

T7 High Yield RNA Synthesis Kit

REF: EG24104S

储运条件

-20°C

产品组成

组分	规格 (50 rxns)
T7 Enzyme Mix	100 µl
10× T7 RNA Pol Buffer	100 µl
ATP (100mM)	100 µl
UTP (100mM)	100 µl
GTP (100mM)	100 µl
CTP (100mM)	100 µl
Control Template (0.5 µg/µl)	10 µl
DNase I, RNase-free (1 U/µl)	100 µl
Nuclease-Free Water	1 ml

产品简介

T7 High Yield RNA Synthesis Kit 是一种使用 T7 RNA 聚合酶，以带有 T7 启动子的 DNA 为模板，通过体外转录大量合成 RNA 的试剂盒，适用于长链和短链转录本。本品提供的 T7 Enzyme Mix 中已经预混了 RNase 抑制剂与无机焦磷酸酶，而 DNase I, RNase-free 用于转录反应结束后清除模板 DNA。使用本品以 1 µg 线性化双链 DNA 模板可以转录获得至少 150 µg 以上的 RNA。通过转录合成的 RNA 可用于多种下游应用，如体外翻译、RNA 结构和功能研究、RNase 保护、探针杂交、RNA 干扰等。

转录方案

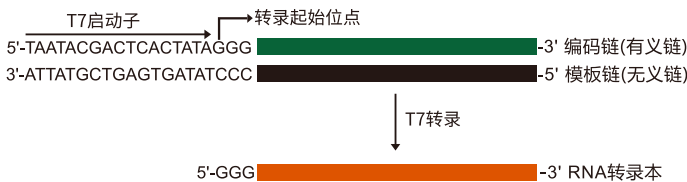


图 1. 非共转录 T7 启动子 RNA 转录方案

使用方法

1. DNA 模板制备

带有 T7 启动子的线性化质粒或 PCR 扩增产物都可以作为体外转录模板，模板可以用 TE 缓冲液或 Nuclease-Free Water 溶解。

T7 启动子序列: TAATACGACTCACTATAN*

注: N* 为 RNA 转录的第一个碱基，一般为 G，若进行共转录由帽子类似物决定。

(1) 质粒模板

将目的 DNA 插入含有 T7 启动子的质粒载体中，然后用限制酶进行处理，待完全线性化后进行纯化。

注 1: 由于终止子不能保证转录 100% 终止，环状质粒会转录出不同长度的 RNA 产物。为了得到特定长度的 RNA，质粒必须完全线性化。

注 2: 质粒线性化所选限制酶的酶切位点需要紧邻编码链下游，且在编码链中无识别位点。选择的限制酶要能形成 5' 突出末端或者平滑末端。

注 3: 为了避免蛋白及盐离子等对转录体系的影响，线性化质粒建议纯化后再作为模板进行体外转录。

注 4: 质粒 DNA 抽提过程中引入的 RNase A 残留会显著影响转录 RNA 的质量，建议使用 A260/A280 为 1.8~2.0 的高纯度 RNase-free 模板。

(2) PCR 产物模板

带 T7 启动子的 PCR 产物可以作为体外转录模板。首先将 T7 启动子序列加在编码链上游引物的 5' 端，然后在高保真酶的作用下扩增含 T7 启动子的 DNA 模板，随后进行转录。PCR 产物可以不经纯化直接作为模板，但纯化后 RNA 收率会更高。

注 1: PCR 产物作为模板，必须电泳确认产物的特异性及浓度，建议 20 µl 反应体系投入 2~5 µl PCR 产物。

注 2: 为了得到更多高品质的 RNA，推荐 PCR 产物纯化之后再作为模板进行体外转录。

2. 体外转录

(1) 根据所需产物类型选择下面三个反应体系进行反应溶液加样。

① 标准体外转录体系

在冰上配制如下反应体系:

试剂	体积	终浓度
10× T7 RNA Pol Buffer	2 µl	1×
T7 Enzyme Mix	2 µl	-
Template DNA	1 µg	50 ng/µl
ATP/CTP/GTP/UTP (100 mM each) ^{a,b}	2 µl each	10 mM each
Nuclease-Free Water	up to 20 µl	-

a. 建议先加入 Nuclease-Free Water, 然后再加入 ATP/CTP/GTP/UTP。

b. 可以用同样摩尔浓度的修饰 NTP 替代相应的未修饰 NTP。修饰 UTP 可参考使用 N⁶-Methyl-Pseudo-UTP(100mM) (货号: EG21921) 和 Pseudo-UTP(100mM) (货号: EG21922)。

② 加帽 RNA 共转录体系

在冰上配制如下反应体系:

试剂	体积	终浓度
10× T7 RNA Pol Buffer	2 µl	1×
T7 Enzyme Mix	2 µl	-
Template DNA	1 µg	50 ng/µl
ATP/CTP/GTP/UTP (100 mM each)	2 µl each	10 mM each
Cap1 Analogue (100 mM) ^c	1.6 µl	8 mM
Nuclease-Free Water	up to 20 µl	-

c. 帽子类似物与每种 NTP 的摩尔浓度之比应为 4 : 5, 该摩尔比适用于 CleanCap 系列帽子类似物。帽子类似物可参考使用 Cap1 analogue AG (货号: EG22909)。若使用其它结构的帽子类似物, 请根据帽子类似物的说明书设定帽子类似物与 GTP 的合理比例, 可根据加帽效率调整比例, 但两者终浓度之和控制在 10 mM 为宜。

③ 非放射性标记 RNA 体外转录体系

试剂	体积	终浓度
10× T7 RNA Pol Buffer	2 µl	1×
T7 Enzyme Mix	2 µl	-
Template DNA	1 µg	50 ng/µl
ATP/CTP/GTP (100 mM each)	2 µl each	10 mM each
UTP (100 mM)	1.5 µl	7.5 mM
修饰 UTP (50 mM) ^d	1 µl	2.5 mM
Nuclease-Free Water	up to 20 µl	-

d. 本体系适用生物素修饰 UTP、荧光素修饰 UTP、地高辛修饰 UTP 或者氨基烯丙基修饰 UTP, 使用修饰 UTP 转录产量会比未修饰 UTP 转录产量偏低。

注 1: 不同模板序列的转录效率差异较大, 初次实验可先按照建议加入量进行, 然后再摸索优化最适体系, 模板量可在 0.5 µg~2 µg 的范围进行调整。

(2) 充分混匀并瞬间后, 37°C 温育 2 h。若转录产物长度 <100 nt, 可延长反应时间至 3~16 h。

(3) 反应结束后, 向产物中按照每 μg Template DNA 加入 2 μl DNase I, RNase-free 的比例, 37°C 孵育 15 min 以去除 DNA 模板。

(4) 转录后的 RNA 推荐用磁珠或者柱纯化, 也可以采用酚 / 氯仿或者氯化锂纯化。纯化后的 RNA 可以进行下游实验或者储存于 -80°C 备用。

3. 对照模板转录 (T 包装不含)

对照模板是一个含有 T7 启动子的线性 DNA 片段, 转录产物大小约 4000 nt。在推荐的标准体外转录反应体系中, 1 μg 对照模板 DNA 在 37°C 下反应 2 h 至少可获得 150 μg 以上的 RNA。

4. 产物纯化

转录后的 RNA 可以选用磁珠法进行纯化, 也可以采用柱纯化、酚 / 氯仿纯化法或氯化锂沉淀法等, 以去除蛋白、游离的核苷酸。纯化后的 RNA 经电泳检测后可进行下游实验或存储于 -80°C。

(1) 磁珠纯化法

按照磁珠说明书进行纯化操作。

(2) 柱纯化法

纯化前加入 80 μl Nuclease-Free Water 将产物稀释至 100 μl , 再按纯化柱说明书进行纯化操作。

(3) 酚 / 氯仿纯化法

① 向 20 μl 反应混合物中, 加入 115 μl Nuclease-Free Water 和 15 μl 3 M 乙酸钠 (pH5.2), 混合均匀。

② 加入等体积 (150 μl) 的酚 / 氯仿 (1:1) 混合液抽提一次, 室温以最大转速 (≥ 12000 rpm) 离心 5 min, 将上层水相溶液转移至新的 RNase-free EP 管中。

注: 转移上清时请勿吸到中间层。

③ 再加入等体积的氯仿抽提 2 次, 收集上清, 并转移至新的 RNase-free EP 管中。

④ 加入 2 倍体积的无水乙醇沉淀 RNA。混合均匀后置于 -20°C 至少 30 min, 以最大转速 (≥ 12000 rpm), 4°C 离心 15 min, 收集沉淀。

⑤ 加入 500 μl 冰预冷的 70% 乙醇洗涤 RNA 沉淀, 以最大转速 (≥ 12000 rpm), 4°C 离心 5 min, 收集沉淀。

⑥ 用 20 μl Nuclease-Free Water 溶解 RNA 沉淀。纯化后的 RNA 溶液于 -80°C 保存。

(4) 氯化锂沉淀法

采用氯化锂沉淀法, RNA 长度至少满足 100 nt 以上, 且浓度不能低于 100 ng/ μl 。

① 向 20 μl 反应混合物中, 加入 30 μl Nuclease-Free Water 和 30 μl 7.5 M 氯化锂。

② 混合均匀后, 置于 -20°C 至少 30 min, 以最大转速 (≥ 12000 rpm), 4°C 离心 15 min, 收集沉淀。

③ 加入 500 μl 冰预冷的 70% 乙醇洗涤 RNA 沉淀, 以最大转速 (≥ 12000 rpm), 4°C 离心 5 min, 收集沉淀。

④ 用 20 μl Nuclease-Free Water 溶解 RNA 沉淀。纯化后的 RNA 溶液于 -80°C 保存。

5. RNA 定量

(1) 紫外吸收法: 游离的 NTP 等会严重影响定量的准确性, 采用此方法前请先进行 RNA 纯化。

(2) 染料法: 可使用 RNA 特异荧光染料或相关试剂盒进行 RNA 定量, 可以对纯化或者未纯化的反应产物中的 RNA 进行定量。

6. RNA 检测

(1) 凝胶电泳法

为了评估转录本的长度及质量, 转录产物应选择合适的非变性或变性琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳检测。变性电泳下可减少 RNA 的二级结构形成, 通常 RNA 以正确大小的单个条带迁移。

转录本长度	推荐使用电泳凝胶
>500 nt	1% 琼脂糖凝胶
100~500 nt	2% 琼脂糖凝胶或 4~5% 尿素变性聚丙烯酰胺凝胶
50~100 nt	10%~15% 尿素变性聚丙烯酰胺凝胶
<50 nt	20% 尿素变性聚丙烯酰胺凝胶

注 1: 电泳缓冲液和凝胶均需现配现用, 使用尿素变性聚丙烯酰胺凝胶电泳时推荐使用 0.5 \times TBE (货号: CP17202) 电泳缓冲液电泳。

注 2: 转录完成的 RNA 可用 Nuclease-Free Water 稀释后电泳, 电泳上样量推荐 0.05~1 μg 。

注 3: 加完 RNA Loading Buffer 后的样品可于 65°C 处理 5~10 min 以减少 RNA 二级结构形成。

注 4: 可使用 Safe Red 核酸染料 (货号: CP18106) 观察 RNA 电泳条带, 聚丙烯酰胺凝胶电泳推荐用泡染法观察条带。

(2) 毛细管电泳法

毛细管电泳法可数字化的精确评估 RNA 样本的完整性、纯度或降解程度。与凝胶法相比, 此法所需 RNA 样本量低, 灵敏度高。

常见问题

问题描述	原因	解决方法
转录产物产量低	实验模板中可能有抑制反应的组分或模板纯度较差或模板浓度不正确	若对照组产量正常, 请重新纯化模板并确定模板浓度及其特异性。若对照组产量低, 请咨询本公司技术支持。
短片段转录产物产量低	转录起始片段短可能会抑制反应	转录产物 100 nt 时, 建议延长反应时间或者增加模板量至 2 μg 。
RNA 产物片段小于预期	模板序列中可能包含类似于 T7 RNA 聚合酶的终止序列	建议降低反应温度至 30°C 可能会增加全长转录本的比例, 但是产量会下降。
	可能模板中 GC 含量高或形成二级结构	建议提高反应温度至 42°C 或使用单链结合蛋白提高产量和长度。
RNA 产物片段大于预期	质粒模板 DNA 可能酶切不完全	建议质粒模板 DNA 继续进行酶切或者重新优化质粒模板 DNA 制备酶切反应体系。
	RNA 可能存在更强的二级结构而未完全变性	增加变性剂的浓度或加完 RNA Loading Buffer 后样品变性温度可提高至 70°C。
电泳拖尾	实验过程可能污染 RNase	建议单独的转录反应操作区域、专用的 RNA 试剂及移液器; 实验过程中佩戴口罩和手套, 并经常更换手套; 使用 RNase-free 耗材; 试剂不使用时请盖好盖子; 反应过程中保证试管紧密封闭。
	模板可能有 RNase 污染	模板存在 RNase 污染也可能造成 RNA 产物片段小于预期, 建议重新纯化模板 DNA 后用 Nuclease-Free Water 或 DEPC 处理水溶解。