



高产量 T7 RNA 体外转录试剂盒

【产品名称】：高产量 T7 RNA 体外转录试剂盒

【货号】：ZDT7020S

【包装规格】：25 次

【试剂盒组成】

产品名称	包装
T7 RNA Polymerase	60 μ l
RNase Inhibitor	15 μ l
T7 Reaction Buffer (5X)	120 μ l
ATP (100mM)	60 μ l
CTP (100mM)	60 μ l
GTP (100mM)	60 μ l
UTP (100mM)	60 μ l
Nuclease-free Water	1ml
DNase I	25 μ l
说明书	1 份

【保存方法】

试剂盒冷冻运输，试剂盒各组分于-20 $^{\circ}$ C 保存，有效期请见包装上的标注。

【产品介绍】

T7 高产量 RNA 转录试剂盒，是一种利用 T7 RNA Polymerase 能在相对较短时间内进行体外 RNA 大量转录的特性而研发的 RNA 体外大量转录试剂盒。本试剂盒能以携带有 T7 Promoter (TAATACGACTCACTATAGGG) 序列的线性化质粒、PCR 产物或合成的 DNA 片段等为模板，体外转录合成 mRNA、lncRNA、shRNA 等多种类型的 RNA，每次转录的 RNA 量实测可以达到 150-200 μ g。

本试剂盒兼容 m1 ψ TP、 ψ TP，可以用于体外大量转录合成带有 m1 ψ 等修饰的 mRNA，便于制备成 mRNA 疫苗。本试剂盒也兼容生物素、地高辛、FITC、Cy3 等标记的核苷酸，便于体外大量转录合成生物素、地高辛、FITC、Cy3 等标记的 RNA 探针。

注：m1 ψ TP:N1-甲基假尿苷三磷酸(m1 ψ TP)可取代尿苷三磷酸(UTP)

ψ TP: 假尿苷三磷酸(ψ TP)可取代尿苷三磷酸(UTP)

本试剂盒转录合成的 RNA 可用于体外翻译、转染细胞表达目的基因、RNA 结构与功能研究、核酸酶生化研究、RNase 保护实验、RNA 剪切、微阵列分析、显微注射和 mRNA 疫苗等相关研究。

本试剂盒经过优化，可以仅使用 500ng-1 μ g 的模板，在 20 μ l 的反应体系中，在 2 小时内产生多达 150-200 μ g 的 RNA，再延长反应时间对增加反应产物作用不大。本试剂盒对于长链和短链的 RNA 都有很好的转录效果，短链相应的可以降低模板(200-500ng)/反应，也可以按比例放大反应体系，从而可以轻松获得毫克级的 RNA。

【注意事项】（操作前请仔细阅读）

1. 用于 RNA 合成的器具须用 0.1% DEPC（焦碳酸二乙酯）水溶液 37 $^{\circ}$ C 浸泡 12 h；然后在 120 $^{\circ}$ C 高压灭菌 30 min 去除 残留的 DEPC。



2. 用于 RNA 实验的试剂，须使用干热灭菌（180°C，60 min）或者上述 DEPC 处理的器具盛装，使用的无菌水须用 0.1% DEPC 处理后进行高温高压灭菌。建议 RNA 实验使用的器具、试剂和无菌水专用。
3. 请使用不含 RNA 和 DNA 酶的枪头、离心管进行实验。
4. 在进行实验操作时应将酶放置于冰上，待实验结束后于-20°C 保存。
5. 如果希望合成加帽的 RNA，须自备 Cap analog，如 m⁷(3'-O-methyl)-G(5')ppp(5')G 等。如果希望合成生物素、地高辛、FITC、Cy3 等标记的 RNA 或带有特殊修饰的 RNA，相应的修饰 NTP 需要自备。
6. 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。
7. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

【标准操作步骤】

1. 模板制备

本试剂盒体外转录的 DNA 模板需要是带有 T7 Promoter 的线性化质粒 DNA、PCR 产物或合成的 DNA 片段等。正义或反义 RNA 的合成取决于插入序列的方向。将靶序列置于 T7 Promoter 的下游，在转录时将以双链 DNA 的反义链为模板转录获得正义 RNA，即转录获得的 RNA 的序列对应于插入的 DNA 片段的正义链(参考图 1)。

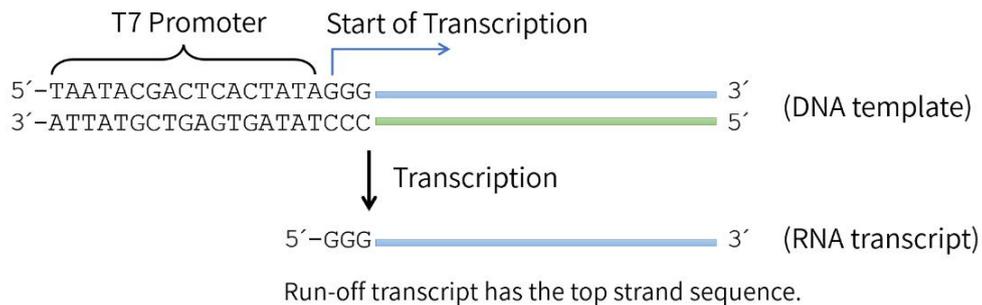


图 1. T7 RNA 聚合酶催化的基于 T7 Promoter 的 RNA 转录反应示意图。其中 T7 Promoter 之前可以有更多的序列。

1.1) 质粒模板 带 T7 启动子的质粒可以作为转录模板，但是环状质粒因为没有有效的终止，转录出的 RNA 产物会出现不同片段长度，为了得到特定长度的 RNA，质粒必须进行线性化处理，线性化的质粒需要确保双链为平末端或编码链 5' 端为突出结构，所以推荐使用 II 类限制性内切酶，注意酶的识别位点不能在目的片段中存在，以保证模板的完整。线性化的质粒建议纯化后作为模板使用，以减少 RNase、蛋白及盐残留对转录反应体系的影响（每个反应建议投入 1 μg 线性化质粒作模板。）

1.2) PCR 产物模板 带 T7 启动子的 PCR 产物也可以作为体外转录模板。PCR 扩增模板时将 T7 启动子序列 (TAATACGACTCACTATAGGG) 加在有义链的上游引物的 5' 端。PCR 产物可以不经纯化直接作为模板，但纯化后能提高 RNA 得率。(PCR 产物为转录模板，电泳确认产物的单一性，建议每个反应体系中投入 0.1-0.5 μg 模板。)

1.3) 合成 DNA 模板 合成的带有 T7 启动子的 DNA 片段也可以作为体外转录的模板。（推荐每个反应体系中投入 0.1-0.5 μg 模板。）

2. RNA 的体外转录

2.1) 解冻必要的试剂盒组分，混匀后快速离心一下，将溶液沉淀至离心管底部。如果需进行多个反应，除模板外可以进行预混和再分装到各个反应管内，同时在配制预混液时需要注意把 RNase Inhibitor 和 T7 RNA Polymerase 在其它组分混合后再最后加入。反应体系通常为



20 μ l, 但可以根据需要按比例扩大反应体系。

2.2) 参考下表设置反应体系。混匀后快速离心一下, 将溶液沉淀至离心管底部。37 $^{\circ}$ C 孵育 2 小时。如果孵育温度在 35-40 $^{\circ}$ C 的范围内, 产量不会受显著影响。

Reagent	Volume	Final Concentration
Nuclease-free Water	(5.5-x) μ l	-
T7 Reaction Buffer (5X)	4 μ l	1X
ATP (100mM)	2 μ l	10mM
GTP (100mM)	2 μ l	10mM
UTP (100mM)	2 μ l	10mM
CTP (100mM)	2 μ l	10mM
Template DNA	x μ l	0.05 μ g/ μ l
RNase Inhibitor	0.5 μ l	-
T7 RNA Polymerase	2 μ l	-
Total Volume	20 μ l	-

2.3) DNase 处理去除 DNA 模板。常规的反应体系通常会产生浓度高达 10 μ g/ μ l 的 RNA, 反应混合物会比较粘稠, 适当稀释反应混合物后, 更容易进行 DNase 处理。如果需要消化去除模板 DNA, 可以在 20 μ l 反应体系中加入 80 μ l Nuclease-free Water 和 1 μ l 本试剂盒提供的 DNase I, 混匀后快速离心一下, 将溶液沉淀至离心管底部。37 $^{\circ}$ C 孵育 15 分钟。

2.4) 转录产物的纯化和凝胶电泳检测。通过酚氯仿抽提后乙醇或异丙醇沉淀 RNA 以纯化转录产物, 或者使用适当的柱纯化方法纯化体外转录获得的 RNA。可以通过常规的 RNA 电泳确认获得的转录产物的长度和纯度。

3. 加帽 RNA 的合成(须自备 Cap Analog)

3.1) 解冻必要的试剂盒组分, 混匀后快速离心一下, 将溶液沉淀至离心管底部。

3.2) 准备浓度为 40mM 的帽类似物(Cap Analog), 如 m⁷(3'-O-methyl)-G(5')ppp(5')G, 也被称为 Anti-reverse cap analog (ARCA)。

3.3) 参考下表, 设置反应体系。

Reagent	Volume	Final Concentration
Nuclease-free Water	(3.1-x) μ l	-
T7 Reaction Buffer (5X)	4 μ l	1X
ATP (100mM)	2 μ l	10mM
UTP (100mM)	2 μ l	10mM
CTP (100mM)	2 μ l	10mM
GTP (100mM)	0.4 μ l	2mM
Cap Analog (40mM)	4 μ l	8mM
Template DNA	x μ l	0.05 μ g/ μ l
RNase Inhibitor	0.5 μ l	-
T7 RNA Polymerase	2 μ l	-
Total Volume	20 μ l	-

3.4) 混匀后快速离心一下, 将溶液沉淀至离心管底部。37 $^{\circ}$ C 孵育 2 小时。

3.5) DNase 处理去除 DNA 模板。在 20 μ l 反应体系中直接加入 1 μ l 本试剂盒提供的 DNase I, 混匀后快速离心一下, 将溶液沉淀至离心管底部。37 $^{\circ}$ C 孵育 15 分钟。

Add: Floor 2, Gate 6, 289#, Minqiang Road, Songjiang District, Shanghai 201612

Tel: +86-21-54460832

Fax: +86-21-54460831

Web: www.synthesisgene.com

E-mail: master@shinegene.org.cn



3.6) 转录产物的纯化和凝胶电泳检测。通过酚氯仿抽提后乙醇或异丙醇沉淀 RNA 以纯化转录产物，或者使用适当的柱纯化方法纯化体外转录获得的 RNA。可以通过常规的 RNA 电泳确认获得的转录产物的长度和纯度。

4. 修饰 RNA 的合成

本试剂盒可以按照如下方案合成生物素、地高辛、FITC 或 Cy3 等标记的 RNA 或带有特殊修饰的 RNA。修饰的 NTP (Biotin-, Digoxigenin-, FITC-, Cy3- or Aminoallyl-NTP) 与常规 NTP 推荐的摩尔比为 1:3。以下反应体系假设使用修饰的 UTP。**注：**如果使用 ψ TP 或 m1 ψ TP，通常直接用于替换 UTP。

4.1) 解冻必要的试剂盒组分，混匀后快速离心一下，将溶液沉淀至离心管底部。

4.2) 参考下表，设置反应体系。

Reagent	Volume	Final Concentration
Nuclease-free Water	(5-x) μ l	-
T7 Reaction Buffer (5X)	4 μ l	1X
ATP (100mM)	2 μ l	10mM
GTP (100mM)	2 μ l	10mM
CTP (100mM)	2 μ l	10mM
UTP (100mM)	1.5 μ l	7.5mM
Modified-UTP (50mM)	1 μ l	2.5mM
Template DNA	x μ l	0.05 μ g/ μ l
RNase Inhibitor	0.5 μ l	-
T7 RNA Polymerase	2 μ l	-
Total Volume	20 μ l	-

4.3) 混匀后快速离心一下，将溶液沉淀至离心管底部。37 $^{\circ}$ C 孵育 2 小时。对于 <100nt 的转录产物，推荐使用 2 μ g 模板，并在 37 $^{\circ}$ C 孵育 4-16 小时。

5. RNA 产物的纯化

通常，RNA 转录产物的小量制备可以通过苯酚/氯仿抽提和乙醇沉淀或使用柱纯化的方法进行纯化。对于 RNA 大量制备的情况，色谱柱通常会更加便捷。对于需要精确控制转录产物长度的情况，建议使用凝胶电泳和切胶回收纯化的方法。采用凝胶过滤这样的柱纯化的方法，也可以实现对转录产物长度的控制。

a. 苯酚/氯仿抽提和乙醇沉淀

苯酚/氯仿提取和乙醇沉淀 RNA 转录产物通常是实验室常规操作去除蛋白质和大多数游离核苷酸的首选方法。

(a) 加入 160 μ l Nuclease-free Water 将反应体积放大到 180 μ l，再加入 20 μ l 3M 醋酸钠(pH5.2) 或 20 μ l 5M 醋酸铵，充分混匀。加入等体积的苯酚/氯仿混合液(1:1)抽提一次(剧烈 Vortex 20-30 秒，随后 14000g 离心 5-10min 取上清)，再用氯仿抽提 1-2 次(每次剧烈 Vortex 20-30 秒，随后 14000g 离心 5-10min 取上清)。

(b) 用双倍体积的无水乙醇沉淀 RNA，在 -20 $^{\circ}$ C 至少孵育 30 分钟。随后 14000g 4 $^{\circ}$ C 离心 5-10min 沉淀 RNA。

(c) 弃上清，用约 500 μ l 预冷的 70%乙醇洗涤沉淀。

(d) 用 50 μ l DEPC 水(DEPC-treated Water)或 0.1mM EDTA 重悬并溶解 RNA，在 -80 $^{\circ}$ C 储存。

b. 柱纯化法



柱纯化可以去除游离的核苷酸、蛋白及盐。

纯化时加入 80 μ l Nuclease-free Water 将反应体系补足至 100 μ l，混匀。由于 RNA 产量较高，为了避免超过离心柱式 RNA 纯化柱的结合能力，需要对纯化柱的载量进行评估，再根据相应的产品说明书纯化 RNA。根据需要，对于超大量的 RNA，也可以考虑使用 FPLC 进行柱纯化。

c. 凝胶回收纯化法

当需要高纯度和特定长度的 RNA 转录产物时，建议凝胶电泳后切胶回收纯化。凝胶电泳可以根据转录产物的长度选择琼脂糖凝胶和聚丙烯酰胺凝胶。

6. RNA 转录产物的分析和检测

a. 紫外吸收定量分析

通过测定 A260 计算体外转录获得的 RNA 的量，通过 A260/280 和 A260/A230 来判断获得的 RNA 的纯度。对于单链 RNA，1 OD 对应的 RNA 浓度为 40 μ g/ml。

b. 转录产物的凝胶电泳分析

为了评估转录产物的长度，完整性和产量，可以使用适当的变性琼脂糖凝胶或变性聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分析。大于 200nt 的转录产物可以使用变性琼脂糖凝胶进行电泳分析。小于 200nt 的转录产物可以使用变性聚丙烯酰胺凝胶 (5-15%) 进行电泳分析。凝胶电泳都应在变性条件下进行，以最大程度地减少 RNA 二级结构对电泳迁移率的影响。

(1) 变性凝胶的制备

1) 例如 1% 变性琼脂糖凝胶的配制：称取 1g 琼脂糖加入 72ml Nuclease-free Water 中，加热溶化后，加入 10ml 10X MOPS Buffer。待琼脂糖冷却至 50 $^{\circ}$ C -60 $^{\circ}$ C，在通风橱中加入 18ml 甲醛(37%)，混合均匀，倒胶。10X MOPS Buffer: 0.4M MOPS (pH7.0), 0.1M Sodium Acetate, 10mM EDTA。

2) 例如 15% 变性 PAGE/尿素凝胶的配制：称取 4.2g 尿素溶于 4.4ml Nuclease-free Water 中，使尿素完全溶解。随后加入 1.5ml 40% Acr/Bis Solution (丙烯酰胺:甲叉双丙烯酰胺=19:1) 和 1ml 10X TBE Buffer。使用前，加入 100 μ l 10% APS(过硫酸铵)和 10 μ l TEMED，补足 Nuclease-free Water 至终体积为 10ml。混合均匀，倒胶。10X TBE Buffer: 0.9 M Tris Base, 0.9M Boric Acid, 20mM EDTA。

(2) RNA 的凝胶电泳

1) 将 0.2-1 μ g RNA 样品与 RNA Loading Buffer 混合。

2) 通过在 65 $^{\circ}$ C-70 $^{\circ}$ C 下加热 5-10 分钟使 RNA 样品和 RNA Marker 样品变性。

3) 在上样之前适当混匀后快速离心一下，以把液体收集到管底。

4) 通过用 NA-Red、NA-Green 或 NA-Green Plus_等核酸染料对凝胶染色后，使用凝胶成像系统进行拍照观察。

【常见问题】

1. 长链 RNA 转录产物的产量明显偏低。

如果转录产物是长链 RNA (>0.3kb)，但其产量明显低于预期，则可能是 DNA 模板里包含的污染物抑制了 RNA 聚合酶的活性，或是 DNA 模板的浓度不正确，或者是 DNA 模板的 3'端为 3'突出的末端。

可以尝试以下方案解决：重新纯化 DNA 模板，建议用酚氯/仿抽提，并确保把残留的苯酚去除干净；对模板的浓度以及完整性进行确定；延长 37 $^{\circ}$ C 反应时间；增加模板的用量；排除 DNA 模板的 3'端为 3'突出的末端。

2. 短链转录产物产量明显偏低。



短链转录产物(<0.3kb)可以通过增加反应时间和增加模板的量来提高产量。反应时间可以延长至 16 小时或者使用 2 μ g 以上的模板将会有助于获得更多的转录产物。此外，线性化使用的内切酶需要确保不会产生 3'端为 3'突出的末端，这样很可能会导致转录产物的产量明显降低。

3. RNA 转录产物出现明显降解。

如果 RNA 在变性的琼脂糖凝胶或聚丙烯酰胺凝胶电泳时发现有明显的降解现象，提示 DNA 模板或操作过程中可能被 RNase 污染了。被 RNase 污染的 DNA 模板会影响合成的 RNA 的长度和产量，导致长度变短和产量下降。如果模板 DNA 被 RNase 污染，需要对模板 DNA 进行苯酚/氯仿抽提，然后用乙醇沉淀，最后将 DNA 溶解于 Nuclease-free Water 中。同时操作过程中需要严格按照 RNA 的操作要求进行，避免 RNase 污染。个别情况也会出现 DNA 模板降解的情况，此时需要通过电泳分析排除相应的可能性。

4. 出现比预期更长的 RNA 转录产物。

如果在变性凝胶中出现比预期更长的 RNA 转录产物，很可能是质粒 DNA 模板未被完全线性化。即使是很小量的未被充分消化的环状质粒，也能产生大量的长转录产物。转录反应前需检查模板 DNA 是否被充分线性化，如果确认含未线性化的质粒，需要再次进行限制性内切酶消化直至充分线性化，或者进行凝胶电泳切胶回收线性化的模板 DNA。当 RNA 转录产物由于存在较强的二级结构而变性不充分时，也可能观察到较大的条带。

5. 出现比预期更短的 RNA 转录产物。

如果在变性凝胶电泳时观察到比预期更短的 RNA 转录产物，可能是由于 RNA 转录酶过早终止。一些类似于 T7 RNA Polymerase 终止信号的序列会导致 RNA 转录反应的提前终止。可以通过降低转录温度(如 30 $^{\circ}$ C)以增加长转录产物的比例，但总产量会降低。对于富含 GC 或有二级结构的模板，在 42 $^{\circ}$ C 下孵育会增加长转录产物的产量。当 RNA 转录产物由于存在较强的二级结构而变性不充分时，也可能观察到较短的条带。



上海闪晶分子生物科技有限公司

地址：上海市松江区新桥镇民强路 289 号 6 号门 2 楼

邮编：201612

联系：市场部

电话：021-54460832 800-988-1995

