

## LZCap®AG(3'Acm) Capping Kit (N1-Me-pUTP)

**产品介绍:** LZCap®AG(3'Acm) 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'Acm)是一种 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。共转录加帽纯化后的 mRNA 能在细胞和体内翻译表达，广泛应用于体外转录、基因编辑、疫苗研发、CAR-T 治疗、蛋白代替疗法以及再生医学等领域。

**规格及组份:** 50 次/盒 (20µL 体系); 200 次/盒 (20µL 体系)

序号	组分	原浓度	50 Test	200 Test
1	LZCap®AG(3'Acm)	100 mM	40 µL	160 µL
2	ATP	100 mM	50 µL	200 µL
3	UTP 或 N1-Me-pUTP	100 mM	50 µL	200 µL
4	CTP	100 mM	50 µL	200 µL
5	GTP	100 mM	50 µL	200 µL
6	10×Transcription Buffer	/	100 µL	400 µL
7	Recombinant RNase Inhibitor	40 U/µL	25 µL	100 µL
8	Pyrophosphatase	0.1 U/µL	20 µL	80 µL
9	T7 RNA polymerase	250 U/µL	32 µL	128 µL
10	Recombinant DNase I(RNase-free)	2 U/µL	25 µL	100 µL
11	LiCl	7.5 M	1.5 mL	6 mL
12	Control	0.5 µg/µL	10 µL	40 µL
13	RNase Free Water	/	3 mL	12 mL

**保 存:** 低于-20°C 保存。

**DNA 模板设计:** 本试剂盒以 LZCap®AG 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

```

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	5 mM
UTP 或 N1-Me-pUTP (100 mM)	1	5 mM
CTP (100 mM)	1	5 mM
GTP (100 mM)	1	5 mM
10×Transcription Buffer	2	1×
Recombinant RNase Inhibitor (40 U/μL)	0.5	1 U/μL
Pyrophosphatase (0.1 U/μL)	0.4	0.002 U/μL
T7 RNA polymerase (250 U/μL)	0.64	8 U/μL
Linear DNA+ RNase Free Water	11.66	1 μg
LZCap®AG(3'Acm) (100mM)	0.8	4 mM
终体积	20	μL

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 0.5μL 的 DNase I, 37°C 反应 15min, 消化 DNA 模板;

4. LiCl 沉淀法纯化

1) 反应后 20μL 的转录产物内分别加入 30μL 的 LiCl 和 30μL RNase Free Water (LiCl 终浓度需保持在 2.5-2.8M), 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) 600μL 清洗, 12000rpm 离心 8min, 去除上清;

4) 再重复 2 次步骤 3, 共清洗 3 次;

5) 放超净台静置 10min 至乙醇完全挥发, 用 30-100μL 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'Acm)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. 实验所用的试剂耗材和容器等无 RNase 污染。

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

4. 使用修饰核苷酸代替野生型核苷酸时, 反应终浓度不变。

5. 由于 10×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, 以防止 10×的高浓度盐离子对酶造成影响。