

## Poly(A) Polymerase Tailing Kit

产品编号	产品名称	包装
R7075S	Poly(A) Polymerase Tailing Kit	50-250次

### 产品简介:

- 碧云天生产的Poly(A) Polymerase Tailing Kit, 即Poly(A)聚合酶加尾试剂盒, 是一种基于*E.coli* Poly(A) Polymerase的活性在ATP存在的条件下将Poly(A)尾快速而有效地添加到单链RNA的3'-OH末端的试剂盒。
- 如果RNA分子的3'末端是磷酸, 可以使用T4 Polynucleotide Kinase (T4 PNK), 即T4多核苷酸激酶, 在没有ATP存在的条件下催化去除3'端磷酸。在加Poly(A)尾之前, 可以通过柱纯化(如R0028 RNAeasy™动物小RNA抽提试剂盒)或切胶回收等方法去除T4 PNK及相应的反应体系组分。
- Poly(A) Polymerase Tailing Kit主要用于在RNA分子3'末端添加 $\geq 150$ 个碱基的Poly(A)尾。Poly(A)尾的添加可提高RNA在真核细胞中的稳定性并增强其在转染或显微注射后的翻译效率。此外, Poly(A)尾还可以为合成cDNA时提供通用的引物结合位点, 或用于RNA的末端标记或mRNA的定量。
- 碧云天Poly(A) Polymerase Tailing Kit对单链RNA添加Poly(A)尾的效果请参考图1。

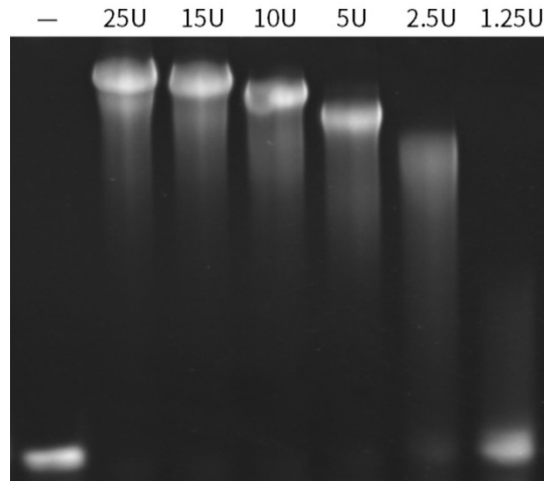


图1. 碧云天Poly(A) Polymerase Tailing Kit对单链RNA添加Poly(A)尾的效果图。在100 $\mu$ l反应体系(50mM Tris-HCl, pH8.1, 250mM NaCl, 1mM ATP, 10mM MgCl<sub>2</sub>)中, 加入人工合成的1 $\mu$ g 22nt的单链RNA, 以及图中指定量的Poly(A) Polymerase, 37°C孵育60min, 65°C孵育20min终止反应。取20 $\mu$ l反应后的产物, 加入4 $\mu$ l 6X DNA Loading Buffer (D0071), 95°C变性3min。随后进行含7M Urea的15%聚丙烯酰胺凝胶电泳。室温条件下用1X TBE作为电泳液, 180V电泳90min, NA-Red (D0128) 1:1000稀释后室温染色15min, 然后拍照观察。

- **用途:** 提高mRNA在真核细胞中的稳定性, 提高转染或显微注射后真核细胞中RNA的翻译效率; 在合成cDNA第一链时, 提供引物结合位点; 将放射性标记的腺苷(radiolabeled adenosine)添加到RNA分子的3'末端。
- 本试剂盒如果用于100 $\mu$ l的反应体系, 可以进行50次Poly(A)加尾反应; 本试剂盒如果用于20 $\mu$ l的反应体系, 可以进行250次Poly(A)加尾反应

### 包装清单:

产品编号	产品名称	包装
R7075S-1	<i>E.coli</i> Poly(A) Polymerase (5U/ $\mu$ l)	100 $\mu$ l
R7075S-2	10X PAP Reaction Buffer	600 $\mu$ l
R7075S-3	10mM ATP	600 $\mu$ l
R7075S-4	Nuclease-free water	1ml
—	说明书	1份

### 保存条件:

-20°C保存, 至少两年有效。

## 注意事项:

- 反应的终止取决于加Poly(A)尾后RNA分子的后续用途。可以有多种方式终止Poly(A)加尾反应,如立即将完成的反应置于-20°C或-80°C条件下冷冻,通过有机溶剂萃取(例如苯酚/氯仿抽提)去除Poly(A) Polymerase或使用EDTA等试剂螯合Mg<sup>2+</sup>以抑制酶活性。使用本试剂盒时,不推荐对Poly(A) Polymerase进行热变性以终止反应,因为这样可能会导致RNA降解。
- 如果需要在体外或体内进行翻译,可以预先通过苯酚/氯仿抽提及乙醇或醋酸铵沉淀,或柱纯化已经添加了Poly(A)尾的RNA。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用,不得用于临床诊断或治疗,不得用于食品或药品,不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康,请穿实验服并戴一次性手套操作。

## 使用说明:

1. 参考下表在冰浴中配制如下反应体系。参考下表100μl反应体系中加Poly(A)尾的RNA底物量可以高达60μg,并且可根据实验需要按比例放大或缩小反应体系。在Poly(A)加尾反应中,加尾的长度取决于RNA 3' -OH末端的摩尔浓度、反应时间、酶量和ATP浓度。可以通过更改一个或多个因素来调整加尾的长度。按照如下的推荐反应体系,在37°C孵育60min,加Poly(A)尾长度可以超过150个碱基。

Reagent	Volume	Final Concentration
DEPC-treated Water	(75.5-x)μl	-
10X PAP Reaction Buffer	10μl	1X
10mM ATP	10μl	1mM
RNase Inhibitor (40U/μl)	2.5μl	1U/μl (Optional)
RNA	xμl	0.01-0.6μg/μl
<i>E.coli</i> Poly(A) Polymerase (5U/μl)	2μl	0.1U/μl
Total Volume	100μl	-

**注1:** 由于涉及RNA操作,需要严格按照RNA操作的规范进行,避免RNase污染,相关试剂和耗材需要经过DEPC处理以去除RNase或者确保是RNase free的。

**注2:** 用于加尾反应的RNA在使用前应进行适当的纯化,并溶解于nuclease free water中,且溶液中应不含EDTA和盐分。

**注3:** 如果较难确保比较严格的RNase-free,推荐在上述反应体系中添加0.5 μl RNase Inhibitor (R0102),以提高溶液中RNA的稳定性。

2. **加尾反应:** 37°C孵育30-60min。
3. **反应终止:** 反应完成后立即-20°C保存,或加入EDTA至终浓度为10mM,或者使用苯酚/氯仿抽提并使用铵盐/乙醇沉淀RNA。
4. **Poly(A)加尾产物的电泳鉴定:** 配制与RNA分子大小相对应比例的变性琼脂糖-甲醛凝胶。使用厚度为0.75mm(或更薄)的凝胶以获得最佳的分辨率。RNA长度小于500nt时,建议使用2.5%的琼脂糖凝胶;RNA分子大于500nt时建议使用1%的琼脂糖凝胶。RNA样品75°C变性10min,用1X MOPS缓冲液,以5v/cm的电压进行凝胶电泳,直至溴酚蓝染料迁移至接近凝胶底部。电泳检测时,RNA样品中宜含有10mM或更高浓度的EDTA,否则RNA较容易出现降解。

## 相关产品:

产品编号	产品名称	包装
R0102-2kU	RNase Inhibitor	2000U
R0102-10kU	RNase Inhibitor	10000U
R0102-50kU	RNase Inhibitor	50000U
R0107	氧钒核糖核苷复合物(RNase抑制剂)	2ml
R0108	氧钒核糖核苷复合物(RNase抑制剂)	10ml
D7153	BeyoRT™ M-MuLV反转录酶	2000U
D7159	BeyoRT™ M-MuLV反转录酶(RNase H-)	2000U
D7160S	BeyoRT™ II M-MLV反转录酶(RNase H-)	10KU
D7160M	BeyoRT™ II M-MLV反转录酶(RNase H-)	50KU
D7160L	BeyoRT™ II M-MLV反转录酶(RNase H-)	200KU
D7166	BeyoRT™ cDNA第一链合成试剂盒(RNase H-)	10次
D7168S	BeyoRT™ II cDNA第一链合成试剂盒(RNase H-)	20次
D7168M	BeyoRT™ II cDNA第一链合成试剂盒(RNase H-)	100次
D7168L	BeyoRT™ II cDNA第一链合成试剂盒(RNase H-)	500次
D7170S	BeyoRT™ II cDNA合成试剂盒(with gDNA Eraser)	20次
D7170M	BeyoRT™ II cDNA合成试剂盒(with gDNA Eraser)	100次
D7170L	BeyoRT™ II cDNA合成试剂盒(with gDNA Eraser)	500次
D7172	cDNA第二链合成试剂盒	10次
D7176S	BeyoRT™ III M-MLV反转录酶	10KU

D7176M	BeyoRT™ III M-MLV反转录酶	50KU
D7176L	BeyoRT™ III M-MLV反转录酶	200KU
D7178S	BeyoRT™ III cDNA第一链合成试剂盒	20次
D7178M	BeyoRT™ III cDNA第一链合成试剂盒	100次
D7178L	BeyoRT™ III cDNA第一链合成试剂盒	500次
R7070S	<i>E.coli</i> Poly(A) Polymerase	100U
R7070M	<i>E.coli</i> Poly(A) Polymerase	500U
R7070L	<i>E.coli</i> Poly(A) Polymerase	2.5kU
R7070XL	<i>E.coli</i> Poly(A) Polymerase	10kU

Version 2021.03.04