碧云天生物技术/Beyotime Biotechnology
订货热线: 400-1683301 或 800-8283301
订货 e-mail: order@beyotime.com
技术咨询: info@beyotime.com
网址: http://www.beyotime.com

碧云天网站 微信公众号

Circular RNA Synthesis Kit

产品编号	产品名称	包装
R0722S	Circular RNA Synthesis Kit	20次
R0722M	Circular RNA Synthesis Kit	100次

产品简介：

- 碧云天生产的Circular RNA Synthesis Kit，即环状RNA合成试剂盒或环形RNA合成试剂盒，也称Circular RNA Preparation Kit即环状RNA制备试剂盒或环形RNA制备试剂盒，是一种非常便捷和高效的通过酶学方法将单链RNA (ssRNA)转化成环状RNA (circRNA)的试剂盒。合成的circRNA可以用于转染细胞研究circRNA的生物学功能等。近期有研究表明环状RNA也可以用作mRNA疫苗 (mRNA vaccine)，包括新冠病毒(2019-nCoV or SARS-CoV-2)等的疫苗。
- 环状RNA是一种通过典型的5'-3'磷酸二酯键形成的环状结构的RNA分子，这种结构特征使得其不受RNA外切酶的影响，表达更稳定，不易降解。circRNA是生物体内源存在的一种通常为单链的环状RNA，可以在内含子反向剪接(trans-splicing)等过程中产生。
- 环状RNA的研究可以采用质粒或病毒表达的方式，通过反向剪接等产生circRNA。但通过质粒或病毒等产生circRNA的过程中涉及反向剪接等辅助性的过程，有可能会干扰研究结果。如果能直接转染合成的circRNA，就能更直接地研究circRNA的生物学功能。
- 本试剂盒进行单链RNA的环化反应的原理是，通过RNA环化酶(RNA Cyclase)环化5'磷酸化3'羟基的单链RNA。
- **本试剂盒环化效率高，操作便捷。**环化效率通常可以达到95%以上，且操作仅需一步孵育即可完成。通常本试剂盒能将95%以上的5'磷酸化3'羟基的单链RNA (ssRNA)转化成环状RNA (circRNA)，因此环化产物可以不需要切胶纯化，仅需热失活环化酶后通过乙醇沉淀即可用于后续实验。
- 本试剂盒催化5'磷酸化3'羟基的单链RNA分子环化连接生成环状RNA的效果参见图1。

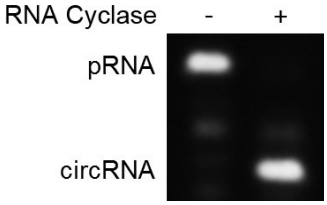

图1. 使用碧云天生产的Circular RNA Synthesis Kit制备环状RNA (circular RNA, circRNA)的效果图。反应体系为20μl，单链RNA的终浓度为0.5μM，反应条件为37°C孵育30min，反应完毕后在65°C孵育15min终止反应，随后取样用15%尿素(7M)变性聚丙烯酰胺凝胶在冰水浴中进行电泳，最终进行核酸染色和荧光成像分析。如图所示，本试剂盒在30min内就可以将95%以上的5'磷酸化3'羟基的单链RNA转化为环状RNA。

- 本试剂盒如果用于20μl的反应体系，分别可以用于20次和100次的circRNA合成反应。

包装清单：

产品编号	产品名称	包装
R0722S-1	RNA Cyclase	20μl
R0722S-2	10X RNA Cyclase Buffer	50μl
R0722S-3	20X Cyclase Enhancer I	30μl
R0722S-4	5X Cyclase Enhancer II	100μl
R0722S-5	DEPC-treated Water	400μl
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
R0722M-1	RNA Cyclase	100μl
R0722M-2	10X RNA Cyclase Buffer	250μl
R0722M-3	20X Cyclase Enhancer I	120μl
R0722M-4	5X Cyclase Enhancer II	500μl
R0722M-5	DEPC-treated Water	2ml

—	说明书	1份

保存条件：

-20ºC保存，至少一年有效。

注意事项：

- 底物单链RNA的3’端必须是羟基，5’端可以是磷酸化，也可以是腺苷酰化。
- 本试剂盒提供的环化反应体系可以按照比例放大反应体系，对环状RNA产物的得率无显著影响。
- 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：

Reagent	Volume	Final Concentration
DEPC-treated Water	15.5μl	-
ssRNA (20μM)	0.5μl	0.5μM
10X RNA Cyclase Buffer	2μl	1X
20X Cyclase Enhancer I	1μl	1X
RNA Cyclase	1μl	-
Total Volume	20μl	-

注意：

a. 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处理去除RNase或者确保是RNase free的。由于涉及单链RNA，可以考虑适量添加R0102 RNase Inhibitor，尽管我们实测不添加RNase Inhibitor时也可以获得良好的连接效果。

b. 上述表格中ssRNA的用量已经比较大，对于样品比较少的情况下，完全可以大幅减少ssRNA的用量的。

c. 如果同时进行多个连接反应，可以把上表中除ssRNA之外的所有溶液和酶提前预混合，然后再分装到各反应管内。

d. 如果发现环化效果欠佳，可以考虑酌情添加5X Cyclase Enhancer II，20μl反应体系中需要添加4μl 5X Cyclase Enhancer II。添加5X Cyclase Enhancer II可以增强环化效率，但同样也会增强非特异性的连接反应。

2. 环化反应：37ºC孵育30min。如果发现效果欠佳可以尝试25ºC孵育2h或16ºC孵育16h。为了使连接反应更加充分，可以适当延长连接反应时间。

3. 终止反应：65ºC孵育15min，即可终止反应。

4. 环化产物的电泳鉴定：电泳上样前95ºC孵育5min随后置于冰浴，以充分变性。尿素(7M)变性聚丙烯酰胺凝胶(15%)进行凝胶电泳分析。环状RNA的电泳迁移率会变快一点(参考图1)。

5. 浓缩与纯化：可以采用常规的乙醇沉淀方法进行浓缩并去除环化反应体系中的缓冲液成分。

相关产品：

产品编号	产品名称	包装
R0021	DEPC水(DNase、RNase free)	100ml
R0022	DEPC水(DNase、RNase free)	500ml
R0051	Annealing Buffer for RNA Oligos (5X)	1ml
R0056-2ml	PEG8000 (50%, RNase free))	2ml
R0058-1ml	$MgCl_2$ (100mM, DEPC-treated)	1ml
R0102-2kU	RNase Inhibitor	2000U
R0102-10kU	RNase Inhibitor	10000U
R0102-50kU	RNase Inhibitor	50000U
R0123	RNase and DNase Away	250ml
R0125	RNase, DNase and DNA Away	250ml
R0127	RNase, DNase, RNA and DNA Away	250ml
R0621S	T4 RNA Ligase 1 (ssRNA Ligase, 10U/μl)	1000U
R0621M	T4 RNA Ligase 1 (ssRNA Ligase, 10U/μl)	5000U
R0632S	T4 RNA Ligase 2 (dsRNA Ligase)	1000U
R0635S	T4 RNA Ligase 2, truncated	5kU
R0635M	T4 RNA Ligase 2, truncated	20kU
R0635L	T4 RNA Ligase 2, truncated	100kU
R0700S	小RNA 3’接头(5’腺苷化, 3’封闭)及连接试剂盒	20次
R0702S	Universal miRNA Cloning Linker (5′腺苷化3′封闭)	1μg

R0702M	Universal miRNA Cloning Linker (5′腺苷化3′封闭)	5μg
R0716S	5’ DNA Adenylation Kit	10次
R0716M	5’ DNA Adenylation Kit	50次
ST1249-2ml	DEPC (≥97%, Reagent grade)	2ml
ST1249-10ml	DEPC (≥97%, Reagent grade)	10ml
ST036	DEPC	10g

Version 2021.09.10