T7 High Yield RNA Transcription kit

TR101

Vazyme

使用说明书

Version 22.1

目录 Contents

01/产品概述 ····· 02
02/产品组分 ····· 02
03/保存条件 ····· 02
04/适用范围 ····· 02
05/自备材料 ····· 02
06/注意事项 ····· 02
07/模板制备 ····· 02
08/实验流程 ····· 03
08-1/转录方案 ····· 03
08-2/体外转录 ····· 03
08-3/产物纯化 ····· 05
08-4/RNA定量 ····· 05
08-5/数据参考 ····· 05
09/常见问题与解决方案 ····· 06

*所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

01/产品概述

T7 High Yield Transcription Kit进行了转录反应体系的优化，T7 RNA Polymerase从模板DNA T7启动子下游开始合成与DNA中一条链互补的RNA，简单快速获得大量的RNA分子，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。

本试剂盒以0.5 μg的模板投入量可以产生150 - 200 μg的RNA，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。

02/产品组分

组分	TR101-01 (50 rxns)	TR101-02 (100 rxns)
T7 RNA Polymerase Mix	100 μl	200 μl
10 × Reaction Buffer	100 μl	200 μl
ATP Solution	100 μl	200 μl
UTP Solution	100 μl	200 μl
GTP Solution	100 μl	200 μl
CTP Solution	100 μl	200 μl
DNase I	50 μl	100 μl
Control Template (0.5 μg/μl)	10 μl	20 μl
RNase-free ddH_2O	1 ml	2 × 1 ml

03/保存条件

-30 ~ -15℃保存，≤0℃运输。

04/适用范围

体外RNA合成

05/自备材料

模板：带T7 RNA聚合酶启动子序列的线性化质粒、PCR产物或合成的DNA片段。
纯化：苯酚、氯仿、醋酸钠、乙醇；或RNA纯化柱；RNase-free ddH_2O。
其他：RNase-free的EP管及移液器吸头；PCR仪。

06/注意事项

1. 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，避免RNase污染。
2. 模板的使用：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。

07/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体外转录模板，模板可用TE缓冲液或RNase-free ddH_2O溶解，推荐浓度0.5 μg/ul。

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，线性化的质粒请确保双链为平末端或编码链5'端为突出结构(图1中的B链)。每个反应建议投入1 μg线性化质粒作模板。

▲ 质粒线性化后，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。

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。PCR扩增模板时将T7启动子(TAATACGACTCACTATAGGG)加在非编码链的上游引物的5'端(图1中的A链)。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0.1 - 0.5 μg模板。

3. 合成的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。

08/实验流程

08-1/转录方案

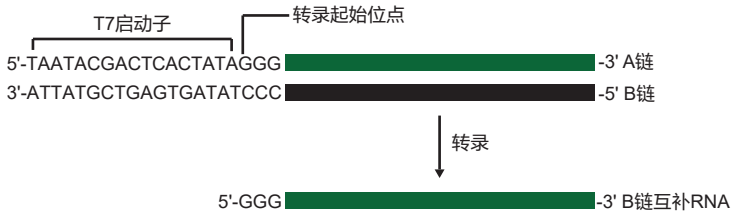

图1. RNA转录方案

08-2/体外转录

RNA的转录方案如图1所示，请参考图中DNA设计转录模板。本试剂盒不提供修饰的NTP和帽子类似结构。

▲ 体外转录反应操作之前，请佩戴手套并使用无核酸酶EP管和试剂，以避免引入RNase污染。

1. 将除T7 RNA Polymerase Mix外的组分振荡混匀，短暂离心收集于管底，冰上储存备用。
2. 根据所需产物类型选择下面的步骤A、B、C三个反应体系配置溶液，建议模板加入0.1 - 1 μg。

A. 按下表配制反应体系(非修饰RNA体系)：

组分	体积	
10 × Reaction Buffer	2 μl	■
ATP Solution	2 μl	■
GTP Solution	2 μl	■
UTP Solution	2 μl	■
CTP Solution	2 μl	■
DNA模板	x μl	
T7 RNA Polymerase Mix	2 μl	■
RNase-free ddH_2O	up to 20 μl	□

B. 按下表配制反应体系(修饰RNA体系)：

组分	体积	
10 × Reaction Buffer	2 μl	■
ATP Solution	2 μl	■
GTP Solution	2 μl	■
CTP Solution	2 μl	■
UTP Solution	1.5 μl	■
Modified UTP(10 mM)	5 μl	
DNA模板	x μl	
T7 RNA Polymerase Mix	2 μl	■
RNase-free ddH_2O	up to 20 μl	□

▲ 体系以Modified UTP为例，若使用其他的Modified NTP底物，请参照UTP Solution与Modified UTP比例配制反应体。

C. 按照下表配制反应体系(加帽RNA体系)：

组分	体积	
10 × Reaction Buffer	2 μl	■
ATP Solution	2 μl	■
CTP Solution	2 μl	■
UTP Solution	2 μl	■
GTP Solution	0.4 μl	■
m7G(5')ppp(5')G(50 mM)	2.4 μl	
DNA模板	x μl	
T7 RNA Polymerase Mix	2 μl	■
RNase-free ddH_2O	up to 20 μl	□

▲ 体系以m7G(5')ppp(5')G为例，若使用其他的帽子结构，请参考GTP Solution与帽子结构的比例配制反应体系。

3. 用移液器轻轻混匀各组分，并短暂离心收集，37℃孵育2 h。

▲ 为避免蒸发对反应体系的影响，建议在PCR仪中进行反应。可根据产物片段大小适当的调整反应时间，如合成小于0.3 kb的RNA，可将反应延长至4 h或更长时间，16 h过夜反应不会影响产物的质量。

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

▲ 相对于产物RNA，模板DNA的含量非常低，一般不用去除，也可以用DNase I消化。

5. 合成的RNA经电泳分析、纯化后，可用于下游实验。

▲ 产物浓度极高，需用RNase-free ddH_2O稀释后再检测。

08-3/产物纯化

非修饰RNA可采用过柱或酚/氯仿抽提纯化法；修饰RNA推荐使用过柱纯化法；对产物片段大小要求较高则推荐使用切胶回收纯化。

▲ 请用RNase-free ddH$_2$O及RNase-free EP管配制试剂。

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。

   a. 加入160 μl RNase-free ddH$_2$O将产物稀释至180 μl。

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

   c. 加入200 μl的酚/氯仿混合液(1:1)进行抽提，室温12,000 rpm(13,400 × g)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℃ 12,000 rpm(13,400 × g)离心15 min。

   f. 弃上清并加入500 μl预冷的70%乙醇洗涤RNA沉淀，4℃ 12,000 rpm(13,400 × g)离心，弃上清。

   g. 开盖干燥2 min，加入20 - 50 μl RNase-free ddH$_2$O或其他缓冲液溶解RNA沉淀。

   h. -70℃保存。

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$_2$O将产物稀释至100 μl，再按柱纯化说明书进行纯化。

   ▲ 由于RNA产量较高，为避免超出结合柱的承载能力，请对所需柱子数量进行预估。

08-4/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。
2. 染料法：用RiboGreen染料进行RNA定量，游离核苷酸不会影响定量，可以对纯化或者未纯化的反应产物中的RNA进行准确定量。

08-5/数据参考

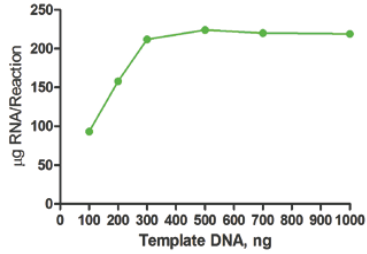

图2. 模板投入量与产量的关系

Vazyme
www.vazyme.com

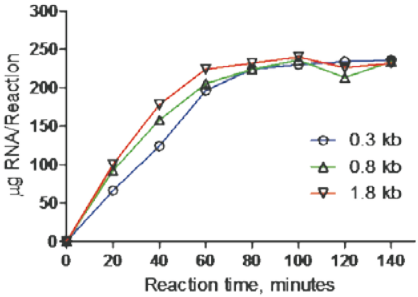

图3.反应时间与产量的关系

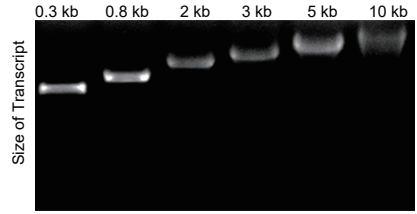

图4.不同长度转录产物电泳图

09/常见问题与解决方案

◇ 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。

建议做一个对照组，一个实验组。若对照组产量低，请咨询诺唯赞技术支持。若对照组产量正常但实验组产量低，说明实验模板本身原因导致产低，请尝试以下方案解决：

a. 重新纯化模板；b. 确定模板定量以及其完整性；c. 延长37℃反应时间；d. 加大模板投入量；e. 尝试其它的启动子和RNA聚合酶。

◇ 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。过夜反应(16 h)或者使用2 μg模板可以使RNA产量最大化。

◇ 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RNA酶污染；②DNA模板被RNase污染。

体系中的RNA酶抑制剂只能抑制痕量的RNA酶残留，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。

◇ 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有义链3'端为突出结构；③RNA存在未完全变性的二级结构。

建议确认模板结构，并将电泳方式由琼脂糖胶换成变性胶来检测RNA产物。

◇ RNA产物片段小于预期

如果电泳显示产物条带小于预期大小，可能原因：①模板序列中包含类似于T7 RNA聚合酶的终止序列；②模板中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，若模板中含终止结构，建议尝试不同的RNA聚合酶。如果模板为高GC，建议加入SSB蛋白，以提高转录效率。出现产物条带与预期不一致，请跑变性胶检测产物。

Vazyme

Vazyme Biotech Co., Ltd.

Web: www.vazyme.com
Tel: +86-400-600-9335
Sales: sales@vazyme.com
Support: support@vazyme.com