

# Poly(A) RNA Polymerase

REF: EG25108-S/M

## 储存条件

-20°C保存 2 年

## 产品组成

| 组分                              | 规格 S  | 规格 M   |
|---------------------------------|-------|--------|
| Poly(A) RNA Polymerase (5 U/μl) | 20 μl | 100 μl |
| 10× PAP Buffer                  | 1 ml  | 1 ml   |
| ATP (10 mM)                     | 40 μl | 200 μl |

## 产品简介

Poly(A) Polymerase 是一种来源于大肠杆菌的聚合酶，也称 E.coli PAP、PAP 酶、Poly(A) 加尾酶或 PolyA 加尾酶，经大肠杆菌重组表达后纯化获得。Poly(A) Polymerase 不依赖于模板，催化 ATP 转化为 AMP 并添加至单链 RNA 的 3' 端，形成多聚腺苷尾。Poly(A) Polymerase 无法以 DNA 为底物，且不推荐使用双链 RNA 或过短的寡核苷酸 (< 20 nt) 为底物。Poly(A) Polymerase 催化的 Poly(A) 加尾反应只能使用 ATP，而不能使用 ADP 或 dATP。使用 CTP 和 UTP 时，其掺入量不足使用 ATP 的 5%；使用 GTP 时，完全不能添加到 RNA 的 3' 末端。

## 活性定义

1 活性单位 (U) 是指在 20 μl 反应体系中，37°C 条件下，10 min 催化 1 nmol 的 AMP 掺入 RNA 所需要的酶量。

## 产品应用

1. 在 RNA 末端添加 Poly(A) 尾，用于后续克隆或纯化。
2. 提升 mRNA 在真核细胞中的翻译效率。
3. RNA 的 3' 末端标记。
4. cDNA 合成，为 miRNA 添加 Poly(A) 尾后逆转录获得 cDNA。

## 质量控制

### 蛋白纯度

经 SDS-PAGE 凝胶电泳检测，蛋白纯度不低于 95%。

### 非特异性内切酶活性

37°C 下，在 20 μl 反应体系中将 5 U Poly(A) Polymerase 与 200 ng 超螺旋质粒 DNA 共同温育 4 h，使用琼脂糖凝胶电泳检测，少于 20% 的质粒 DNA 转变成缺刻或线性状态。

### DNase 活性

37°C 下，在 20 μl 反应体系中将 5 U Poly(A) Polymerase 与 15 ng 双链 DNA 片段共同温育 16 h，使用琼脂糖凝胶电泳检测，双链 DNA 片段无变化。

### RNase 活性

37°C 下，在 10 μl 反应体系中将 5 U Poly(A) Polymerase 与 500 ng RNA 共同温育 1 h，使用琼脂糖凝胶电泳检测，超过 90% 的 RNA 保持完整。

### 宿主DNA残留

采用中国药典 2020 版四部通则 3407 外源性 DNA 残留量测定法第三法定量 PCR 法，本品中大肠杆菌宿主细胞 DNA 残留量 <10 拷贝 /5 U。

## 使用方法

1. 于冰上配制如下反应体系：

| 试剂                                     | 使用量      |
|----------------------------------------|----------|
| RNA <sup>a</sup>                       | 1~10 μg  |
| 10× PAP Buffer                         | 2 μl     |
| Poly(A) Polymerase (5 U/μl)            | 1 μl     |
| ATP (10 mM)                            | 2 μl     |
| RNase Inhibitor, Murine (40 U/μl) (可选) | 0.5~1 μl |
| Nuclease-Free Water                    | To 20 μl |

a. 为避免杂质影响加尾酶活性，应当使用纯化后的 RNA；若 RNA 3' 端存在高级结构，建议对 RNA 进行预变性 (65°C 加热 5 min，冰上放置 5 min) 后再进行加尾，避免影响加尾效果。

2. 37°C 孵育 30~60 min。加尾长度受酶量、ATP 浓度、反应时间等多个因素影响，可根据实际反应情况进行体系调整。

3. 按照以上反应体系，加 Poly(A) 尾长度可以超过 100 个碱基。

4. 加入 EDTA 至终浓度为 10 mM 或 65°C 孵育 20 min 终止反应。

## 注意事项

1. 加尾长度受酶量、ATP 浓度和反应时间等因素影响，一般本酶在 37°C 反应 30 min 可加约 30 个 A 碱基，60 min 可加约 100 个 A 碱基。

2. 该酶将 AMP 添加到 RNA 的 3' 末端具有较高的选择性，并不会在所有 RNA 分子中添加相同长度的 Poly (A)。

3. 加尾结束后，在转染细胞或显微注射前，必须对 RNA 进行纯化。

4. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套及口罩进行实验操作。