T7 High Yield RNA Transcription Kit (N^1-Me-Pseudo UTP)

DD4202

Vazyme

使用说明书

Version 24.1

Vazyme

目录 Contents

01/产品概述 …… 02
02/产品组分 …… 02
03/保存条件 …… 02
04/产品用途 …… 02
05/自备材料 …… 02
06/实验流程 …… 03
06-1/模板制备 …… 03
06-2/体外转录 …… 03
06-3/产物纯化 …… 04
06-4/RNA定量 …… 04
07/注意事项 …… 05
08/常见问题及解决方案 …… 05

01/产品概述

T7 High Yield RNA Transcription Kit(N^1-Me-Pseudo UTP)进行了转录反应体系的优化，使用户能够通过体外转录反应高效地获得大量N^1-Me-Pseudo UTP 修饰的RNA产物。修饰核苷酸(N^1-Me-Pseudo UTP)的添加可以减少宿主细胞的免疫反应。该试剂盒使用T7 RNA聚合酶，以含有T7启动子序列的线性双链DNA为模板，NTPs为底物对启动子下游DNA序列进行转录，获得单链RNA。本试剂盒也能够以不同修饰核苷酸为底物产生染料、生物素或者放射性标记的RNA；添加帽子结构或者帽子类似物结构产生加帽的RNA。

本试剂盒一个反应(20 μl体系)能够获得150 - 200 μg RNA产物，并可放大用于产生毫克级别RNA。转录合成的RNA可用于如RNA结构与功能研究、RNA酶保护、探针杂交、RNAi等应用，也可通过牛痘病毒加帽系统(Vazyme #DD4109)和2'-O-Methyltransferase(Vazyme #DD4110)加帽，E.coli Poly(A)Polymerase(Vazyme #DD4111)加尾产生mRNA，用于体外翻译、转染、显微注射或其他下游应用。

02/产品组分

组 分	DD4202-01 (50 rxns)	DD4202-02 (100 rxns)
T7 RNA Polymerase Mix	100 μl	200 μl
10 × Transcription Buffer	100 μl	200 μl
N^1-Me-Pseudo UTP(100 mM)	100 μl	200 μl
ATP Solution (100 mM)	100 μl	200 μl
CTP Solution (100 mM)	100 μl	200 μl
GTP Solution (100 mM)	100 μl	200 μl
DNase I (1 U/μl)	50 μl	100 μl
Control Template (0.5 μg/μl)	10 μl	20 μl
RNase-free ddH_2O	1 ml	2 ml

03/保存条件

-30 ~ -15℃保存，≤0℃运输

04/产品用途

体外合成单链RNA

05/自备材料

模板：带T7启动子序列的线性化质粒、PCR产物或者合成的DNA片段。

纯化：苯酚、氯仿、乙酸钠、乙醇；或氯化锂、EDTA、乙醇；或RNA纯化磁珠；或RNA纯化柱。

其他：修饰核苷酸、帽子结构或帽子类似结构。

06/实验流程

06-1/模板制备

带有双链T7启动子的线性化质粒、PCR产物或者合成的DNA片段都可以作为T7 High Yield RNA Transcription Kit(N^1-Me-Pseudo UTP)体外转录模板，模板可用TE缓冲液或RNase-free ddH_2O溶解。

1. 质粒模板

   带T7启动子和GG起始序列的线性化质粒可以作为转录模板，质粒的线性化和纯度会影响转录RNA产物的产量及完整性。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，线性化的质粒请确保双链为平末端或编码链5'端突出末端。每个反应建议投入1 μg模板。

   ▲ 质粒线性化后，建议纯化后再作为模板体外共转录，避免RNase、蛋白、RNA 及盐残留对体系的影响。

2. PCR产物模板

   带T7启动子和GG起始序列的PCR产物可以作为转录模板。PCR扩增模板时将T7启动子(TAATACGACTCACTATAGGG)加在非模板链的上游引物的5'端。PCR产物可以不经纯化直接作为模板，但纯化后会得到更高的RNA产出。

   ▲ PCR产物为转录模板，需电泳确认产物的单一性，建议每个反应体系中投入0.3 - 2 μg模板。

3. 合成的DNA模板

   合成的带有T7启动子和GG起始序列的DNA片段也可以作为转录的模板。

   ▲ 推荐每个反应体系中投入0.3 - 2 μg模板。

06-2/体外转录

1. 将除T7 RNA Polymerase Mix外的组分振荡混匀，短暂离心收集于管底，冰上放置备用。

2. 依次加入以下各组分：

组 分	推荐体系	体系范围
RNase-free ddH_2O Up to	To 20 μl	To 20 μl
10 × Transcription Buffer	2 μl	2 μl
N1 -Me-Pseudo UTP(100 mM)	2 μl	1~2 μl
ATP Solution (100 mM)	2 μl	1~2 μl
CTP Solution (100 mM)	2 μl	1~2 μl
GTP Solution (100 mM)	2 μl	1~2 μl
T7 RNA Polymerase Mix	2 μl	2~3 μl
模板[a] (1μg)	x μl	0.3~2 μg

a. DNA模板需要最后加入，因为10 × Transcription Buffer含有亚精胺，亚精胺浓度过高会引起DNA模板沉淀。

▲ 反应体系需在室温下配置，防止低温引起亚精胺沉淀高浓度DNA模板。

3. 用移液器轻轻混匀各组分，并短暂离心收集，37℃孵育2 h。如合成小于0.3 kb RNA，可将反应延长至4 h或更长，16 h过夜不会影响产物的质量。

4. 在反应体系中加入1 μl DNase I，37℃孵育15 min，消化转录的DNA模板。(可选)

▲ 为避免蒸发对反应体系的影响，建议在 PCR仪中进行反应。

▲ 反应产物可能有白色沉淀。这是反应过程中焦磷酸被水解为磷酸，磷酸与反应液中的镁离子形成磷酸镁，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。

▲ 使用试剂、容器等无 RNase 污染。

06-3/产物纯化

转录后的RNA可以选用VAHTS RNA纯化磁珠(Vazyme #N412)进行纯化，或选用FastPure RNA纯化柱(Vazyme #RC112)进行纯化，也可采用酚/氯仿纯化法或氯化锂纯化法进行纯化。纯化后的RNA经电泳检测可进行下游实验或储存于-80℃。

1. 磁珠纯化

磁珠纯化可以去除蛋白和游离核苷酸。

按磁珠纯化说明书进行纯化。

2. 柱纯化

柱纯化可以去除蛋白和游离核苷酸。

纯化前加入80 μl RNase-free ddH_2O将产物稀释至100 μl，再按柱纯化说明书进行纯化。

3. 酚/氯仿纯化

酚/氯仿纯化可以去除蛋白和大部分游离核苷酸。

a. 加入160 μl RNase-free ddH_2O将产物稀释至180 μl。

b. 加入20 μl 3 M乙酸钠(pH 5.2)到稀释后的产物，用移液器充分混匀。

c. 加入200 μl 酚/氯仿混合液(1:1)进行抽提，室温10,000 rpm离心5 min，将上层溶液(水相)转移至新的RNase-free EP管中。

d. 加入与水相等体积的氯仿抽提2次，收集上层水相。

e. 加入2倍体积的无水乙醇，混匀，-20℃孵育30 min，4℃ 15,000 rpm离心15 min，弃上清。

f. 加入500 μl预冷的70%乙醇洗涤RNA沉淀，4℃ 15,000 rpm离心15 min，弃上清。

g. 开盖干燥2 min，加入20 - 50 μl RNase-free ddH_2O或其他缓冲液溶解RNA沉淀。

4. 氯化锂纯化

氯化锂纯化可以去除蛋白和大部分游离核苷酸。

a. 加入30 μl RNase-free ddH_2O将产物稀释至50 μl。

b. 加入30 μl氯化锂沉淀液(7.5 M氯化锂，50 mM EDTA)到稀释后的产物。

c. 混匀后-20℃孵育30 min，12,000 rpm离心15 min，弃上清。

d. 加入500 μl预冷的70%乙醇洗涤RNA沉淀，4℃ 15,000 rpm离心15 min，弃上清。重复三次

e. 开盖干燥2 min，加入20 - 50 μl RNase-free ddH_2O或其他缓冲液溶解RNA沉淀。

06-4/RNA定量

1. 紫外吸收法

游离核苷酸会影响定量的准确性，采用此方法应先进行RNA纯化，然后通过测定产物A_{260}读数确定体外转录RNA的产量。

对于单链RNA，1 A_{260} ≈ 40 μg/ml，所以本方法测定RNA浓度结果为：(A_{260} × 40 ×稀释倍数)μg/ml。

2. 染料法

用RiboGreen染料(Vazyme #EQ212)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体外转录产物中的RNA进行准确定量。

按染料说明书进行RNA定量。

07/注意事项

本反应对RNase高度敏感，反应体系须严格注意不要混入RNase，实验器材如枪头、EP管严格使用RNase-free用品。

08/常见问题与解决方案

08-1/转录产物产量低

模板与产量密切相关，实验组产量明显低于对照组，可能原因：①实验模板中有抑制反应的成分；②实验模板本身原因。建议a. 重新纯化模板；b. 确定模板定量以及完整性；c. 延长37℃反应时间；d. 加大模板投入量；e. 尝试其他的启动子和RNA聚合酶。

08-2/短片段转录产物产量

转录起始片段短会抑制反应，转录产物小于0.3 kb时，延长反应时间或增加模板量可以提高RNA产量。16 h过夜反应或者使用2 μg模板可以使RNA产量最大化。

08-3/产物电泳拖尾现象

电泳过程中有拖尾现象，可能原因：①实验操作过程被RNase污染；②DNA模板被RNase污染。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，并在实验过程中使用RNase-free的枪头和EP管，佩戴一次性乳胶手套和口罩，所有试剂均用RNase-free ddH_2O配制。

08-4/RNA产物片段大于预期

如果电泳显示产物条带大于预期，可能原因：①质粒模板可能没有完全线性化；②线性化模板有义链3'末端突出；③RNA存在未完全变性的二级结构。建议确认模板结构，并通过变性电泳的方式确认实验结果。

08-5/RNA产物片段小于预期

如果电泳显示产物条带小于预期，可能原因：①模板序列中包含类似T7 RNA聚合酶终止序列；②模板GC含量高形成高级结构；③RNase污染。不同的聚合酶识别不同的终止序列，若模板中含终止序列，建议尝试不同的RNA聚合酶；如果模板GC含量较高，建议加入SSB蛋白以提高转录效率。

Nanjing Vazyme Biotech Co.,Ltd.

Web: www.vazyme.com
Tel: +86-400-007-8058
Sales: sales@vazyme.com
Support: support@vazyme.com