

# T7 High Yield RNA Synthesis Kit

## T7 RNA 体外转录试剂盒

**RM201**



**产品说明书**  
PRODUCT MANUAL

南京巨匠生物科技有限公司  
ATG BIOTECHNOLOGY CO.,LTD

## 目录 Product Manual

产品简介 .....	1
产品组成 .....	1
储存条件 .....	1
产品应用 .....	1
模板准备 .....	2
实验流程 .....	3
注意事项 .....	4
产品性能 .....	5
常见问题与解决方案 .....	7

## 产品简介

T7 High Yield RNA Synthesis Kit 内含的 T7 RNA Polymerase Mix, 配以精心优化的 T7 Reaction Buffer 可以从少量样本得到高效转录, 合成多种类型的 RNA, 包括内部标记的 RNA 及共转录带帽结构 RNA。1  $\mu\text{g}$  对照模板单次反应可获得产量高达百微克左右的单链 RNA。得到的 RNA 适用于多种下游应用, 如 RNA 结构和功能研究、核酸酶生物化学研究、RNase 保护分析探针、印迹杂交、反义 RNA 及 RNAi 实验、RNA 疫苗等。

产品优点: 转录效率高、合成 RNA 类型多样、RNase 污染控制严格。

## 产品组成

组分	RM201 (50 rxns)
T7 RNA Polymerase Mix	100 $\mu\text{l}$
5 $\times$ T7 Reaction Buffer	200 $\mu\text{l}$
Activator	50 $\mu\text{l}$
ATP/CTP/GTP/UTP (100 mM)	each 100 $\mu\text{l}$
Positive control	10 $\mu\text{l}$ (1 $\mu\text{l}/\text{test}$ )
DNase I (1 U/ $\mu\text{l}$ )	50 $\mu\text{l}$
10 $\times$ DNase I Buffer	500 $\mu\text{l}$
RNase-free ddH <sub>2</sub> O	1 ml

## 储存条件

-20°C 保存, 于 -20 ~ 0°C 运输。▲避免反复冻融。

## 产品应用

mRNA 疫苗制备

单链 RNA 转录合成

制备放射标记的 RNA 探针

合成用于体外转录和微量注射的 mRNA

合成用于结构及功能研究的 RNA

非同位素标记的 RNA

合成基因表达实验的反义 RNA

合成基因靶向功能的 gRNA

## 模板准备

### 1. 质粒模板

使用限制性内切酶将质粒 DNA 要转录的片段之后的下游位点酶切使其线性化，并建议通过苯酚/氯仿抽提纯化线性片段。

### 2. PCR 产物模板

可直接使用 PCR 扩增后反应产物 (包含 T7 启动子序列和转录片段) 做模板,但建议进行纯化后再进行下一步实验,可提高转录效率。

### 3. 合成的 DNA 模板

人工合成 DNA 单链或双链片段 (包含 T7 启动子序列和转录片段) 也可以作为体外转录模板,但转录产物产量可能会较低一些,这与合成的序列及制备工艺和纯度有关。

## 实验流程

### 1. 体系配制

#### 非修饰 RNA 合成体系

组分	用量
T7 RNA Polymerase Mix	2 $\mu$ l
5 $\times$ T7 Reaction Buffer	4 $\mu$ l
Activator	1 $\mu$ l
ATP/CTP/GTP/UTP (100 mM)	each 2 $\mu$ l
Template DNA	0.3-1 $\mu$ g
RNase-free ddH <sub>2</sub> O	to 20 $\mu$ l

#### 修饰 RNA 合成体系

组分	用量
T7 RNA Polymerase Mix	2 $\mu$ l
5 $\times$ T7 Reaction Buffer	4 $\mu$ l
Activator	1 $\mu$ l
ATP/CTP/GTP (100 mM)	each 1.5 $\mu$ l
UTP (100 mM)	1 $\mu$ l
Modified UTP (10 mM)	5 $\mu$ l
Template DNA	1 $\mu$ g
RNase-free ddH <sub>2</sub> O	to 20 $\mu$ l

\*与使用未修饰的 NTP 进行转录相比，修饰的 NTP 转录效率较低，且转录产物电泳迁移率也较慢。

## 加帽 RNA 合成体系

组分	用量
T7 RNA Polymerase Mix	2 $\mu$ l
5 $\times$ T7 Reaction Buffer	4 $\mu$ l
Activator	1 $\mu$ l
ATP/CTP /UTP (100 mM)	each 2 $\mu$ l
GTP (100 mM)	0.4 $\mu$ l
m7G(5')ppp(5')G (40 mM)	4 $\mu$ l
Template DNA	1 $\mu$ g
RNase-free ddH <sub>2</sub> O	to 20 $\mu$ l

\*体系以 m7G(5')ppp(5')G 为例, m7G(5')ppp(5')G 与 GTP 的浓度(mM)比为 4:1 时转录性能较佳。

2. 移液枪轻轻混匀后, 短暂离心, 37°C 孵育 1-2 h<sup>a</sup> 即可完成转录得到较高产量。
3. 在反应体系中加入 1  $\mu$ l 的 DNase I (RNase-free)和 2  $\mu$ l DNase I Buffer, 37°C 孵育 15-20 min, 消化用于转录的 DNA 模板<sup>b</sup>。
4. 反应产物通过纯化<sup>c</sup>, 用于后续实验。
  - a. 合成 RNA 片段较短 (< 300 nt) 时建议 37°C 孵育 4 - 16 h 或更长时间, 过夜不会影响产物质量。
  - b. 若模板去除效果不好向反应产物加入 70  $\mu$ l RNase-free ddH<sub>2</sub>O 稀释, 并加入 10  $\mu$ l DNase I Buffer 和 1  $\mu$ l DNase I 的预混液, 轻轻混匀短暂离心后 37°C 孵育 20 min。
  - c. 非修饰 RNA 可采用酚/氯仿抽提、过柱、磁珠法纯化法; 修饰 RNA 推荐使用过柱纯化法; 对产物片段长度有较高要求则推荐使用切胶回收纯化。

## 注意事项

1. 使用本产品时, 请在洁净操作台, 使用 RNase-free 耗材并穿戴洁净的实验服及全新的一次性乳胶手套和一次性口罩, 以避免 RNase 污染。
2. 建议纯化 Template DNA, 避免 RNase、RNA 及蛋白残留。
3. 进行体外转录合成 RNA 时, 本产品不仅适用于含有 T7 Promoter 的线型 Plasmid, 也适用于带有 T7 Promoter 序列的 PCR 产物及 Oligo DNA 等。
4. 反应体系中可添加 RNasin (ATG#RR101) 防止 RNase 污染, 建议使用浓度 1 U/ $\mu$ l。

## 产品性能

1. 遵照本产品非修饰 RNA 合成反应体系及实验流程，向反应体系中加入 Template DNA (1.4 kb) 500 ng，37°C 孵育 2 h，转录合成 RNA，得到 RNA 产物经 DNase I 处理后，通过变性琼脂糖凝胶电泳检测，检测结果如图 1 所示。

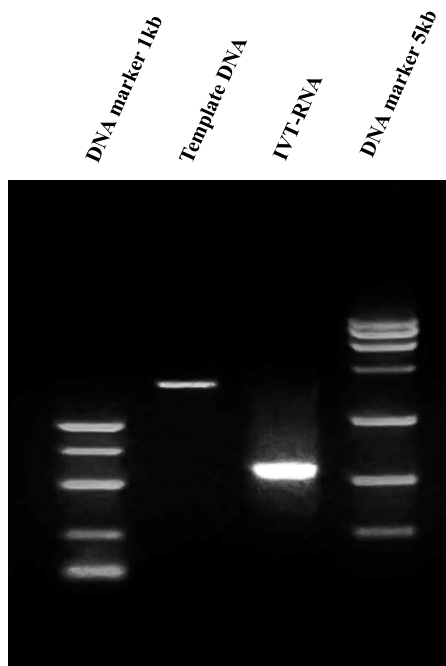


图 1 转录 2 h 产物电泳检测图

2. 遵照本产品非修饰 RNA 合成反应体系及实验流程，向反应体系中加入 Template DNA (1.4 kb) 500 ng，37°C 孵育不同时间，转录合成 RNA，得到转录产物通过变性琼脂糖凝胶电泳检测，并在 NanoDrop™ 分光光度计上定量，检测结果如图 2 及图 3 所示。

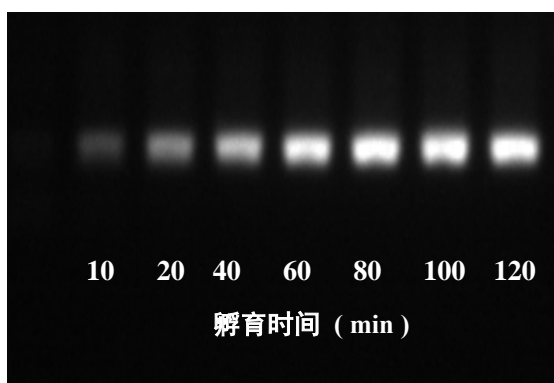


图 2 不同反应时间转录产物电泳图

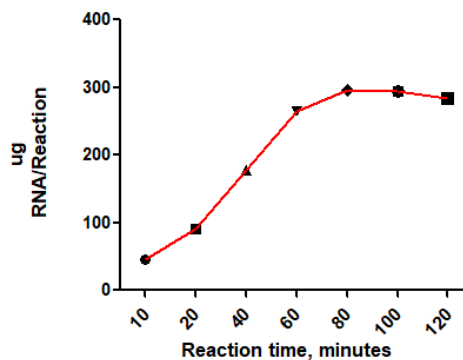


图 3 不同反应时间转录产量

3. 遵照本产品非修饰 RNA 合成反应体系及实验流程，三种模板添加量相同，37°C 孵育不同时间，检测转录不同长度产物 RNA (0.3kb/0.8kb/1.8kb) 产量随时间变化，在 NanoDrop™分光光度计上定量，检测结果如图 4 所示。

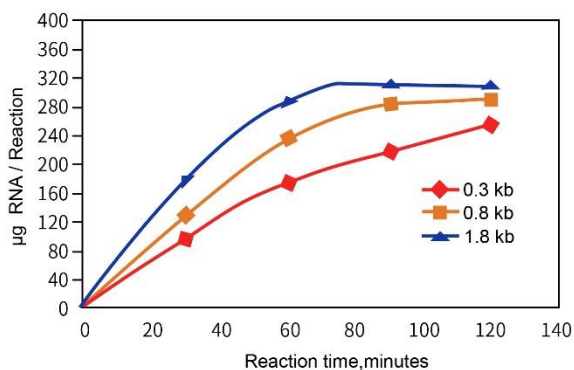


图 4 转录不同长度产物 RNA 产量随时间变化

4. 遵照本产品非修饰 RNA 合成反应体系及实验流程，37°C 孵育 2 h，检测转录不同长度产物 RNA (0.3kb/1.8kb) 产量随模板添加量变化，结果如图 5 所示。

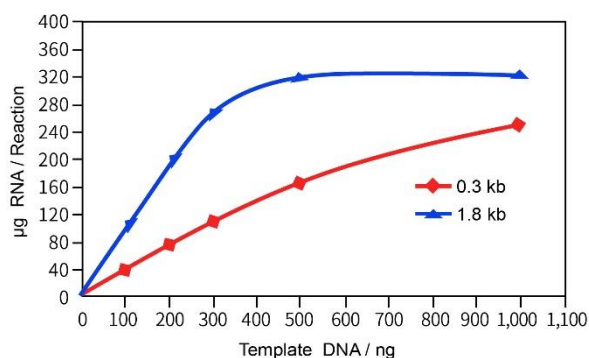


图 5 转录不同长度产物 RNA 产量随模板添加量变化

综上所述实验结果可得，本产品方案对以上各种长度模板，添加量为 500 ng 时，37°C 反应时间 1 h 均可得到较高产量，且条带单一，RNase 污染控制较好。



## 常见问题与解决方案

### 转录产物产量低

转录反应产生 RNA 产量明显低于预期，则可能是 DNA 模板中的污染物抑制了 RNA 聚合酶，或者 DNA 模板浓度不正确，可能需要对 DNA 模板进行再次纯化（苯酚-氯仿提取）。

解决方案：纯化模板；增加模板加入量；延长反应时间；确定模板的量及其完整性；尝试其他转录系统。

### 短片段转录产物产量低

可延长孵育时间和增加模板量，提高短片段转录(< 300 nt) 的产量。孵育反应长达 16 小时（过夜）或使用高达 2  $\mu\text{g}$  的模板将有助于获得最大产量。

### 转录产物拖尾现象

RNA 在变性琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶上出现降解，则 DNA 模板可能有 RNase 残留或操作不规范导致从而影响合成 RNA 的长度和产量（低于预期转录长度）。

### 转录产物片段长度大于预期

少量未消化完全的环状 DNA 也可以产生大量的片段长度比预期的大转录产物。

当转录产物 RNA 存在强二级结构而未完全变性时，也可以观察到较大的条带。

### 转录产物片段长度小于预期

如果变性凝胶分析显示存在比预期长度更小的条带，则很可能是由于聚合酶过早终止。

一些类似于 T7 RNA 聚合酶终止信号的序列会导致过早终止。

在较低温如 30°C 下孵育，可能会增加完整转录产物的比例，但是产量会降低。

若存在富含 GC 的模板或具有二级结构的模板，在 42°C 下孵育可以提高完整转录产物的产量。



025-85653525

[www.atgbiotechnology.com](http://www.atgbiotechnology.com)

南京市栖霞区江苏生命科技园D6幢710室