

## 高产 T7 体外转录试剂



成为世界一流的特种酶产品与服务提供商  
info@hzymes.com  
www.hzymes.com

### 产品信息

产品名称	货号
高产 T7 体外转录试剂 (N1-Me-pUTP) Hi-yield T7 in vitro transcription reagent (N1-Me-pUTP)	HBP001505

### 产品概述

高产 T7 体外转录试剂盒经过转录反应体系的优化, 使用 T7 RNA 聚合酶 (T7 RNA Polymerase) 进行体外转录, 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, 使客户能够简单快速地获得大量 RNA 产物。本试剂盒也能以修饰核苷为底物获得生物素、染料或放射性标记的 RNA, 以帽子结构或帽子类似结构为底物获得加帽的 RNA。本试剂盒内含常用的修饰核苷 N1-Me-pUTP 供转录需求选择使用。

本试剂盒一个反应能够转录获得 150~200 µg 的 RNA 产物, 并可放大生产毫克级别的 RNA。转录合成的 RNA 可用于 RNA 结构和功能研究、RNase 保护、探针杂交、anti-sense RNA 和 RNAi 等应用, 也可通过牛痘病毒加帽系统 (HBP000606) 和 2' -O- 甲基转移酶

(HBP000701) 加帽, Poly (A) Polymerase (HBP000801) 加尾产生 mRNA, 用于体外翻译、转染等下游应用。

### 产品组分

组分	浓度	体积
ATP	100 mM	100 µL
CTP	100 mM	100 µL
GTP	100 mM	100 µL
UTP	100 mM	100 µL
N1-Me-pUTP	100 mM	100 µL
10 × Hi-Yield IVT Buffer A	/	100 µL
10 × Hi-Yield IVT Buffer B	/	100 µL
Enzyme mix 1.0	/	100µL

### 运输与保存方法

≤0°C运输; -25°C~-15°C保存。

### 使用说明

#### 模板制备

带有 T7 启动子的线性化质粒、PCR 产物或合成的 DNA 片段都可作为高产 T7 RNA 合成试剂盒体外转录的模板, 模板可用 TE 缓冲液或 RNase-free ddH<sub>2</sub>O 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, 线性化的质粒需确保双链为平末端或 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、蛋白及盐残留等对体系的影响。

#### 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 启动子加在非编码链上游引物的 5' 端。PCR 产物经纯化后作模板可得到更高的 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。

### RNA 合成方法

实验操作需要佩戴手套, 使用无核酸酶污染反应管以避免 RNase 污染。小体积的反应建议在无核酸酶污染的 PCR 管或八连管中进行。常规 RNA 合成

1. 将各组分在冰上解冻, 混匀, 瞬时离心收集于管底, 冰上储存备用。
2. 如果要同时进行多个反应, 可以将 10 × Hi-Yield IVT Buffer 与 NTPs 等体积混成 mix 混合液备用, 每个反应加入 10µL mix 混合液。

#### 3. 在室温下按照下表的顺序进行加样:

组分	体积
无核酸酶水	X µL
10 × Hi-Yield IVT Buffer A	2 µL
ATP/CTP/GTP/UTP * (100 mM each)	2 µL each (10 mM each Final)
模板 DNA	Y µL (1 µg)
Enzyme mix 1.0	2 µL
总体积	20 µL

\*如为减少产物的免疫原性, 可将 UTP 等体积替换为本试剂盒中含有的 N1-Me-pUTP。

4. 充分混匀, 瞬时离心, 37°C 孵育 2h。

5. DNA 消化: 为去除 DNA 模板, 每 20µL 反应添加 10U of DNase I (HBP000910), 混匀后瞬时离心, 37°C 孵育 30min。

#### 加帽 RNA 合成

参照常规 RNA 合成步骤, 除加样体系外存在区别。在室温下按照下表的顺序进行加样。

组分	体积
无核酸酶水	X µL
10 × Hi-Yield IVT Buffer A**	2 µL
ATP/CTP/GTP/UTP * (100 mM each)	2 µL each (10 mM each Final)
Cap analog (100 mM)	1.6 µL
模板 DNA	Y µL (1 µg)
Enzyme mix 1.0	2 µL
总体积	20 µL

\*\*共转录体系在使用 10 × Hi-Yield IVT Buffer A 时, 若转录产量较低, 可以改用 10 × Hi-Yield IVT Buffer B。共转录帽类似物可选用 cap1(3' OH AG) (HBP002805), cap1(3'OMe AG) (HBP003700) 等, 底物中的 UTP 可以用等量的修饰核苷进行替换。根据需要进行共转录帽类似物与修饰核苷, 可选择瀚海新酶共转录加帽 T7 体外转录试剂 (pUTP, CAP GAG (3'OMe) (HBP001507), pUTP, CAP GAG (HBP001508), N1-Me-pUTP, CAP GAG (3'OMe) (HBP001509), N1-Me-pUTP, CAP GAG (HBP001510))。

## 产物纯化

### • 酚/氯仿纯化

酚/氯仿纯化可以去除蛋白和游离的核苷酸。

1. 加入 160  $\mu\text{L}$  RNase-free ddH<sub>2</sub>O 将反应产物稀释到 180  $\mu\text{L}$ , 并加入 20  $\mu\text{L}$  3M 的乙酸钠 (pH=5.2), 用移液枪吸打混匀;
2. 加入等体积的酚/氯仿混合液 (1:1) 进行抽提, 室温 10,000 rpm 离心 5 min, 将上层溶液转移至新的 EP 管中;
3. 加入与上层溶液等体积的氯仿抽提 2 次, 收集上层水相溶液;
4. 加入 2 倍体积的无水乙醇, 混匀, -20 $^{\circ}\text{C}$  孵育至少 30 min, 4 $^{\circ}\text{C}$  离心 15 min, 弃上清;
5. 加入 150-200  $\mu\text{L}$  70%冰点乙醇洗涤 RNA 沉淀, 4 $^{\circ}\text{C}$  离心 15 min, 弃上清;
6. 开盖干燥 2 min, 加入 100-200  $\mu\text{L}$  RNase-free ddH<sub>2</sub>O 或其他缓冲溶液溶解 RNA 沉淀。

### • 氯化锂纯化

氯化锂纯化可以去除蛋白和大部分游离的核苷酸。

1. 加入等体积的氯化锂沉淀液 (5M) 到反应产物中;
2. 混匀后 -20 $^{\circ}\text{C}$  沉淀 30 min, 4 $^{\circ}\text{C}$  12,000 rpm 离心 15 min, 弃上清;
3. 加入 200  $\mu\text{L}$  70%冰点乙醇洗涤 RNA 沉淀, 4 $^{\circ}\text{C}$  12,000 rpm 离心 15 min, 弃上清, 重复 2-3 次;
4. 开盖干燥 5-10 min, 确定完全干燥后, 加入 100-200  $\mu\text{L}$  RNase-free ddH<sub>2</sub>O 或其他缓冲溶液溶解 RNA 沉淀。

### • 柱纯化

柱纯化可以去除蛋白和游离的核苷酸。

### • 磁珠纯化

磁珠纯化可以去除蛋白和游离的核苷酸。

### RNA 定量

紫外吸收法: 游离核苷酸会影响定量的准确性, 采用此方法前需先进行 RNA 纯化, 后通过测定产物 A<sub>260</sub> 读数确定体外转录 RNA 的产量。

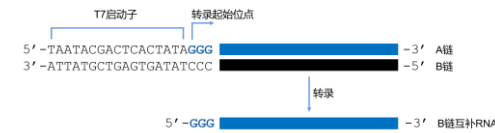
对于单链 RNA, 1 A<sub>260</sub>  $\approx$  40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

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。

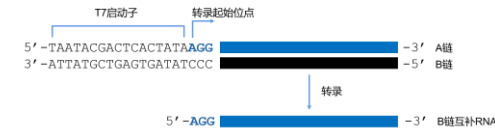
### 注意事项

- 反应体系中 NTPs 最适浓度为 10 mM, 实际用量应根据 NTPs 原始浓度合理配制;
- 转录反应配制应在无核酸酶污染的环境中完成, 操作过程建议佩戴手套、使用无核酸酶的水、枪头和反应管进行体系配制;
- 反应体系需要在室温下配制, 避免在 4 $^{\circ}\text{C}$  时 DNA 与亚精胺发生沉淀;
- 复融后如发现 Buffer 出现结晶或沉淀等不溶性物质, 请将 Buffer 涡旋混匀至不溶性物质完全溶解后使用;
- 模板 DNA 线性化不完全, 可能降低转录产物产量和纯度;
- 转录 < 300 nt 的 RNA, 可以用 2  $\mu\text{g}$  的模板, 转录时间增加到 4-8 h;
- 反应体系体积可根据实际需求按比例进行放大或缩小。
- 本试剂盒含 2 管 10 $\times$ Hi-Yield IVT Buffer, 常规体系与修饰核苷体系建议根据说明书使用 10 $\times$ Hi-Yield IVT Buffer A, 共转录体系若在使用 10 $\times$ Hi-Yield IVT Buffer A 产量不佳时, 可以使用 10 $\times$ Hi-Yield IVT Buffer B。

• 常规体系 DNA 模板常设计为 GGG 为起始序列, 是因为 T7 RNA 聚合酶对 GTP 有更高的亲和性。



• 共转录体系 DNA 模板设计推荐以 AGG 为起始序列。



### 常见问题与解决方案

#### a) 转录产物产量低或转录失败

模板的质量与产量密切相关, 实验组产量明显低于对照组可能原因有: ①可能是模板自身原因; ②实验模板中有抑制反应的成分。建议: ①重新纯化模板; ②确定模板定量及其完整性; ③延长反应时间; ④加大模板投入量; ⑤尝试其它的启动子和 RNA 聚合酶。

#### b) 产物电泳拖尾现象

可能原因有: ①实验操作过程被 RNase 污染; ②DNA 模板被 RNase 污染。建议: ①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 H<sub>2</sub>O 配制; ②重新纯化模板 DNA

#### c) RNA 转录长度大于预期

如果电泳后的条带大于目标条带, 可能原因有: ①质粒模板没有完全线性化; ②RNA 存在未

完全变性的二级结构; ③有义链 3'端为突出结构。

建议: ①确认模板结构, 检查模板是否完全线性化, 如有必要, 额外进行线性化; ②将电泳方式由琼脂糖胶换成变性胶来检测 RNA 产物。

#### d) RNA 转录长度小于预期

如果电泳后的条带小于于目标条带, 可能原因有: 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。

建议: ①降低反应温度 (比如, 30 $^{\circ}\text{C}$ ), 有时降低温度可以增加转录长度, 但会降低产量。②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。③若模板 GC 含量高, 采用 42 $^{\circ}\text{C}$  进行转录反应, 或者添加 SSB 蛋白提高转录效率。