T7 RNAi Transcription Kit

TR102

Vazyme

使用说明书

Version 21.1

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 ····· 03
07-1/PCR模板 ····· 03
07-2/合成模板 ····· 04
08/实验流程 ····· 05
09/产物纯化 ····· 06
10/siRNA干扰实验 ····· 06
11/常见问题与解决方案 ····· 07

*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 RNA ploymerase可识别带有T7启动子的DNA模版，以四种NTP为底物，体外转录合成RNA。T7 RNAi Transcription Kit是在T7 High Yield RNA Transcription Kit基础上为转录双链RNA而设计优化的版本，可用于转录21 bp的siRNA和长片段的dsRNA。转录产物经纯化后可用于阳离子脂质体、磷酸钙共沉淀、电穿孔、DEAE-葡聚糖及显微注射等方法介导的RNAi实验。一般情况下，一个反应可产生20 - 80 μg的RNA。

02/产品组分

	组分	TR102-01(25 rxns)	TR102-02(50 rxns)
Box 1	T7 Enzyme Mix	50 μl	100 μl
	10 × Transcription Buffer	50 μl	100 μl
	10 × Annealing Buffer	250 μl	500 μl
	NTP Mix	200 μl	400 μl
	DNase I	25 μl	50 μl
	RNase T1(100 U/μl)	25 μl	50 μl
	RNase T1 Dilution Buffer	300 μl	600 μl
	Control Template*	5 μl	10 μl
Box 2	RNase-free H_2O	5 ml	5 ml
	RNA Clean Beads	2 ml	4 ml

* 本试剂盒提供的Control Template为500 bp双端含T7启动子的PCR产物，浓度为0.5 μg/μl。

03/保存条件

Box 1，-30 ~ -15℃保存，≤0℃运输。

Box 2，2 ~ 8℃保存，根据不同目的地调整运输方式。

04/适用范围

本试剂盒适用于体外转录siRNA及长链dsRNA，转录单链RNA推荐使用T7 High Yield RNA Transcription Kit（Vazyme #TR101）。

05/自备材料

模板：带T7启动子序列的线性化质粒、PCR产物或化学合成的DNA片段。

其他：RNase-free EP管、移液器吸头；PCR仪；磁力架；无水乙醇。

06/注意事项

1.实验时请佩戴一次性手套及口罩以避免产物被RNase降解。

2.请使用RNase-free的实验耗材。

3.转录前请先电泳确定模板为单一片段。

07/模板制备

07-1/PCR模板

转录长链的dsRNA可用5'端带T7启动子（TAATACGACTCACTATAGGG）的特定引物扩增转录模板。方案如下图1所示，绿色方框表示T7启动子，绿色直线表示转录模板链。转录起始位点在T7启动子TAATACGACTCACTATAGGG 3个G的位置（下划线）。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，建议模板投入量为0.5 μg。

▲转录方案有三种：① 模板1和模板2分别在两个PCR管中转录后再将产物1:1退火成双链。② 模板1和模板2在同一个PCR管中混合转录后退火成双链；③ 用双端带启动子的模板3转录后退火成双链。一般情况下，方案①和②的转录产物量更高。

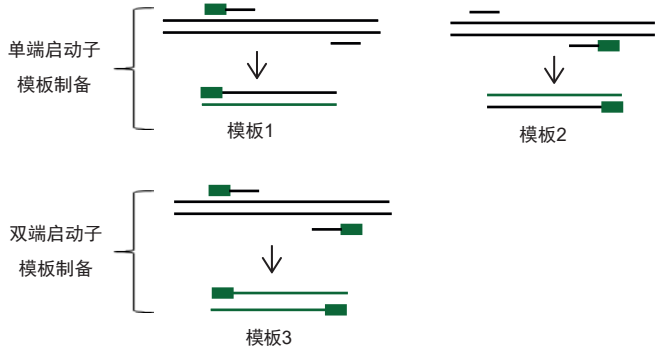


图1. PCR扩增体外转录模板示意图。

dsRNA转录实验流程：

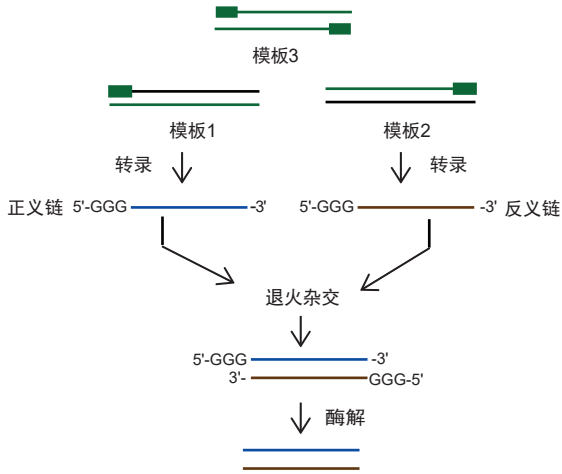


图2. dsRNA转录实验流程。

Vazyme
www.vazyme.com

07-2/合成模板

siRNA的转录模板短，可分别合成四条单链的DNA，再按如图3所示方式退火得到两个双链的DNA模板。由于siRNA模板片段较短，聚合酶与模板结合效率较低，合成模板时可在T7启动子的5'端加上GATCAC六个碱基以促进酶与模板的结合。

▲siRNA 3'末端带两个游离的碱基会提高siRNA与mRNA的结合效率，游离碱基为UU时对靶基因的抑制效果最强，若游离碱基为GG则细胞内的RNase会降解这种结构，导致siRNA活性降低。

a.按照如下体系退火成两个转录模板：

组分	体积
RNase-free H_2O	14 μl
Oligonucleotides A1（或B1）100 μM	2 μl
Oligonucleotides A2（或B2）100 μM	2 μl
10 × Annealing Buffer	2 μl

▲模板A1与A2，模板 B1与B2之间必须配对（如图3所示）。

b.在PCR仪中进行如下退火程序：

温度	时间
95˚C	2 min
95 ~ 22˚C	0.1˚C/sec
22˚C	10 min

▲退火后分别得到两个10 μM的DNA模板，该模板可以直接体外转录。

siRNA转录实验流程：

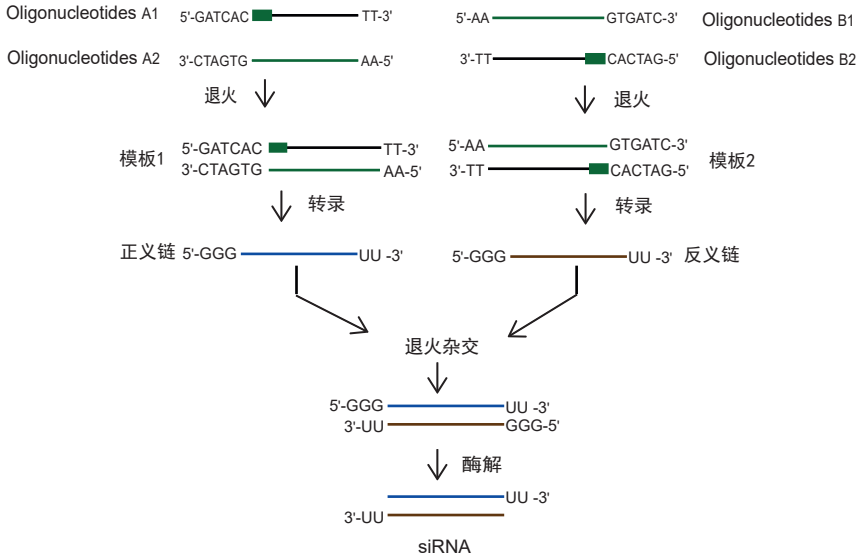


图3. siRNA转录示意图。

08/实验流程

1. 按下表配置反应体系(混合模板转录方案为例)：

组分	体积
NTP Mix	8 μl
10 × Transcription Buffer	2 μl
T7 Enzyme Mix	2 μl
DNA模板1	1 - 4 μl
DNA模板2	1 - 4 μl
RNase-free H_2O	up to 20 μl

▲模板1与模板2按1:1的量投入，推荐投入量各0.5 μg，混样后用移液器轻轻吹打混匀，并将试剂短暂离心于管底。

2.在PCR仪中37℃反应2 h。

▲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，过夜反应不会影响产物的质量。

3.双链长度大于800 bp，37℃反应结束后需72℃ 10 min，再自然冷却退火形成dsRNA。

▲在同一个PCR管中，小于800 bp的转录产物反应后会互补形成dsRNA，大于800 bp需要退火形成dsRNA。两个模板分别在不同的PCR管中转录，则需将反应结束后两个产物混合后进行退火。

4. 用RNase T1 Dilution Buffer将100 U/μl RNase T1稀释成10 U/μl。

▲RNase T1特异性降解单链RNA及5'端的3个G碱基，稀释后的RNase T1须尽快使用，不宜保存。

5. 按下表配制双酶消化体系：

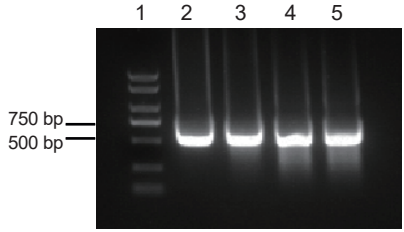
组分	体积
Transcription Product	20 μl
RNase-free H_2O	17 μl
DNase I	1 μl
RNase T1(10 U/μl)	2 μl
Total	40 μl

▲混样后用移液器轻轻吹打混匀，并将试剂短暂离心于管底。

6. 37℃孵育30 min。

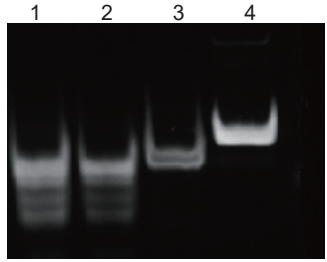
7. 电泳检测转录产物。

▲长片段dsRNA进行琼脂糖凝胶电泳，siRNA则用聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)电泳检测。siRNA由于片段较小，转录产物会有一定的弥散现象。



1：DL2,000 Plus DNA Maker；
2和4：分别为500 bp dsRNA酶解前后产物(方案②)；
3和5：分别为500 bp dsRNA酶解前后产物(方案③)。

图4. 500 bp dsRNA 2%琼脂糖凝胶电泳图。



1：siRNA转录产物；
2：siRNA转录双酶消化产物；
3：单链模板；
4：双链退火模板。

图5. siRNA 12% PAGE电泳检测结果。

09/产物纯化

RNA产物可采用磁珠、过柱、酚/氯仿抽提及切胶回收的方法纯化。本试剂盒推荐磁珠法纯化RNA。

▲磁珠纯化可快速高效去除蛋白，游离核酸及盐类。纯化所用80%乙醇需自备RNase-free H_2O配置。

1.将RNA Clean Beads从4℃取出，放置室温平衡30 min。使用前请颠倒或涡旋混匀。

2.向转录产物中加入80 μl的磁珠溶液，用移液器吹打10次以上使溶液充分混匀。

▲若转录产物片段小于100 bp，须加200 μl的异丙醇，再充分混匀。

3.室温孵育8 min，使RNA与磁珠充分结合。

4.将PCR管置于磁力架上约5 min，待溶液澄清后，小心移除上清液，吸取上清时注意勿扰动到磁珠。

5.保持PCR管始终处于磁力架上，加入200 μl新配制的80%乙醇，注意不要扰动到磁珠，室温孵育30 sec，小心移除上清。重复该步骤一次。

6.开盖空气干燥磁珠5 - 10 min。

▲干燥至磁珠表面无水光即可，过度干燥会影响RNA的洗脱。

7.将PCR管从磁力架上取下，加入40 μl的RNase-free H_2O，用移液器将管壁上的磁珠吹打下来，充分混匀，并室温孵育3 min。

8.将PCR管置于磁力架上，待溶液澄清后，小心将上清转移至新的RNase-free EP管中，勿吸取到磁珠。

▲为避免磁珠对后续实验的影响，在转移产物时，请预留1 - 2 μl的溶液，以防止吸取到磁珠。

9.检测产物的A_{260}吸光值，确定其浓度，并于-20℃保存纯化产物。

10/siRNA干扰实验

本实验以293T细胞为转染对象，ExFect2000 Transfection Reagent（Vazyme #T202）为转染试剂，用带绿色荧光蛋白（GFP）序列的质粒和21 bp的GFP siRNA共转染干扰荧光蛋白表达。

▲在RNA干扰实验中，细胞的状态，转染试剂与RNA的比例，RNA的浓度，RNA的干扰效率，转染试剂的转染效率与毒性等都会影响最终的干扰结果。如果排出上述条件干扰仍不成功，则需重新设计RNA序列。Negative Control GFP siRNA 与Positive GFP siRNA的碱基组成相同，但没有基因靶向功能。

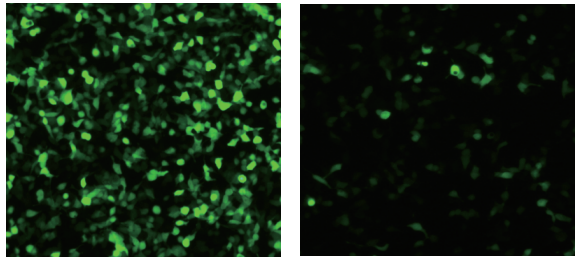


图6. siRNA干扰绿色荧光蛋白表达。

左图为GFP质粒与Negative control GFP siRNA共转染24 h后的293T细胞；
右图为GFP质粒和Positive GFP siRNA共转染24 h后的293T细胞。

11/常见问题与解决方案

◇dsRNA实验方案设计

dsRNA的实验设计有三种方案，请根据自己的实验选择转录方案，可参照步骤07-1/PCR模板进行模板制备。若选择方案①和②，模板投入量请按照1:1的比例进行转录，否则产物正义链和负义链RNA的量不相等，退火后会残余较多的单链RNA。

◇siRNA模板链设计

siRNA由于转录模板比较短，所以通常采用化学合成的方式得到四条单链DNA模板，再两两退火成转录模板。siRNA 3'端带有两个游离碱基，推荐在设计模板时在编码链3'端加两个T碱基。siRNA的编码链包含：6个碱基的增强子、20个碱基的T7启动子、19 - 21个碱基的目标序列及2个游离的T碱基。结构如下所示：

增强子	T7启动子	特定序列
GATCAC	TAATACGACTCACTATAGGG	$X_{19\text{-}21}$TT

◇转录产物产量低

一般情况下，每个反应可以产生20 - 80 μg的RNA，如果实验组产量很低，可能原因：

①模板中含有抑制反应的成分；

②模板投入量，模板长度及模板结构均与产量密切相关。

建议使用试剂盒中提供的Control Template做一个对照实验。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量低，请尝试以下方案解决：

a.纯化模板，并对模板准确定量；

b.加大模板投入量；

c.延长37℃反应时间；

d.重新设计模板。

Vazyme
www.vazyme.com

◇短片段模板转录产量低

模板片段小，模板与酶的结合效率会较低，如合成siRNA比合成其他长度的单双链RNA产量低。建议适当延长反应时间或增加模板量以提高RNA产量。

◇产物电泳拖尾现象

电泳过程中有拖尾现象，可能原因是模板投入量较多或者两个模板不以1:1投入而导致模板或者单链RNA酶解不彻底，建议适当延长双酶解时间。模板与单链RNA在总的转录产物中含量极低，一般不会影响后续实验。

◇RNA产物片段小于预期

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含量高形成了类似茎环的终止结构。

不同的RNA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聚合酶或者重新设计模板序列。

Vazyme Biotech Co., Ltd.

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