EZ-QC™ mRNA Poly(A) Tail Length Assay Kit

Cellscript



CELLSCRIPT™
RNA for Translation in Cells

10 Reaktionen
Artikel-Nr.: 150534 | CellScript | Hersteller-Nr.: PAT240910

378,00 €*

*zzgl. MwSt. zzgl. Versandkosten

Beschreibung

Aktionsangebote: Jubiläumsaktion
Produkttyp: QC Kit
Verpackung: 10 Reaktionen

Kit zur Quantifizierung der mRNA-Poly(A) Tail Länge

Das EZ-QC™ mRNA Poly(A) Tail Length Assay Kit bietet eine präzise fluoreszenzbasierte quantitative Analyse der Länge des Poly(A) Tails von synthetisierter mRNA. Poly(A) Tail-Längen von mehr als 500 Basen können mittels Standard-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) bestimmt werden. Im Gegensatz dazu liegt die Grenze der LC-MS-Analyse bei 9-156 Basen.

Die Polyadenylierung am 3'-Ende, d. h. das Anfügen eines Poly(A)-Schwanzes an die mRNA, ist eine entscheidende Modifikation, die die Stabilität und die Expressionsmengen der mRNA in eukaryotischen Zellen beeinflusst, wobei längere Tails im Allgemeinen für eine höhere Stabilität und Translationseffizienz sorgen. Der Assay verwendet RNase A, um selektiv Nicht-Adenin-Reste in der mRNA-Probe zu verdauen, wobei nur der Poly(A)-Schwanz intakt bleibt. Die Längenbestimmung erfolgt mit Hilfe einer PAGE-Methode, die durch die proprietäre Poly(A)-20-mer-Leiter ergänzt wird und so eine hochauflösende Quantifizierung der Poly(A)-Tails auch oberhalb der Grenzen der LC-MS-Analyse ermöglicht.

Zur Bestimmung des prozentualen Gehalts an gecappter RNA bietet CELLSCRIPT™ auch das EZ-QC™ XBG mRNA Capping Efficiency Assay Kit (für mRNA mit einer XBG 5' UTR), das EZ-QC™ mRNA Capping Efficiency Assay Kit (für mRNA mit einer beliebigen bekannten 5' UTR-Sequenz) und das EZ-QC™ mRNA Cap 1 Efficiency Assay Kit zur vollständigen Charakterisierung von mRNA an.

Vorteile

- Präzise Quantifizierung der mRNA-Poly(A)-Tail-Länge mittels Standard-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE).
- Bestimmung der Tail-Längen von 20 bis > 500 Basen (oberhalb der Möglichkeiten der LC-MS-Analyse) unter Verwendung der mitgelieferten proprietären Poly(A) 20-mer-Leiter.
- Zeit- und kostensparende Analyse der Länge des Poly(A) Tails- am gleichen Tag-im eigenen Labor.

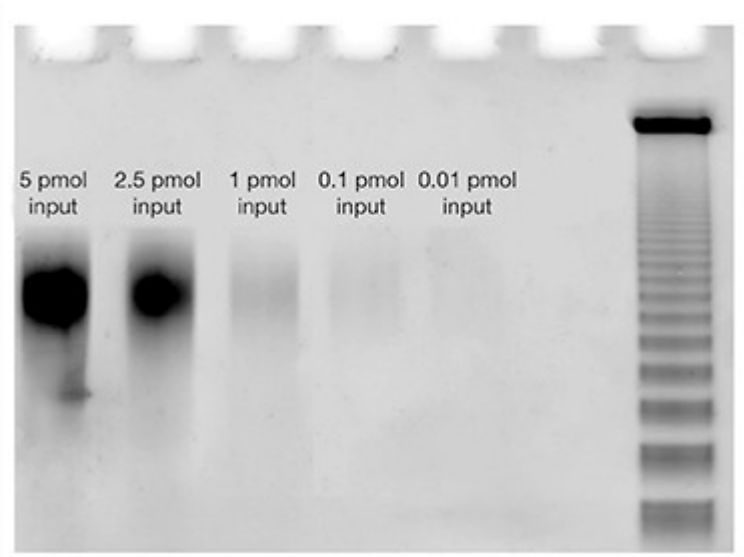
Das Produkt ist nur für Forschungszwecke bestimmt (RUO).

Übrigens: Zum enzymatischen Anfügen des Poly(A)-Tails bieten wir Ihnen unser bewährtes A-Plus Poly(A) Polymerase Tailing Kit, 4 U/µl an.

Performance des EZ-QC™ mRNA Poly(A) Tail Length Assay Kit

Bei Verwendung des Standardprotokolls und einer durchschnittlichen Belichtungszeit von ~0,5 Sekunden ergibt bereits 1 pmol poly(A)-tailed RNA ein mit dem Auge erkennbares Signal (Abbildung 1). Bei Verwendung der Gel-Imaging- und Analyse-Software (Syngene® G:Box & GeneTools) ergibt bereits 0,1 pmol poly(A)-tailed RNA ein nachweisbares und messbares Signal. Durch verlängerte Belichtungszeiten oder eine Erhöhung des Probenvolumens kann die benötigte Menge an poly(A)-tailed RNA weiter minimiert werden. Das Protokoll ist robust. Die Menge der zugeführten poly(A)-tailed RNA kann je nach Verfügbarkeit der Proben einfach modifiziert werden.

Abbildung 1. Input-Titration des EZ-QC™ mRNA Poly(A) Tail Length Assay Kit. Bereits 0,1 pmol mRNA-Input ist nachweisbar und kann mit der Gelanalysesoftware gemessen werden.



Quantitative Detektion

In einem einzigen Lauf kann eine Vielzahl von unterschiedlichen Tail-Längen aufgetrennt werden. Abbildung 2A zeigt die Poly(A)-20-mer-Leiter (Lane 1 und 6), einen kodierten 120-nt-Tail (Lane 2), einen 15-minütigen enzymatischen 136-nt-Tail (Lane 3), einen 30-minütigen enzymatischen 193-nt-Tail (Lane 4) und einen 60-minütigen enzymatischen 261-nt-Tail (Lane 5) in einem einzigen Gellauf. Das Gel zeigt sowohl den Grad der Schwanzbildung als auch die Verteilung des enzymatischen Tailings. Die Länge des Poly(A) Tails zusammen mit Gleichmäßigkeit des Peaks und der Signalintensität helfen optimale enzymatischen Bedingungen zu 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

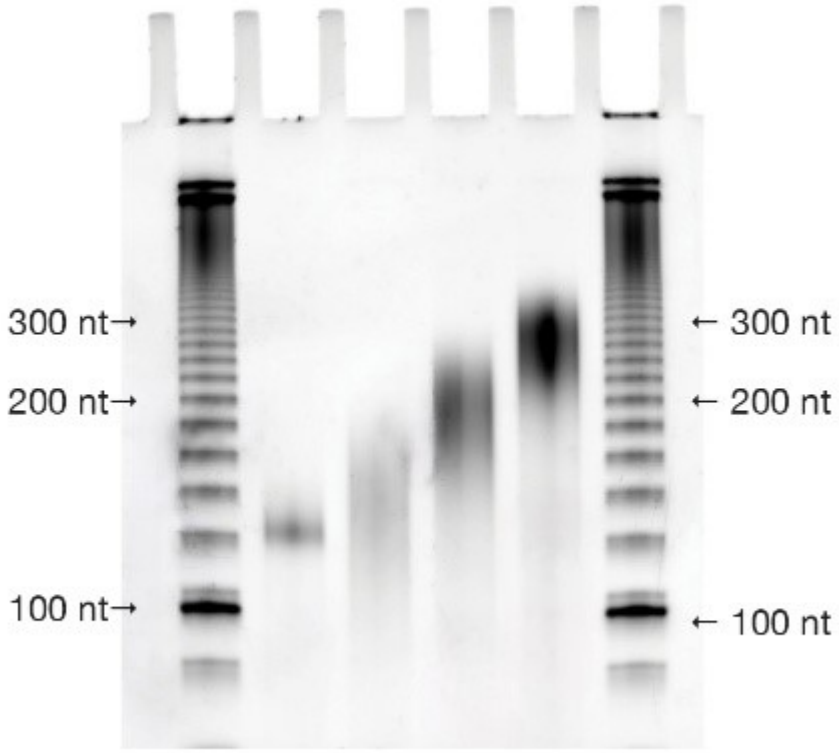


Abbildung 2A: Polyacrylamidgel mit Poly(A)-Tail Längen zwischen 120 nt und 261 nt aus dem EZ-QC™ mRNA Poly(A) Tail Length Assay Kit

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

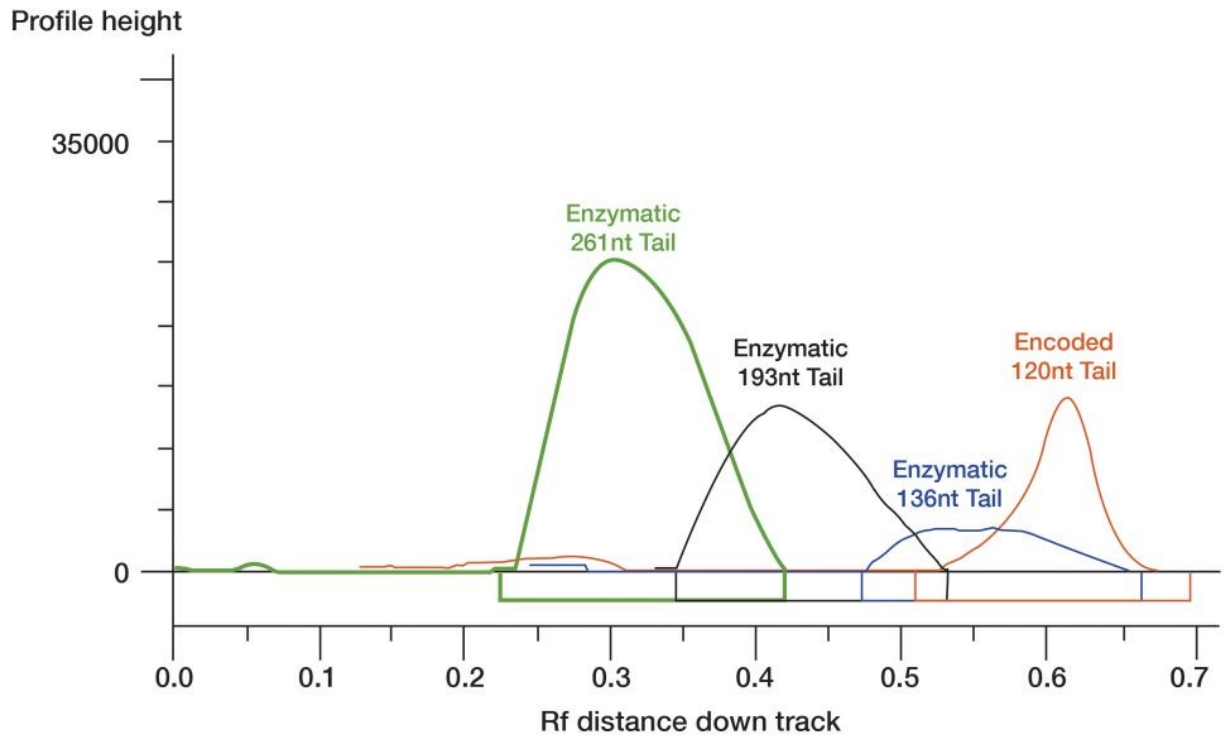


Abbildung 2B: Verteilung des Signals aus der Analyse des Polyacrylamidgels. Die durchschnittlichen Tail-Längen sind berechnet.

Im Kit enthalten

Wichtig Bei -20°C in einem Gefrierschrank ohne Abtauzyklus aufbewahren. Nicht bei -70°C lagern.

EZ-QC™ mRNA Poly(A) Tail Length Assay Kit (10 reactions) Sufficient for 10 experimental and 10 control reactions (optional)	
Kit Component	**Reagent Volume**
EZ-QC™ RNase A in 50% glycerol, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA and 0.1% Triton® X-100.	20 µl
10X EZ-QC™ RNase A Reaction Buffer 0.6 M Tris-HCl, pH 8.0, 1 M NaCl, 0.1 M EDTA.	20 µl
Stop/Loading Buffer 95% formamide, 10 mM EDTA, pH 7.5, 0.01% Bromophenol Blue and 0.01% Xylene Cyanol.	200 µl

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

Poly(A) Fluorescence Enhancer, 100X **Protect the tube from exposure to light.**	3 x 1.7 ml
Poly(A) 20-mer Ladder Ready-to-Load: supplied in Stop/Loading Buffer	100 µl
RNase-Free Water	500 µl

Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien

- Gereinigte poly(A)-tailed mRNA/RNA
- Materialien für die Polyacrylamidgel-Elektrophorese
- Materialien für die Visualisierung, Bildgebung und Quantifizierung von Polyacrylamidgelen

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

FAQ - Häufig gestellte Fragen

Ich möchte extrem lange Poly(A)-Tails untersuchen. Kann ich das mit diesem Kit tun?

Die Poly(A) 20-mer Ladder reicht bis zu extrem hohen Poly(A)-Längen von >500-nt. Die Poly(A)-20-mer-Leiter enthält einen 100-nt-DNA-Oligomarker zur Orientierung der Bandengrößen. Bei der Untersuchung von sehr langen Poly(A)-Tails ist es wahrscheinlich, dass das Gel über einen längeren Zeitraum laufen muss, wodurch der 100-nt-DNA-Oligomarker aus dem Gel läuft. Wenn Sie mit einer solchen Situation rechnen, empfehlen wir, einen zusätzlichen RNA-Molekulargewichtsmarker (z. B. RNA Century™ Marker, Thermo Scientific) auf dem Gel laufen zu lassen, um sich an der richtigen Größe der Poly(A)-20-mer-Leiterbanden zu orientieren. Hinweis: Gemischte NTP-RNA-Leitern werden nicht genau mit den gleich langen Poly(A)-Leiterbanden kongruieren, da die Unterschiede in der Mobilität mit zunehmender Bandenlänge zunehmen. Der 100-nt-DNA-Oligomarker migriert etwas schneller als die 100-nt-Poly(A)-Bande, während eine gemischte NTP-RNA-Marker-Bande etwas langsamer migriert als die Poly(A)-Marker-Bande gleicher Länge.

Was ist die Mindestmenge an Input-mRNA, die für eine EZ-QC™ mRNA Poly(A) Tail Length Assay Kit verwendet werden kann?

~0,1 pmol poly(A)-tailed mRNA kann unter den Standardreaktionsbedingungen verwendet werden. Für eine einfachere Detektion und eine genauere Bewertung der Poly(A)-Tail-Größenverteilung wird jedoch empfohlen, =2,5 pmol der Input-mRNA zu verwenden. Hinweis: Diese Werte können in Abhängigkeit von der Effizienz des Tailings, der Gel-Belichtungszeit, der Qualität der Gelladung und anderen Faktoren variieren.

Müssen die Proben vor dem RNase-A-Verdau auf die mRNA-Inputmenge normalisiert werden?

Die Toleranz des Assays ist so beschaffen, dass eine sehr genaue Bestimmung der Poly(A)-Tail-Länge aus einem breiten Bereich (höher oder niedriger) von Input-mRNA-Mengen erhalten werden kann. Es sollte darauf geachtet werden, dass eine Signalsättigung auf dem Gel-Imaging-System vermieden wird, da sonst die genaue Bestimmung der Poly(A)-Tail-Länge erschwert wird. Es wird jedoch empfohlen, die mRNA-Inputmengen zu normalisieren, da der Assay nicht nur die Länge des Poly(A)-Schwanzes, sondern auch die Intensität der Poly(A)-Tail Größenverteilung bestimmen kann. Dies kann bei einer Optimierung der Reaktion hilfreich sein.

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