

产品组分

组分名称	组分编号	50 RXN
T7 Enzyme Mix	RM30524	100 μ L
10X T7 Transcription Buffer	RM30525	100 μ L
ATP (100 mM)	RM30526	100 μ L
UTP (100 mM)	RM30527	100 μ L
GTP (100 mM)	RM30528	100 μ L
CTP (100 mM)	RM30529	100 μ L
Control Template (0.5 μ g/ μ L)	RM30530	10 μ L
DNase I, RNase-free	RM30531	100 μ L
Nuclease-Free Water	RM30532	1 mL

产品说明

T7 High Yield RNA Synthesis Kit 是一款优化的 RNA 合成试剂盒，转录方案如图 1 所示，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。试剂盒中的 T7 Enzyme Mix 包含 RNase 抑制剂与无机焦磷酸酶，投入 1 μ g 的 DNA 模板可以获得至少 150 μ g 的 RNA，适用于长链和短链转录本合成。制备的 RNA 可用于体外翻译、RNA 结构和功能研究、RNase 保护、探针杂交、RNA 干扰等下游应用。



图1 体外RNA转录方案

保存条件

-20°C

适用范围

体外 RNA 合成

注意事项

- 1、避免 RNase 污染：使用本试剂盒时，请穿戴实验服、一次性乳胶手套、一次性口罩、使用 RNase-free 耗材。
- 2、注意模板的选择：建议纯化后再作为模板体外转录，以避免 RNase、蛋白、RNA 及盐残留对体系的影响。
- 3、如果需要合成加帽的 RNA，须自备 Cap Analog。如果需要合成生物素、地高辛、FITC 等标记的 RNA 或带有特殊修饰的 RNA，相应的修饰 NTP 需要自备。

操作步骤

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 Nuclease-Free Water 溶解,推荐浓度 0.5-1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。

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。

1.1 质粒模板

带 T7 启动子的质粒可以作为转录模板。质粒的线性化和纯度会影响转录的产量及 RNA 的完整性,环状质粒由于没有有效的终止,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,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:线性化质粒建议纯化后再作为模板进行体外转录,以避免酶、蛋白及盐离子等对转录体系的影响。

1.2 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 回收率会更高,推荐 PCR 产物纯化之后再作为模板进行体外转录。

注:PCR 产物作为模板,必须电泳确认产物的单一性及浓度,建议 20 μL 反应体系投入 2-5 μL PCR 产物。

2. 体外转录

2.1 根据所需产物类型,选择下面三个反应体系配制溶液,模板加入量可在 0.5-2 μg 的范围进行调整,初次实验模板量可先按照 1 μg 加入。

注:冰上配制反应体系,配制时建议先加入 Nuclease-Free Water,然后再加入 ATP/CTP/GTP/UTP。

1) 标准体外转录体系

组分	体积	终浓度
10X T7 Transcription Buffer	2 μL	1X
ATP (100 mM)	2 μL	10 mM
CTP (100 mM)	2 μL	10 mM
GTP (100 mM)	2 μL	10 mM
UTP (100 mM)	2 μL	10 mM
T7 Enzyme Mix	2 μL	/
Template DNA	x μL	50 ng/ μL
Nuclease-Free Water	up to 20 μL	/

2) 修饰 RNA 体外转录体系

试剂	体积	终浓度
10X T7 Transcription Buffer	2 μ L	1X
ATP (100 mM)	2 μ L	10 mM
CTP (100 mM)	2 μ L	10 mM
GTP (100 mM)	2 μ L	10 mM
UTP (100 mM)	1.5 μ L	7.5 mM
Modified UTP (50 mM)*	1 μ L	2.5 mM
T7 Enzyme Mix	2 μ L	/
Template DNA	x μ L	50 ng/ μ L
Nuclease-Free Water	up to 20 μ L	/

* 注：本体系适用生物素/荧光素/地高辛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。本体系以修饰 UTP 为例，若使用其他的修饰 NTP 底物，请参照 UTP 与 Modified UTP 比例配制反应体系。

3) 加帽 RNA 共转录体系

试剂	体积	终浓度
10X T7 Transcription Buffer	2 μ L	1X
ATP (100 mM)	2 μ L	10 mM
CTP (100 mM)	2 μ L	10 mM
UTP (100 mM)	2 μ L	10 mM
GTP (100 mM)	0.4 μ L	2 mM
Cap Analog (40 mM)*	4 μ L	8 mM
T7 Enzyme Mix	2 μ L	/
Template DNA	1 μ g	50 ng/ μ L
Nuclease-Free Water	up to 20 μ L	/

* 注：本体系以帽子类似物 m⁷(3'-O-methyl)-G(5')ppp(5')G（又称为 ARCA）为例，若使用其他的帽子结构，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。

2.2 充分混匀并瞬离后，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。

2.3 反应结束后，向产物中按照每 μ g Template DNA 加入 2 μ L DNase I, RNase-free 的比例，37°C孵育 15 min 以去除 DNA 模板。

2.4 转录后的 RNA 纯化后可以进行下游实验或者储存于-80°C备用。

3. 对照模板转录

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 的 RNA。

4. 产物纯化

转录后的 RNA 可以通过酚/氯仿纯化法、柱纯化、磁珠法和氯化锂沉淀法等进行纯化，以去除蛋白、游离的核苷酸。对产物片段大小要求较高则推荐使用切胶回收纯化。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) 酚/氯仿纯化法

酚/氯仿抽提可去除蛋白和大部分游离核苷酸，具体操作如下：

- 加入 115 μL Nuclease-Free Water 将产物稀释至 135 μL ，加入 15 μL 3 M 乙酸钠 (pH 5.2)，混合均匀。
- 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。
- 加入等体积的氯仿抽提 2 次，收集上层水相，并转移至新的 RNase-free EP 管中。
- 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。
- 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。
- 用 20 μL Nuclease-Free Water 溶解 RNA 沉淀。纯化后的 RNA 溶液于 -80°C 保存。

2) 柱纯化法

柱纯化可以去除蛋白和游离核苷酸，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。

注：由于 RNA 产量较高，为了避免超过 RNA 纯化柱的结合能力，需要对纯化柱的载量进行评估。

3) 磁珠纯化法

按照磁珠说明书进行纯化操作。

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 。

- 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。
- 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。
- 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。
- 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 定量与检测

RNA 定量

- 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。
- 染料法：可使用 RNA 特异荧光染料或相关试剂盒进行 RNA 定量，游离核苷酸不会影响定量，可以对纯化或者未纯化的反应产物中的 RNA 进行定量。

RNA 大小和质量检测

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。

注：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 。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。

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。

常见问题与解决方案

1. 转录产物产量低

模板与产量密切相关，若对照组产量正常但实验组产量低，可能是由于实验模板中有抑制反应的成分，或模板纯度较差，浓度不准等原因。建议重新纯化模板；对模板的浓度和完整性进行确认；延长 37°C 反应时间；加大模板投入量。

2. 短片段转录产物产量低

转录起始片段短会抑制反应，转录产物小于 100 nt 时，建议延长反应时间或增加模板量至 2 μg 。

3. RNA 产物片段小于预期

- ① 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。
- ② 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（SSB）提高转录效率。
- ③ 出现产物条带与预期不一致，请使用变性胶检测产物。

4. RNA 产物片段大于预期

- ① 质粒模板 DNA 没有完全线性化，建议质粒模板 DNA 继续酶切至充分线性化。
- ② RNA 存在未完全变性的二级结构，充分变性，使用变性胶检测产物。

5. 产物电泳拖尾现象

可能是 DNA 模板或操作过程中被 RNase 污染，导致 RNA 转录产物出现降解。体系中的 RNase 抑制剂只能抑制痕量的 RNase 残留，建议重新纯化模板 DNA 后用 Nuclease-Free Water 或 DEPC 处理水溶解，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，所有试剂均用 Nuclease-Free Water 配制。