mRNA 加帽率检测前处理试剂盒

Pre-treatment kit for mRNA capping rate detection

10T

产品货号：BP-05-10

珠海宝锐生物科技有限公司
Zhuhai Biori Biotechnology Co.,Ltd
网址：www.biori.com
咨询电话：0756-8699969
邮箱：marketing@biori.com
地址：珠海市香洲区水岸一路88号

目录

产品概述

试剂盒组分 2

自备材料 2

mRNA 加帽率检测前处理试剂盒操作流程

1. 探针设计与合成 3

2. 酶切 3

3. SDS-PAGE 酶切验证（选做） 3

4. 回收 4

5. SDS-PAGE 酶切验证 4

注意事项 **4**

技术与支持 **5**

珠海宝锐生物科技有限公司
Zhuhai Biori Biotechnology Co.,Ltd
网址：www.biori.com
咨询电话：0756-8699969
邮箱：marketing@biori.com
地址：珠海市香洲区水岸一路88号

产品概述

加帽率是 mRNA 疫苗药物的重要质量属性指标，是 mRNA 类产品申报所必需的验证资料。目前，加帽率的测定主要通过液质联用的方式进行。具有帽子结构的 mRNA 与未加帽的 mRNA 其分子量之间存在百数量级的差异，相比于完整 mRNA 数十万级的分子量，很难精确分析加帽与未加帽样品之间的差异。因此，对加帽率的分析首先需要将长片段的 mRNA 处理成小片段，将数十万中找百数量级的差异转变为数千中找百数量级的差异。宝锐生物开发的 mRNA 加帽率检测前处理试剂盒能精确、高效的处理 mRNA 样品，处理后的样品可直接用于液质联用的分析，助力快速分析样品加帽率。本试剂盒适用于不同加帽方式和具有各类帽子结构的 mRNA 样品前处理。

试剂盒组分

试剂名称	体积
吸附磁珠	1mL
M Reagent	40μL
10×M Buffer	200μL
Loading Buffer	200μL
Buffer 1	1mL
Buffer 2	18mL
Buffer 3	1mL×2
EB Buffer	1mL

保存条件

M reagent、10×M buffer、Buffer 1 于-20±5℃保存；其余成分存放于 2-8℃。磁珠切勿冻融。

自备材料

必备：

耗材：200μL PCR 管、1.5mL 无核酸酶离心管。

试剂：无核酸酶水、探针。

选备：

试剂：亚甲基蓝、醋酸钠、10×TBE 缓冲液、45%Acr（43.4g 丙烯酰胺加 1.6g 双丙烯酰胺，超纯水定容至 100mL，过滤后 4℃避光保存）、尿素、四甲基乙二胺（TEMED）、10%过硫酸铵（AP）。

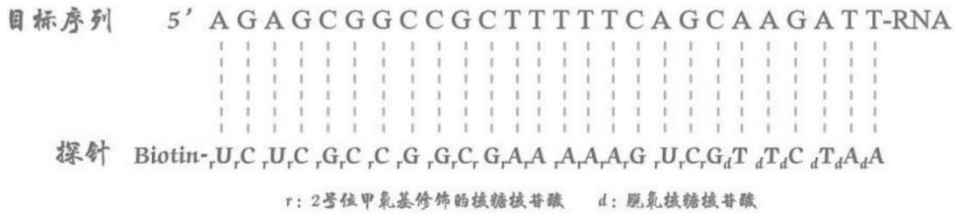
mRNA 加帽率检测前处理试剂盒操作流程

操作说明

珠海宝锐生物科技有限公司
Zhuhai Biori Biotechnology Co.,Ltd
网址：www.biori.com
咨询电话：0756-8699969
邮箱：marketing@biori.com
地址：珠海市香洲区水岸一路88号

1. 探针设计与合成

本试剂盒不提供特异性探针，需要根据目的序列设计探针。设计的探针须包含三部分（如图所示）：3 '端 20-25 个与目标序列 5 '端互补配对的核糖核苷酸序列，为避免探针的降解，此区域序列可使用修饰的核糖核苷酸，推荐使用 2 号位甲氧基修饰的核苷酸；随后是 6 个与目标序列互补配对的脱氧核糖核苷酸序列，此区域无需修饰；最后的 3 '端选择 Biotin 修饰。单次探针合成 1OD 即可满足本试剂盒规定次数所需探针量。探针合成推荐的供应商请与技术支持联系。



2. 酶切

2.1 合成的干粉形式探针，开盖前顺离至管底，在洁净台中，吸取一定量的 Buffer1 将探针溶解成 100pmol/μL。

注意：Buffer1 具体用量参考探针合成标签，溶解的探针可分装保存于-80°C。

2.2 使用 200μL 的无核酸酶 PCR 管 ，加入 150pmol 的 RNA ，随后加入 150pmol 的探针，用移液枪轻柔地混匀。

注意：50pmolRNA 含量粗算：RNA 用量(ng)=0.05nmol×330g/mol×Xnt,X=RNA 碱基数。此步骤确保每管总体积小于 60μL，对于大体积的反应，可使用 8 连管操作，孵育后合并。

2.3 PCR 程序设置：95°C ， 5min；65°C ， 2min；55°C ， 2min；40°C ， 2min；22°C ， 2min。

2.4 反应结束后 ，向其中加入 3μL 的 M Reagent 和对应的 10x M Buffer，37°C孵育 2h。

3. SDS-PAGE 酶切验证（选做）

3.1 试剂配制

3.1.1 染色液配制：2g/L 亚甲基蓝+0.4M 醋酸钠（醋酸钠 pH=4.7）。

注意：染色液可多次（大于 10 次）重复使用，操作过程中注意亚甲基蓝微毒性。

3.1.2 按照如下的配方配制 21% Urea-PAGE 凝胶。

试剂名称	体积/质量
45%Acr	10 mL
尿素	9.60 g
10×TBE	2 mL
10%AP	140 μL
TEMED	14 μL

注意：此配方适用于 1/2 胶 ，请根据具体实验放大或缩小比例。

3.2 样品处理

对照组：4.5μL 无核酸酶水 + 0.5μL 探针+ 5μL Loading Buffer。

实验组：5μL 酶切处理的样品 + 5μL Loading Buffer。

珠海宝锐生物科技有限公司
Zhuhai Biori Biotechnology Co.,Ltd
网址:www.biori.com
咨询电话:0756-8699969
邮箱:marketing@biori.com
地址:珠海市香洲区水岸一路88号

混匀的样品 70°C ， 变性 5min ，随后立即放置在冰上。

3.3 电泳

260V 预电泳 26min ，上样后 260V 电泳 2h ，染色 10min ，随后超纯水脱色过夜。

注意：此阶段样品可暂存于-20°C。

4. 回收

4.1 准备磁珠

磁珠混匀后，取 70μL 磁珠加入无核酸酶离心管中，放至磁力架，磁性分离去上清，随后从磁力架取下。

4.2 磁珠清洗

管中加入 200μL Buffer 2，充分混匀后，磁性分离去上清，重复 2 次。

4.3 上样

管中加入全部酶切后的样品，充分混匀，必要时，可使用混匀仪室温混匀 30min。混匀后，置于磁力架磁性分离去上清，随后从磁力架取下。

4.4 洗杂

管中加入 200μL Buffer 2，磁性分离去上清，清洗磁珠 4 次 ，随后从磁力架取下。

4.5 二次洗杂

加入 100μL 预冷 Buffer 3 混匀，磁性分离去上清，随后从磁力架取下。

注意：此步骤上清可暂存于-80°C,以避免样品流失。

4.6 洗脱

取 25μL 预热至 80°C的 EB Buffer 和磁珠充分混匀，80°C加热 4min，磁性分离保留上清至标记好的无核酸酶离心管中，重复此步骤 2 次，最后将两次得到的上清混合，再次置于磁力架吸附，确保去除少量残留磁珠。

注意：制备的样品中若含有磁珠会对检测设备、色谱柱造成伤害，为避免发生此类情况，吸取上清时避免触碰到磁珠，25μL 以上的样品足够后续的应用。

5. SDS-PAGE 酶切验证

为验证本试剂盒对加帽样品的处理效果，保证后续上机测试的结果，使用 SDS-PAGE 验证回收的片段，SDS-PAGE 的操作流程请参考本章“3 SDS-PAGE 酶切验证”部分。

注意事项

1. 按要求保存试剂盒中的组分，M Reagent、10 ×M Buffer 和 Buffer 1 存放于-20°C， 其余试剂存放于 4°C，注意吸附磁珠不能冻融。

2. 本试剂盒中提供的磁珠、试剂等材料经过了大量筛选验证，为保证处理效果，请勿随意更换试剂盒中提供的材料，否则将无法保证实验效果。

3. 步骤 3 为选做步骤，可反应酶切处理的效果，决定后续继续优化酶切条件或进行酶切产物回收，为确保上机测试的效果，处理完成样品应当经过 SDS-PAGE 检测。

珠海宝锐生物科技有限公司
Zhuhai Biori Biotechnology Co.,Ltd
网址:www.biori.com
咨询电话:0756-8699969
邮箱:marketing@biori.com
地址:珠海市香洲区水岸一路88号

4. 本试剂盒处理后的样品应当及时上机测试，样品存放时间尽可能小于 1 周，未加帽的样品长时间存放易降解，可能会导致测试的加帽率与实际偏高。

5. 实验过程中注意个人防护。

6. 使用前应混匀，避免反复冻融。

技术与支持

本试剂盒处理后的样品适用于任意机型的液质联用系统，针对不同的系统，分离色谱柱和流动相需要进行验证与筛选。宝锐生物的研发团队可以在分离色谱柱和流动相的选择上提供技术支持，助力您快速建立加帽率检测方法。

技术支持邮箱：heliyuan@biori.com。

珠海宝锐生物科技有限公司
Zhuhai Biori Biotechnology Co.,Ltd
网址:www.biori.com
咨询电话:0756-8699969
邮箱:marketing@biori.com
地址:珠海市香洲区水岸一路88号