EZ-QC mRNA Capping Efficiency Assay Kit

Cellscript



CELLSCRIPT™
RNA for Translation in Cells

10 Reaktionen
Artikel-Nr.: 150530 | CellScript | Hersteller-Nr.: ACE240910

378,00 €*

*zzgl. MwSt. zzgl. Versandkosten

Beschreibung

Aktionsangebote: Jubiläumsaktion
Produkttyp: QC Kit
Verpackung: 10 Reaktionen

Quantifizierung der mRNA-Capping-Effizienz (prozentualer Gehalt an gecappter RNA) mittels Standard-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) mit dem EZ-QC™ mRNA Capping Efficiency Assay Kit: Eine einfache und kosteneffiziente Benchtop-Methode für die Qualitätskontrolle als Alternative zur HPLC- und LC-MS-Analyse.

Einsatz des EZ-QC™ mRNA Capping Efficiency Assay Kit im Labor

Das EZ-QC™ mRNA Capping Efficiency Assay Kit ermöglicht die

- Quantitative Analyse der Capping-Effizienz (prozentualer Anteil an gecappter RNA) von synthetisierter mRNA
- 5'-Cap-Strukturen können co- oder post-transkriptionell zu *in vitro* transkribierter (IVT) RNA hinzugefügt werden, Die Biozym bietet ein breites Spektrum *in vitro* Transkription Kits an.
- Da nur gecappte RNAs in Zellen exprimiert werden, ist es wichtig, einen möglichst hohen Prozentsatz an gecappter RNAs in einer Probe zu haben.

Das EZ-QC™ mRNA Capping Efficiency Assay Kit vereinfacht die Analyse und ersetzt langwierige und teure Methoden zur Bestimmung der Capping-Effizienz, wie HPLC und Massenspektrometrie, durch eine Bestimmung auf der Grundlage der Standard-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE).

Übrigens: Wir haben auch PAGE-Gelkammern im Angebot

Telefon: +49 (0) 51 52 / 90 20
Telefax: +49 (0) 51 52 / 20 70
E-Mail: support@biozym.com
Internet: www.biozym.com

Rechtliches
Registergericht: Amtsgericht Hannover
Registernummer: HRB 101682
UST-ID: DE 813739502

Biozym Scientific GmbH
Geschäftsführer
Dr. Sebastian Petri

Der EZ-QC™ mRNA Capping Efficiency Assay verwendet ein chimäres RNA:DNA:RNA-Targeting-Oligonukleotid (vom Anwender bereitgestellt), das an das 5'-Ende einer RNA-Mischung hybridisiert. Dieser Hybridisierungskomplex dient als Substrat für die RNase H-Spaltung, die die gecappten und nicht gecappten 5'-Endfragmente freisetzt. Diese werden anschließend über PAGE aufgetrennt und dann quantifiziert. Dann erfolgt die Berechnung des prozentualen Anteils gecappter RNA in der Probe. Der EZ-QC™ mRNA Capping Efficiency Assay unterscheidet nicht zwischen Cap 0- und Cap 1-capped RNAs, sondern nur zwischen capped (Cap 0 + Cap 1) und uncapped RNAs.

Für mRNA die eine XBG 5' UTR besitzt, kann alternativ das EZ-QC™ XBG mRNA Capping Efficiency Assay Kit für die Bestimmung des prozentualen Gehalts an gecappter RNA verwendet werden. Dieses enthält bereits das XBG 5' UTR Targeting Oligonukleotid.

Zur Bestimmung des Cap 0 vs. Cap 1 Gehalts bietet CELLSCRIPT™ auch das EZ-QC™ mRNA Cap 1 Efficiency Assay Kit an. Das EZ-QC™ mRNA Poly(A) Tail Length Assay Kit dient zur Bestimmung der Länge des Poly(A)-Tails. Damit ist die vollständige Charakterisierung von mRNA möglich.

Performance des EZ-QC™ mRNA Capping Efficiency Assay Kits

Betrachtung des EZ-QC™ mRNA Targeting Oligonukleotid-Designs

Das EZ-QC™ mRNA Capping Efficiency Targeting Oligonukleotid sollte so konzipiert sein, dass es ein mRNA 5'-Ende-Fragment mit einer Länge von 25-40 Nukleotiden freisetzt (Abbildung 1). Dieses freigesetzte Fragment (+/- Capping Nukleotid) soll mittels PAGE-Analyse aufgetrennt werden. Die RNase-H-Spaltung erfolgt im mRNA-Strang gegenüber der 5'-äußersten DNA-Base im Targeting-Oligonukleotid.

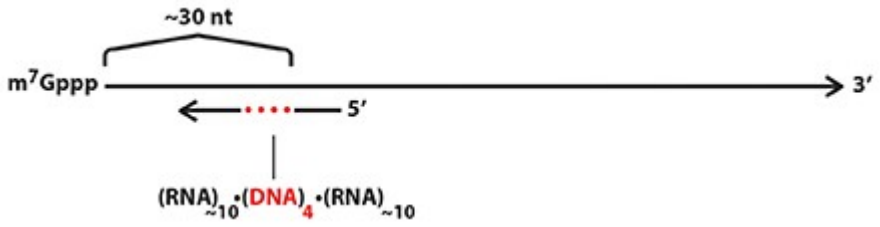


Abbildung 1. Grafische Darstellung von mRNA und Targeting-Oligonukleotid.

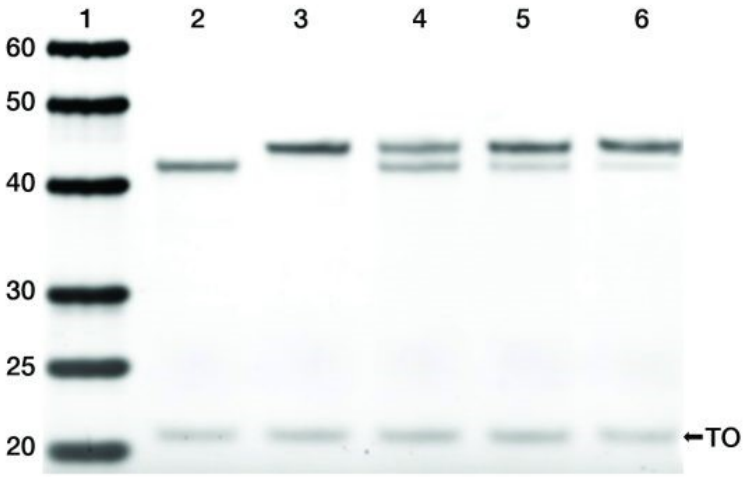
Auflösung von gecappten und nicht gecappten 5'-Endfragmenten

Mischungen aus gecappter und nicht gecappter mRNA wurden mit dem EZ-QC™ mRNA Capping Efficiency Assay Kit bearbeitet und auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt (Abbildung 2A). Das Targeting-Oligonukleotid ermöglicht das Schneiden der mRNA an einer einzigen, reproduzierbaren Stelle, so dass der prozentuale Anteil an gecappter und ungecappter RNA der untersuchten Proben mit größerer Sicherheit bestimmt werden kann. Anhand der Analyse des PAGE-Gels lässt sich der prozentuale Anteil an gecappter und nicht gecappt mRNA in einem Gemisch bestimmen (Abbildung 2B).

Telefon: +49 (0) 51 52 / 90 20
Telefax: +49 (0) 51 52 / 20 70
E-Mail: support@biozym.com
Internet: www.biozym.com

Rechtliches
Registergericht: Amtsgericht Hannover
Registernummer: HRB 101682
UST-ID: DE 813739502

Biozym Scientific GmbH
Geschäftsführer
Dr. Sebastian Petri



1. IDT ssDNA 10/60 Ladder
2. 100% Uncapped RNA (34-nt ssRNA fragement)
3. 100% Capped RNA (35-nt ssRNA fragement)
4. 60% Capped/40% Uncapped mRNA Mixture
5. 75% Capped/25% Uncapped mRNA Mixture
6. 90% Capped/10% Uncapped mRNA Mixture

TO) unhybridized EZ-QC mRNA Capping Efficiency Targeting Oligo (18-nt)

Abbildung 2A. Gecappte und nicht gecappte 5'-Endfragmente werden durch PAGE effizient aufgetrennt, was eine Analyse der Capping Effizienz mit Standard-Laborausrüstung ermöglicht.

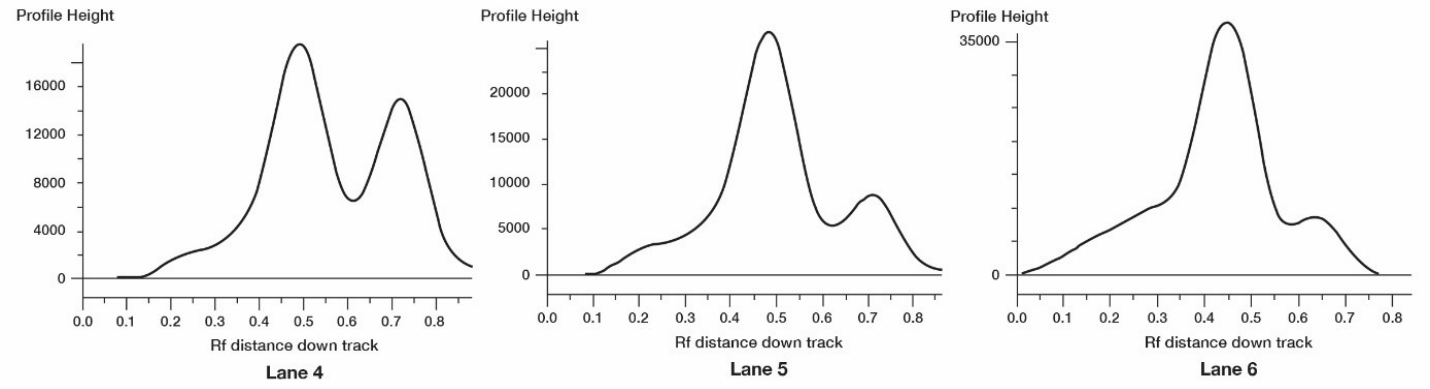


Abbildung 2B. Densitometrische Daten der Spuren 4, 5 und 6 aus dem obigen PAGE-Gel unter Verwendung eines Syngene® G:Box Gel Documentation Systems. Der prozentuale Anteil an gecappter und ungecappter mRNA in jeder Mischung wird mithilfe einer einfachen Ablesung berechnet.

Im Kit enthalten (Wichtig: bei -20°C in einem Gefrierschrank ohne Abtauzyklus aufbewahren. Nicht bei -70°C lagern):

EZ-QC™ mRNA Capping Efficiency Assay Kit (10 reactions) Sufficient for 10 experimental and 10 control reactions.

Kit Component *&*
Reagent Volume

EZ-QC™ RNase H
in 50% glycerol, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM dithiothreitol (DTT), 0.1 mM EDTA and 0.1% Triton® X-100.
20 µl

10X EZ-QC™ RNase H Reaction Buffer
0.2 M Tris-acetate, pH 7.9, 0.5 M potassium acetate, 0.1 M magnesium acetate and 0.01 M DTT.

Telefon: +49 (0) 51 52 / 90 20
Telefax: +49 (0) 51 52 / 20 70
E-Mail: support@biozym.com
Internet: www.biozym.com

Rechtliches
Registergericht: Amtsgericht Hannover
Registernummer: HRB 101682
UST-ID: DE 813739502

Biozym Scientific GmbH
Geschäftsführer
Dr. Sebastian Petri

20 µl

ScriptGuard™ RNase Inhibitor, 40 U/µl
in 50% glycerol, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 10 mM DTT, 0.1 mM EDTA and 0.1% Triton X-100.
10 µl

Stop/Loading Buffer
95% formamide, 10 mM EDTA, pH 7.5, 0.01% Bromophenol Blue and 0.01% Xylene Cyanol
200 µl

RNase-Free Water
500 µl

Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien

- Gereinigte gecappte mRNA/RNA
- EZ-QC™ mRNA Capping-Effizienz Targeting-Oligonukleotid
- Materialien für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese.
- Materialien für die Visualisierung, Bildgebung und Quantifizierung von Polyacrylamidgelen.
- Optional: Molekulargewichtsmarker (z. B. ssDNA 10/60 Ladder [IDT])

Bedingungen und Konditionen: Das aufgelistete Produkt wird derzeit von CELLSCRIPT™ nur für Forschungszwecke unter den definierten Bedingungen angeboten.

FAQ - Häufig gestellte Fragen

Es sind mehr als zwei Banden im gecappten/ungecappten Bereich des Gels vorhanden. Was kann ich tun?

- Das Targeting-Oligo hat an mehreren Stellen hybridisiert: Gestalten Sie das Targeting-Oligo um.
- Es wurde ein reines DNA-Targeting-Oligo verwendet: Verwenden Sie ein chimäres RNA:DNA:RNA Targeting-Oligo.
- Das Targeting-Oligo migriert innerhalb des Bereichs der gecappten/ungecappten Fragmente: Gestalten Sie das Targeting-Oligo so um, dass es entweder eine andere Größe hat als die gecappten/ungecappten Fragmente oder dass es an einer anderen Position hybridisiert, so dass die gecappten/ungecappten Fragmente eine andere Größe haben als das Targeting-Oligo.

Warum erhalte ich nur schwache gecappte/ungecappte Banden?

Die 5'-End-Sekundärstruktur der mRNA verhindert eine effiziente Hybridisierung des Targeting-Oligos.

- Die mRNA und das Targeting-Oligo durch Mischen, Erhitzen und Abkühlen vorbereiten, bevor die restlichen Reaktionskomponenten hinzugefügt werden.

Telefon: +49 (0) 51 52 / 90 20
Telefax: +49 (0) 51 52 / 20 70
E-Mail: support@biozym.com
Internet: www.biozym.com

Rechtliches
Registergericht: Amtsgericht Hannover
Registernummer: HRB 101682
UST-ID: DE 813739502

Biozym Scientific GmbH
Geschäftsführer
Dr. Sebastian Petri

- Gestalten Sie das Targeting-Oligo um, damit es an eine andere Region der mRNA hybridisiert. Manchmal kann es schon hilfreich sein, die RNase H-Schnittstelle um nur eine Base zu verschieben.

Eine oder mehrere der vier DNA-Basen im chimären Targeting-Oligo hybridisieren mit einer Pseudouridin- oder N1-Methyl-Pseudouridin-Base auf der mRNA.

- Gestalten Sie das Targeting Oligo so um, dass es an eine andere Region hybridisiert, in der die DNA-Basen des Targeting Oligos nicht an Pseudouridin- oder N1-Methyl-Pseudouridin-Basen hybridisieren.

Ein molarer Überschuss an Targeting-Oligo wurde in der Reaktion nicht verwendet. Unhybridisiertes Targeting Oligo sollte auf dem Gel sichtbar sein.

- Überprüfen Sie erneut die experimentelle Stöchiometrie.
- Fügen Sie mehr Targeting Oligo zur Reaktion hinzu.
- Geben Sie mehr fertige Reaktionsproben pro Well.
- Erhöhen Sie die Inkubationszeit der Reaktion auf 60 Minuten.

Warum erscheinen sehr viele Banden auf meiner Lane?

RNase-Kontamination.

- Stellen Sie sicher, dass Sie ScriptGuard™ RNase Inhibitor Link) in der Reaktion verwenden.
- Dekontaminieren Sie Röhrchen, Pipettenspitzen und Oberflächen. Verwenden Sie immer Handschuhe.

Der Arbeitsvorrat an Targeting-Oligo wird abgebaut.

- Verwenden Sie eine andere Arbeitskonzentration des Targeting-Oligos oder stellen Sie eine andere Aliquotierung her.

Warum erhalte ich nur unscharfe Banden?

Probleme mit dem PAGE-System (z. B. Gel nicht vollständig polymerisiert, Gel zu heiß gelaufen, Harnstoff wurde kurz vor dem Laden der Probe nicht aus den Wells gespült, Pufferproblem).

- Lassen Sie das Gel erneut laufen.

Banden der gecappten und ungecappten RNA sind nicht voneinander getrennt

Es wurde ein < 20%iges Polyacrylamid-Gel verwendet. Führen Sie das Gel erneut mit 20 %igem Polyacrylamid durch. Kommerziell erhältliche vorgegossene 15 %ige Gele lösen die Banden meist nicht ausreichend auf.

Telefon: +49 (0) 51 52 / 90 20
Telefax: +49 (0) 51 52 / 20 70
E-Mail: support@biozym.com
Internet: www.biozym.com

Rechtliches
Registergericht: Amtsgericht Hannover
Registernummer: HRB 101682
UST-ID: DE 813739502

Biozym Scientific GmbH
Geschäftsführer
Dr. Sebastian Petri