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

DD4202

Vazyme Biotech Co., Ltd.

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

使用说明书

Version 21.1

www.vazyme.com

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

*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 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；以帽子结构或者帽子类似结构为底物产生加帽的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 × Reaction Buffer	100 μl	200 μl
ATP Solution	100 μl	200 μl
N^1-Me-Pseudo 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 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、帽子结构化或帽子类似结构。

Vazyme
www.vazyme.com

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启动子的线性化可以作为转录模板，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。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。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。

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。

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，冰上储存备用。

2. 依次加入以下各组分：

组 分	体积
T7 RNA Polymerase Mix	2 μl
10 × Reaction Buffer	2 μl
ATP Solution	2 μl
N^1-Me-Pseudo UTP Solution	2 μl
GTP Solution	2 μl
CTP Solution	2 μl
模板	x μl
RNase-Free ddH_2O Up to	20 μl

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）

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。

1/ 加入160 μl RNase-Free ddH_2O将产物稀释至180 μl。

2/ 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。

3/ 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。

4/ 加入与水相等体积的氯仿抽提2次，收集上层水相。

5/ 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。

6/ 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。

7/ 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。

1/ 加入30 μl RNase-Free ddH_2O将产物稀释至50 μl。

2/ 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。

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

4/ 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

5/ 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。

Vazyme
www.vazyme.com

2. 染料法

用RiboGreen染料（Vazyme #EA212）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

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。

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。

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。

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。

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。