

## 产品概述

宝锐生物自主研发的 T7 高效转录试剂盒针对不同模板、不同核苷酸类型,进行了一系列转录反应体系的优化,用户能通过本试剂盒高效地从 DNA 获得大量的 RNA 产物。该试剂盒使用识别 T7 启动子的 RNA 聚合酶,以含有 T7 启动子序列的质粒或者 PCR 产物为模板,以天然核苷酸或修饰的核苷酸为底物,通过短时间的体外转录,能够获得高产的单链 RNA。同时,底物中添加 Cap0 或者 Cap1 等帽子结构或帽子结构类似物,可通过本试剂盒转录产生具有帽子结构的完整 mRNA。

本试剂盒推荐使用 20 $\mu$ L 的体外转录体系,投入 1 $\mu$ g 的质粒模板或同等换算的 PCR 产物模板,使用天然或修饰的核苷酸,体外转录产量均达到 200 $\mu$ g 以上,通过工艺设计与优化,可实现用于克级别 RNA 的放大生产。转录合成的 RNA 可用于 RNA 性质与结构的分析。不具有帽子结构的单链 RNA 容易降解,我们建议针对项目需求进行下游处理,环状 RNA 需尽快进行下游的成环处理;线性 RNA 可通过牛痘病毒加帽系统(宝锐 BP-E05)和二氧甲基转移酶(宝锐 BP-E06)进行加帽处理;采用共转录加帽的 mRNA,可直接用于 mRNA 功能研究。

## 试剂组成

组分	货号	体积
ATP Solution (100mM)	BP-AS01-100	100 $\mu$ L
GTP Solution (100mM)	BP-AS02-100	100 $\mu$ L
CTP Solution (100mM)	BP-AS03-100	100 $\mu$ L
pUTP Solution (100mM)	BP-AS05-100	100 $\mu$ L
T7 RNA Polymerase	BP-E01	100 $\mu$ L
RNase Inhibitor (40U/ $\mu$ L)	BP-E02	100 $\mu$ L
Pyrophosphatase (0.1U/ $\mu$ L)	BP-E03	100 $\mu$ L
10 $\times$ Transcription Buffer	BP-AS08-100	100 $\mu$ L
Control Template+	BP-AS09-10	10 $\mu$ L
Precipitation Reagent	BP-AS10-1	1mL
DNase I (2U/ $\mu$ L)	BP-E04	50 $\mu$ L
10 $\times$ DNase I Reaction Buffer	BP-AS13-100	100 $\mu$ L
RNase-free ddH <sub>2</sub> O	BP-AS11-1	1mL

+ 试剂盒中阳性对照品用于验证体外转录反应的正常进行,不可用于下游应用。

## 保存条件

-20 $^{\circ}$ C 存储, 0 $^{\circ}$ C 以下运输。

## 自备材料

耗材: 无核酸酶 PCR 管, 无核酸酶移液枪头、RNA 纯化回收磁珠(如有必要)等。

模板: 带 T7 启动子的质粒模板、PCR 产物模板。

试剂: 无水乙醇。

## 实验流程

### 1. 模板制备

#### 1.1 质粒模板

质粒模板需要不受蛋白质和 RNA 的污染。大多数商业化制备的工业级别或临床级别质粒在 T7 高效转录试剂盒中表现良好。

#### 1.2 质粒线性化

质粒 DNA 必须在目的基因下游用限制性内切酶线性化才能被转录。即使只存在少量的环形质粒也会产生非常长的异质性 RNA 转录本, 通常需要在凝胶上检查线性化后回收的模板 DNA 是否被完全切割。

#### 1.3 线性化产物回收

按照以下条件结束线性化过程:

1/20 体积 0.5M EDTA

1/10 体积 3M 醋酸钠或 5M 醋酸铵

2×体积无水乙醇

混合均匀, 在-20°C沉淀 1h, 也可过夜沉淀, 随后在离心机中以大于 12000rpm 的转速将 DNA 颗粒化 15min。去上清, 再次离心 5-10s, 然后用 10μL 的移液枪小心地清除残留液体。在洁净工作台中尽可能吹干残留液体, 使乙醇完全挥发, 避免对下游酶活性产生抑制作用。最后使用 RNase-free ddH<sub>2</sub>O 溶解沉淀, 控制浓度约为 1μg/μL。

## 2. 体外转录

2.1 取出 T7 RNA Polymerase、RNase Inhibitor、Pyrophosphatase 立即放置在冰上; 取出 ATP Solution、GTP Solution、CTP Solution、pUTP Solution 室温下解冻之后立即转移至冰上; 涡旋 10×Transcription Buffer, 直到完全溶解, 一旦解冻, 放置在室温下, 并在室温条件下配制转录反应。

2.2 按下表依次加入各组分:

组分	体积
RNase-free ddH <sub>2</sub> O	Up to 20μL
ATP Solution	2μL
CTP Solution	2μL
GTP Solution	2μL
pUTP Solution	2μL
10×Transcription Buffer	2μL
RNase Inhibitor	1μL
Pyrophosphatase	2μL
T7 RNA Polymerase	2μL
Template	1μg

2.3 混匀

轻轻拨动试管或用移液枪将混合物上下吹打, 瞬间收集反应混合物至试管底部。

2.4 转录

使用带热盖的设备, 37°C至少反应 2h, 对于小片段的 RNA (≤300bp) 体外转录, 为了确保充足的产量, 建议延长体外转录的时间至 3h。在一定范围 (16h) 内延长体外转录的时间, 并不会对产物的质量产生影响。

2.5 消化模板 DNA

向反应体系中加入 1μL 的 DNase I 和 2μL 10×DNase I Reaction Buffer, 37°C继续反应 15min, 消化 DNA 模板。

2.6 反应终止

75°C加热 20min。

## 3. 纯化回收

3.1 加入 2×体积的 RNase-free ddH<sub>2</sub>O (预冷), 轻轻地用移液枪混匀 (请勿离心混匀)。

3.2 加入 2×体积的 Precipitation Reagent (-20°C保存), 轻轻地用移液枪混匀 (请勿离心混匀)。

3.3 -20°C放置 1h。

3.4 4°C, 15000rpm 离心 20min。

3.5 小心地移除上清, 用 500μL 70%乙醇清洗沉淀, 4°C, 15000rpm 离心 15min。

3.6 小心地去除 70%的乙醇, 根据下游实验的需要, 将 RNA 重新悬浮在对应的溶液或缓冲液中。测定 RNA 浓度, -80°C冷冻保存。

## 注意事项

1. 使用 PCR 产物模板或质粒模板时, 都需要保证模板中不含乙醇残留, 为此, 在溶解 DNA 沉淀时, 需要开盖使乙醇完全挥发, 此步骤可在洁净工作台中进行。

2. 体外转录的反应对 RNase 高度敏感, 反应体系须严格注意不要混入 RNase, 实验器材如移液枪头, EP 管严格使用 RNase-free 用品。体系的配制尽可能在无酶环境中配制, 可使用清洁后的洁净工作台进行此操作, 合成的 RNA 也尽可能避免在洁净工作台以外的区域开盖, 以避免 RNase 的污染。

3. 体系配制时请严格按照说明书中的加样顺序进行加样, 10×Transcription Buffer 需要在恢复至室温后使用, DNA 在低温下容易与亚精胺发生共沉淀, 影响转录产量, 体系配制过程中, DNA 模板应当是最后加入的组分。