

T7 High Yield RNA Synthesis Kit for Co-transcription(low dsRNA)

产品简介

T7 High Yield RNA Synthesis Kit for Co-transcription(low dsRNA)用于共转录加帽体系，试剂盒进行了共转录反应体系的优化，使用的 T7 RNA 聚合酶是对野生型 T7 RNA 聚合酶进行了改造优化，突变得到的可以大幅度降低 dsRNA 含量的 T7 RNA 聚合酶，以含有 T7 启动子序列的线型双链 DNA 为模板，NTPs 以及帽子类似物为底物，对启动子下游的 DNA 序列进行转录，高效合成带有 Cap1 结构的单链 RNA。转录时可在底物中加入修饰的核苷酸，制备生物素或染料标记的 RNA。本试剂盒可以合成长转录本以及短转录本，以 1 µg 的模板投入量可以产生 100-200 µg 的 RNA。该试剂盒使用共转录加帽策略来产生 Cap1 RNA。此外，UTP 也被 N¹-Me-Pseudo UTP 取代以降低免疫原性。转录合成的 RNA 可用于诸如 RNA 结构与功能研究、RNA 酶保护、探针杂交、RNAi、显微注射及体外翻译等多方面的下游应用。

产品信息

货号	10634ES10 / 10634ES50 / 10634ES60 / 10634ES70
规格	10 T / 50 T / 100 T / 500 T

组分信息

组分编号	组分名称	10634ES10	10634ES50	10634ES60	10634ES70
10634-A	T7 RNA Polymerase Mix(low dsRNA)	20 µL	100 µL	200 µL	1 mL
10634-B	10×Transcription Buffer	20 µL	100 µL	200 µL	1 mL
10634-C	ATP (100mM)	20 µL	100 µL	200 µL	1 mL
10634-D	CTP (100mM)	20 µL	100 µL	200 µL	1 mL
10634-E	GTP (100mM)	20 µL	100 µL	200 µL	1 mL
10634-F	N ¹ -Me-Pseudo UTP (100mM)	20 µL	100 µL	200 µL	1 mL
10634-G	Control DNA Template (500ng/µL)	5 µL	10 µL	20 µL	100 µL
10634-H	DNase I (2 U/µL)	10 µL	50 µL	100 µL	500 µL
10634-I	Cap1 Analog (100mM)	20 µL	100 µL	200 µL	1 mL
10634-J	Lithium chloride solution	300 µL	1.5 mL	3 mL	15 mL
10634-K	RNase-free ddH ₂ O	500 µL	2.5 mL	5 mL	25 mL

储存条件

-25~-15℃保存，有效期 1 年。

使用说明

使用说明正文

1. DNA 模板制备

带有双链 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 RNase free H₂O 溶解。

T7 启动子序列：TAATACGACTCACTATAA*GG （注：A*为 RNA 转录的第一个碱基）

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：

- 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需要在启动子区域右侧、插入 DNA 片段的下游，且在插入 DNA 片段中无识别位点。选择的限制酶要能形成 5' 突出或者平滑末端。
- 为了避免蛋白及盐离子等对体系的影响，质粒线性化后建议纯化后再作为模板进行体外转录。

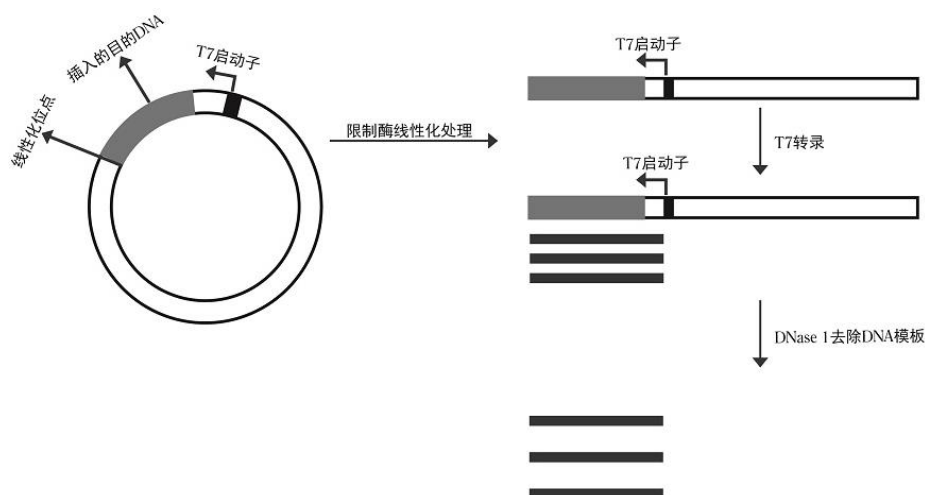


图 1：线性化质粒为模板体外转录过程

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(TAATACGA CTCACTATAAGG)加在有义链的上游引物的 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，但纯化后会得到更高的 RNA 产出。

注：

- PCR 产物作为模板，必须电泳确认产物的特异性及浓度，建议 20μL 反应体系投入 2-5μL PCR 产物。
- 为了得到更多高品质的 RNA，推荐 PCR 产物胶回收之后再作为模板进行体外转录。

2. RNA 体外转录

1) 试剂解冻

将 T7 RNA Polymerase Mix 短暂离心，置于冰上。将除 T7 RNA Polymerase Mix 外的其他所需组分解冻并振荡混匀，短暂离心收集于管底，10× Transcription Buffer 置于室温，其他组分置于冰上，备用。

2) 室温装配转录反应

表 1 共转录 RNA 配制体系

组分	体积 (μL)	终浓度
RNase free H ₂ O	Up to 20	-
10× Transcription Buffer	2	1×
CTP / GTP/ ATP/ N ¹ -Me-Pseudo UTP (100 mM each)	2 each	10 mM each
Cap1 Analog (100mM)	2	10 mM
模板 DNA	1 μg	-
T7 RNA Polymerase Mix(low dsRNA)	2	-

注：

- a. 反应于室温配置。由于 10×Transcription Buffer 中含有亚精胺，低温下亚精胺浓度过高会引起 DNA 模板沉淀。
- b. 短转录本 (<100nt)，模板可使用 2ug，转录时间增至 4-8 个小时。
- c. 长转录本 (>1000nt)，建议使用质粒线性化模板进行转录。
- d. 建议在 PCR 仪中进行反应，热盖打开，防止长时间导致反应液蒸发。
- e. 反应产物可能有白色沉淀。这是反应过程中游离的焦磷酸与反应液中的镁离子形成焦磷酸镁，不影响后续实验。如想去除，添加 EDTA 即可消失。添加 EDTA 如果影响后续实验，也可以离心回收上清。
- f. 使用试剂、容器等无 RNase 污染。

3) 37°C 孵育 2-3 个小时

将上述反应液混合均匀，短暂离心至管底，37°C 孵育 2-3 个小时。若转录本长度小于 100nt，增加反应时间至 4-8 个小时。

4) DNase I 处理 (可选)

反应完成后，每管加入 1 μL DNase I，37°C 孵育 15min 以去除模板 DNA。

3. 产物纯化

转录后的 RNA 可以使用氯化锂沉淀法，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。

采用氯化锂沉淀法，RNA 长度要大于 300nt，且浓度不能低于 100ng/μL。

- a. 向 20μL 反应混合物中，加入 30μL RNase free H₂O 和 30μL 氯化锂。
- b. 混合均匀后，置于 -20°C 至少 30min，以最大转速，4°C 离心 15min，收集沉淀。
- c. 加入 500μL 冰预冷的 70%乙醇洗涤 RNA 沉淀。
- d. 用 20μL RNase free H₂O 溶解 RNA 沉淀。纯化后的 RNA 溶液于 -80°C 保存。

4. RNA 定量

1) 紫外吸收法

游离核苷酸会影响定量的准确性，采用此方法前请先进行 RNA 纯化。然后通过测定产物的 A260 读数来确定 RNA 的产量。对于单链 RNA，1 A260 相当于 40μg/mL，所以 RNA 的产量可以如下计算： $A_{260} \times \text{稀释倍数} \times 40 = \mu\text{g/mL RNA}$

2) 染料法

用 RiboGreen 染料进行 RNA 定量，游离核苷酸不会影响定量，可以对纯化或未纯化的反应产物中的 RNA 进行准确定量。

5. RNA 大小及质量检测

1) 琼脂糖电泳法

为了确定 RNA 的大小，完整度以及质量，需要进行琼脂糖凝胶电泳或聚丙烯酰胺凝胶电泳进行检测。

2) Agilent Bioanalyzer 检测法

可以用来评估 RNA 完整度及质量，它仅需要少量的 RNA 进行分析，高品质的 RNA 在电图上应呈现明显且锐利的峰。

注意事项

1. 本产品仅作科研用途。
2. 为了您的安全和健康，请穿实验服并佩戴一次性手套操作。
3. 反应体系中须严格注意不要混入 RNase。
4. 实验器材（如：枪头、产品管等）注意严格使用 RNase Free 用品。