T7 3.0 高效转录试剂盒
(含 N1-Me-pUTP)

货号：BP-09-20

2023V01

BiOri 宝锐生物

产品概述

在 IVT 反应过程中生成的副产物 dsRNA 会强烈刺激细胞内 RNA 受体，触发天然免疫信号。T7 3.0 高效转录试剂盒使用识别 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，且转录生产的副产物 dsRNA 含量显著降低。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 20μL 的体外转录体系，投入 1μg 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 180μg 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	40μL
GTP Solution（100mM）	BP-AS02-100	40μL
CTP Solution（100mM）	BP-AS03-100	40μL
N1-Me-pUTP Solution（100mM）	BP-AS07-100	40μL
T7 RNA Polymerase 3.0	BP-E11	40μL
RNase Inhibitor（40U/μL）	BP-E02	20μL
Pyrophosphatase（0.1U/μL）	BP-E03	20μL
10×Transcription Buffer	BP-AS08-100	40μL
Control Template+	BP-AS09-10	5μL
Precipitation Reagent	BP-AS10-1	1mL
DNase I（2U/μL）	BP-E04	20μL
10×DNase I Reaction Buffer	BP-AS13-100	40μL
RNase-free ddH_2O	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°C存储，0°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_2O 溶解沉淀，控制浓度约为 1μg/μL。

2. 体外转录

2.1 取出 T7 RNA Polymerase 3.0、RNase Inhibitor、Pyrophosphatase 立即放置在冰上；取出 ATP Solution、GTP Solution、CTP Solution、N1-Me-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_2O	Up to 20μL
ATP Solution	2μL
CTP Solution	2μL
GTP Solution	2μL
N1-Me-pUTP Solution	2μL
10×Transcription Buffer	2μL
RNase Inhibitor	1μL
Pyrophosphatase	2μL
T7 RNA Polymerase 3.0	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，瞬离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 2μL10×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_2O（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。