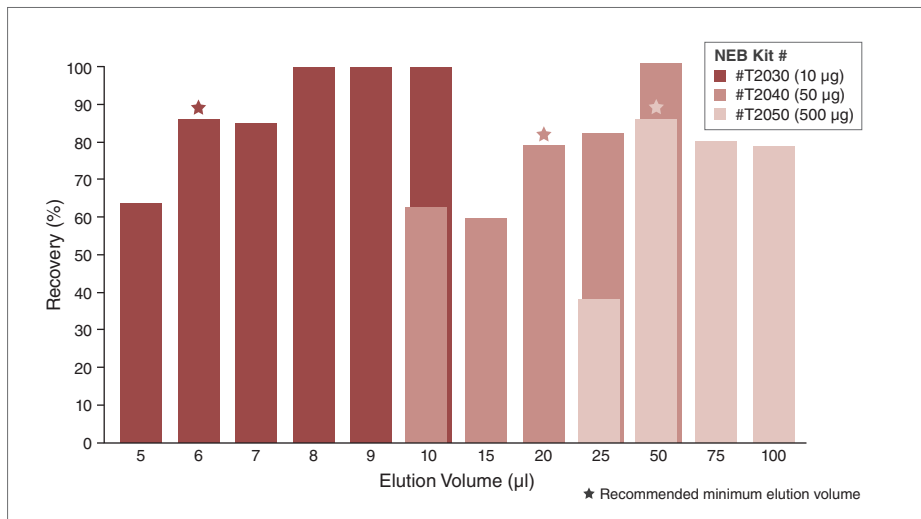
图 21: Monarch RNA 纯化试剂盒(50 µg)与竞争品牌 RNA 纯化试剂盒相比, sgRNA 产量相当, NTP 残留更低



使用 EnGen sgRNA 合成试剂盒, *S.pyogenes* (NEB #E3322) 进行 6 个不停的 sgRNA 合成反应后, 使用 Monarch RNA 纯化试剂盒 (50 µg, NEB #T2040) 和竞争试剂盒 (遵照厂商说明书) 进行纯化, 并用 50 µl 无核酸酶的水洗脱。根据 Trinean DropSense 16 测得的 A260 计算出 sgRNA 产量。Monarch RNA 纯化试剂盒产生的 sgRNA 产量与其它市售 RNA 纯化试剂盒一致。

纯化后使用 LC-MS 测量残留的核苷酸 (NTP), 报告显示 NTP 面积 (rATP+rCTP+rGTP+rUTP) 占 sgRNA 面积的百分比。NEB 的 Monarch RNA 纯化试剂盒在去除 sgRNA 合成反应中残留的 NTP 方面, 始终优于其它市售的 RNA 纯化试剂盒

图 22: 用 Monarch RNA 纯化试剂盒以不同洗脱体积回收 RNA



10 µg、50 µg 或者 500 µg 的 RNA (来自 Sigma 公司大肠杆菌 16s 和 23s rRNA 标准品) 用 Monarch RNA 纯化试剂盒 (10 µg, NEB #T2030) (50 µg, NEB #T2040) (500 µg, NEB #T2050) 进行纯化。用无核酸酶水洗脱 RNA。RNA 回收率的百分比用 Trinean[®] DropSense[®] 16 测量的 A260 进行计算得到。当 Monarch RNA 纯化试剂盒 (10 µg, NEB #T2030; 50 µg, NEB #T2040; 500 µg, NEB #T2050) 的洗脱体积分别是 6 µl、20 µl 和 50 µl 时, 可高效回收大约 80% 的 RNA。

RNA 纯化问题解决指南:

问题	原因	解决方案
RNA 产量低	试剂加错	<ul style="list-style-type: none"> 检查说明书以确保使用正确的缓冲液组分、正确的缓冲液和乙醇的添加顺序,以及正确处理收集液和洗脱液
	试剂混匀不充分	<ul style="list-style-type: none"> 在将样品上样至纯化柱之前,确保以下成分充分混合:乙醇与 RNA 样品和 RNA 结合缓冲液。
	洗脱不完全	<ul style="list-style-type: none"> 用于洗脱的无核酸酶水需加在纯化柱的中央,使纯化基质完全被覆盖,确保充分洗脱。较大的洗脱体积和较长的孵育时间可以增加 RNA 的产量,但这样会使样品稀释并增加处理时间。对于典型的 RNA 样品,使用说明书中推荐的洗脱体积和孵育时间即可。
	RNA 二级结构复杂	<ul style="list-style-type: none"> 对于小片段 RNA (< 45 nt) 的结合和洗脱可能受到 RNA 分子二级结构的影响。如果小片段 RNA 产量少,我们建议用 2 倍体积的乙醇,而不是说明书步骤 2 中的 1 倍体积来稀释样品。
纯化的 RNA 降解	RNase 污染	<ul style="list-style-type: none"> 为了避免 RNA 纯化过程中的 RNase 污染,请确保在洁净的实验台上操作,戴手套,并使用一次性无 RNase 的枪头和离心管(未提供)。不使用时,请将所有试剂盒组件密封。
	RNA 储存不当	<ul style="list-style-type: none"> RNA 应立刻在下游应用中使用或在 -70°C 下储存
A260/230 比值低	洗脱过程中有胍盐残留。	<ul style="list-style-type: none"> 确保在洗脱样品之前进行了洗涤步骤 确保柱底端不要接触收集液。如果不确定,请重复离心 重复使用收集管时,将管的边缘在 Kimwipe 吸水纸上吸干,然后再重新连接到纯化柱上,以去除残留的洗涤缓冲液
RNA 在下游应用中效率低	盐分和乙醇残留	<ul style="list-style-type: none"> 洗涤后残留的乙醇和盐可能会抑制下游应用。注意确保柱底端不与收集液接触。如有疑问,请重新离心 1 分钟以确保洗脱的 RNA 中不残留微量的盐和乙醇
	DNA 污染	<ul style="list-style-type: none"> 对于某些应用,可能需要去除 DNA。使用 DNase I (NEB #M0303) 孵育 RNA 样品,并使用 Monarch RNA 纯化实验方案纯化 RNA

订购信息

	产品名称	货号	规格
Template generation	Q5 High-Fidelity DNA Polymerase	M0491S/L	100/500 units
	Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase	M0493S/L	100/500 units
	Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix	M0494S/L	100/500 reactions
	Deoxynucleotide (dNTP) Solution Set	N0446S	25 µmol each
	Deoxynucleotide (dNTP) Solution Mix	N0447S/L	8/40 µmol each
	BspQI	R0712S/L	500/2,500 units
	SapI	R0569S/L	250/1,250 units
In vitro transcription	T3 RNA Polymerase	M0378S	5,000 units
	T7 RNA Polymerase	M0251S/L	5,000/25,000 units
	Hi-T7 [®] RNA Polymerase	M0658S	50,000 units
	SP6 RNA Polymerase	M0207S/L	5,000/25,000 units
	Pyrophosphatase, Inorganic (yeast)	M2403S/L	10/50 units
	Pyrophosphatase, Inorganic (<i>E. coli</i>)	M0361S/L	10/50 units
	Ribonucleotide Solution Set	N0450S/L	10/50 µmol each
	Ribonucleotide Solution Mix	N0466S/L	10/50 µmol each
	RNase Inhibitor, Murine	M0314S/L	3,000/15,000 units
	RNase Inhibitor, Human Placenta	M0307S/L	2,000/10,000 units
Circular RNA	RNase R	M0100S	20,000 units
	T4 RNA Ligase 1	M0204S/L	1,000/5,000 units

订购信息 (续)

	产品名称	货号	规格
In vitro transcription & mRNA synthesis kits	EnGen sgRNA Synthesis Kit, <i>S. pyogenes</i>	E3322S	20 reactions
	HiScribe T7 mRNA Kit with CleanCap Reagent AG	E2080S/L	20/100 reactions
	HiScribe T7 ARCA mRNA Kit (with tailing)	E2060S	20 reactions
	HiScribe T7 ARCA mRNA Kit	E2065S	20 reactions
	HiScribe T7 High Yield RNA Synthesis Kit	E2040S/L	50/250 reactions
	HiScribe T7 Quick High Yield RNA Synthesis Kit	E2050S/L	50/250 reactions
	HiScribe SP6 RNA Synthesis Kit	E2070S	50 reactions
	N1-Methyl-Pseudouridine-5'-Triphosphate (N1-Methyl-Pseudo-UTP)	N0431S	0.1 ml
	5-Methyl-Cytidine-5'-Triphosphate (5-Methyl-CTP)	N0432S	0.1 ml
	Pseudouridine-5'-Triphosphate (Pseudo-UTP)	N0433S	0.1 ml
	5-Methoxy-Uridine-5'-Triphosphate (5-Methoxy-UTP)	N0434S	0.1 ml
Capping & tailing	Faustovirus Capping Enzyme	M2081S/L	500/2,500 units
	Vaccinia Capping System	M2080S	400 units
	mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase	M0366S	2,000 units
	m ⁷ G(5')ppp(5')G RNA Cap Structure Analog	S1404S/L	1.0/5.0 μmol
	3'-O-Me-m ⁷ G(5')ppp(5')G Cap Structure Analog (ARCA)	S1411S/L	1.0/5.0 μmol
	m ⁷ G(5')ppp(5')A Cap Structure Analog	S1405S/L	1.0/5.0 μmol
	G(5')ppp(5')A Cap Structure Analog	S1406S/L	1.0/5.0 μmol
	G(5')ppp(5')G Cap Structure Analog	S1407S/L	1.0/5.0 μmol
	<i>E. coli</i> Poly(A) Polymerase	M0276S/L	100/500 units
	Adenosine-5' Triphosphate (ATP)	P0756S/L	1.0/5.0 μmol
	RNA Purification	Monarch Spin RNA Cleanup Kit (10 μg)	T2030S/L
Monarch Spin RNA Cleanup Kit (50 μg)		T2040S/L	10 preps / 100 preps
Monarch SpinRNA Cleanup Kit (500 μg)		T2050S/L	10 preps / 100 preps
Monarch Spin Columns S1A (10 μg)		T2037L	100 columns + tubes
Monarch Spin Columns S2A (50 μg)		T2047L	100 columns + tubes
Monarch Spin Columns S2B (500 μg)		T2057L	100 columns + tubes
Monarch Buffer BX		T2041L	80 ml
Monarch Buffer BZ		T1114L	40 ml
RNA Analysis	RNase 4 Digestion and 3' End Repair Mix	M1288S/L	50/250 reactions
	RNase 4	M1284S/L	2,500/12,500 units
	RNase H	M0297S/L	250/1,250 units
	Nucleoside Digestion Mix	M0649S	50 reactions
Template Removal	DNase I (RNase-free)	M0303S/L	1,000/5,000 units
	DNase I-XT	M0570S/L	1,000/5,000 units
Other RNA reagents	RNA Loading Dye (2X)	B0363S	4 x 1.0 ml
RNA markers	ssRNA Ladder	N0362S	0.05 ml
	Low Range ssRNA Ladder	N0364S	0.05 ml

参考文献

- Jani, B. and Fuchs, R. (2012) *J. Vis. Exp.* 61, DOI: 10.3791/3702.
- Grudzien, E., et al. (2004) *RNA*, 10, 1479–1487.
- Stepinski, J., et al. (2001) *RNA*, 7, 1486–1495.
- Peng, Z.-H., et al. (2002) *Org. Lett.* 4, 161–164.
- Pasquinelli, A. E., Dahlberg, J. E. and Lund, E. (1995) *RNA*, 1, 957–967.
- Kuge, H., et al. (1998) *Nucleic Acids Res.* 26, 3208–3214.
- Warren, L., et al. (2010) *Cell Stem Cell*, 7, 618–630.
- Wolf, E., et al. (2022) *Nucleic Acids Res.* 50(18), e106. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac632>
- Jora, M., et al. (2019) *Biochimica et Biophysica Acta. Gene regulatory mechanisms*, 1862(3), 280–290.

USA

New England Biolabs, Inc.
Telephone (978) 927-5054
Toll Free (USA Orders) 1-800-632-5227
Toll Free (USA Tech) 1-800-632-7799
info@neb.com

Australia & New Zealand

New England Biolabs (Australia) PTY
Telephone: 1800 934 218 (AU)
info.au@neb.com
Telephone: 0800 437 209 (NZ)
info.nz@neb.com

Canada

New England Biolabs, Ltd.
Toll Free: 1-800-387-1095
info.ca@neb.com

China

New England Biolabs (Beijing), Ltd.
Telephone: 010-82378265/82378266
info@neb-china.com

France

New England Biolabs France
Telephone: 0800 100 632
info.fr@neb.com

Germany & Austria

New England Biolabs GmbH
Free Call: 0800/246 5227 (Germany)
Free Call: 00800/246 52277 (Austria)
info.de@neb.com

Japan

New England Biolabs Japan, Inc.
Telephone: +81 (0)3 5669 6191
info.jp@neb.com

Singapore

New England Biolabs, Pte. Ltd.
Telephone: +65 638 59623
sales.sg@neb.com

Republic of Korea

New England Biolabs Korea Ltd.
Toll Free: +82 (70) 47318478
info.kr@neb.com

United Kingdom

New England Biolabs (UK), Ltd.
Call Free: 0800 318486
info.uk@neb.com

www.neb.com



One or more of these products are covered by patents, trademarks and/or copyrights owned or controlled by New England Biolabs, Inc. The use of trademark symbols does not necessarily indicate that the name is trademarked in the country where it is being read; rather, it indicates where the document was originally developed. For more information, please email us at busdev@neb.com. The use of these products may require you to obtain additional third party intellectual property rights for certain applications.

Your purchase, acceptance, and/or payment of and for NEB's products is pursuant to NEB's Terms of Sale at www.neb.com/support/terms-of-sale. NEB does not agree to and is not bound by any other terms or conditions, unless those terms and conditions have been expressly agreed to in writing by a duly authorized officer of NEB.

B CORPORATION® is a registered trademark of B Lab, Inc. CLEANCAP® is a registered trademark of TriLink BioTechnologies, LLC. DROPSENSE™ is a trademark of Trinean NV. MEGACLEAR™ AND NANODROP® are trademarks of Thermo Fisher Scientific, Inc. SYBR® is a registered trademark of Thermo Fisher Scientific, Inc.

© Copyright 2025, New England Biolabs, Inc.; all rights reserved

RNA – Version 9.0 – 02/25

Capping it off.

Superior performance and convenience
with NEB's HiScribe T7 mRNA Kit with
CleanCap Reagent AG

