

T7 高产率 RNA 共转录试剂盒 (N1-Me-pUTP)使用说明书

01 产品信息

产品名称	货号	规格
T7 高产率 RNA 共转录试剂盒 (N1-Me-pUTP)	K102B01	20 rxns
	K102B02	50 rxns

02 产品描述

本试剂盒可用于体外转录合成 RNA。试剂盒使用 T7 Enzyme Mix，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 序列进行转录合成单链 RNA。在转录中可使用标记或者修饰的 NTPs 为底物来制备生物素或染料标记的 RNA。使用本试剂盒，1 μg 的 DNA 模板投入可产生 100-200 μg 的 RNA。转录合成的 RNA 可用于各种下游应用，如 RNA 的结构和功能研究、RNA 干扰和体外翻译研究等。

03 产品组分

组分	货号	
	K102B01 (20 rxns)	K102B02 (50 rxns)
T7 Enzyme Mix	40 μL	100μL
10 × Transcription Buffer	40μL	100 μL
100mM ATP	40 μL	100 μL
100mM CTP	40 μL	100 μL
100mM GTP	40 μL	100 μL
100mM N1-Me-pUTP	40 μL	100 μL
100mM 3OMe GAG Cap	30 μL	75 μL
DNase I (2 U/μL)	20 μL	50 μL
RNase-free Water	1 mL	1 mL
Control DNATemplate (0.5μg/μL)	10 μL	20 μL

04 运输及储存

干冰运输。-20℃保存，两年有效期。

05 实验流程

1.DNA 模板制备

带有双链 T7 启动子的线性化质粒或 PCR 扩增产物都可以作为体外转录模板，模板用 RNase-free water 溶解。

T7 启动子序列: TAATACGACTCACTATA*GG （注: A*为 RNA 开始转录的第一个碱基）。

1.1 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，建议线性质粒模板进一步纯化后体外转录，以避免 RNase、蛋白及盐残留对转录体系的影响。

1.2 PCR 产物模板

含有 T7 启动子的 PCR 产物可作为体外转录模板。PCR 扩增模板时将 T7 启动子(TAATACGACTCACTATAGG)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 产量。为了获得更高质量的 RNA，可将 PCR 产物用凝胶回收，再作为体外转录模板。

2. 体外转录

2.1 试剂化冻

将 T7 Enzyme Mix 短暂离心并置于冰上。解冻 10 × Transcription Buffer、ATP、GTP、CTP、N1-Me-pUTP 及 3OMe-GAG Cap，并短暂离心，置于冰上。10× Transcription Buffer 室温下放置。

2.2 转录反应

共转录加帽按如下体系准备反应：

组分	体积 (20 μL)
RNase-free Water	Up to 20 μL
10 × Transcription Buffer	2 μL
100mM ATP	2 μL
100mM CTP	2 μL
100mM GTP	2 μL
100mM N1-Me-pUTP	2 μL
100mM 3OMe-GAG Cap	1.5 μL
T7 Enzyme mix	2 μL
DNA Template	1 μg

注：

- (1) 反应应在37°C下进行。由于10 × Transcription Buffer中含有亚精胺，低温下亚精胺浓度过高可能会导致DNA模板析出。
- (2) 反应产物可能有白色沉淀物，这是反应中的游离焦磷酸与镁离子产生焦磷酸镁，但不会影响后续的实验。可以通过加入EDTA来清除。
- (3) 若在PCR仪中进行反应，热盖应打开，以防止时间过长反应溶液蒸发。
- (4) 所用试剂和容器必须为RNase-free。
- (5) Control DNA Template用于转录时，加入量为1 μL，作为试剂盒转录功能验证，使用不同的DNA模板的产量可能会有差异。

2.3 37°C 孵育 2.5h

将上述反应溶液混合，短暂离心至管底，37°C 孵育 2.5 h。如果转录本长度小于 100 nt 时，可将反应时间延长至 3-8 h。

2.4 DNase I 处理(可选)

反应完成后，每管加入 1μL DNase I，37°C孵育 15min，以去除模板 DNA。

3. 产物纯化

(1) RNA 磁珠纯化

- a. 提前从 4°C冰箱取出 RNA 磁珠，平衡至室温，以 RNase-free water 稀释转录产物至 50 μL。
- b. 倒置或涡旋使磁珠充分混匀，加入 2 倍体积的磁珠(100 μL)至 RNA 样品(50 μL)中，以移液器吹打 6 次以上。室温孵育 5 分钟，使 RNA 与磁珠结合。
- c. 将样品置于磁力架上 5 分钟。待溶液澄清后，小心除去上清液。

- d. 将样品置于磁力架上，加入 200 μL 新鲜配制的 80%乙醇（RNase-free water 配制）冲洗磁珠，室温孵育 30 秒，小心地除去上清。再重复 1 次该操作。
- e. 将样品置于磁力架上，打开盖子 5 分钟，风干磁珠。（注意：避免过度干燥。否则得到的 RNA 量会减少）。
- f. 将样品从磁力架上取下，加入 23 μL RNase-free water，移液器吹打 6 次以使样品混匀，室温孵育 5 分钟。
- g. 将样品置于磁力架上 5 分钟。待溶液澄清后，小心地将 20 μL 上清液转移到新的 RNase-free PCR 管中。（注意：转移上清时留下 2-3 μL 的液体，以免吸入磁珠影响后续实验。所得 RNA 极不稳定，请尽快进行下一步操作。如需保存，请在 -80°C 下保存。

(2) 氯化锂沉淀

氯化锂沉淀法要求 RNA 长度必须大于 300nt，且浓度不能小于 100 ng/ μL 。

- a. 在 20 μL 反应液中加入 30 μL RNase-free water，混匀，再加入 30 μL 8M 氯化锂溶液。
- b. 混匀后 -20°C 孵育 30 min， 4°C 下 12,000 rpm 离心 15 min，弃上清。
- c. 加入 500 μL 预冷的 70%乙醇洗涤 RNA 沉淀， 4°C 15,000 rpm 离心 15 min，弃上清。重复 2 次。
- d. 开盖干燥 2 min，加入 20 - 50 μL RNase-free water 或其他缓冲液溶解 RNA 沉淀。纯化后的 RNA 溶液保存在 -80°C 。

(3) 柱纯化

- a. 柱纯化可以去除蛋白和游离核苷酸。纯化前加入 80 μL RNase-free water 将产物稀释至 100 μL ，再按柱纯化说明书进行纯化。

4. RNA 定量

a. 紫外吸收法

A260 紫外吸收法测定 RNA 含量。

b. 染料法

使用 RiboGreen 染料定量 RNA，游离核苷酸不会影响定量，可以对纯化或未纯化的反应产物中的 RNA 准确定量。

5. RNA 大小和质量检测

a. 琼脂糖凝胶电泳

为了确定 RNA 的大小、完整性和质量，可采用琼脂糖凝胶电泳或聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。

b. Agilent 5200 毛细管电泳仪检测

Agilent 5200 电泳仪可用于评价 RNA 的完整性和质量。它只需要极少量的 RNA 样品进行分析。

06 注意事项

- a. 注意规范操作，不要在反应体系中引入 RNase。
- b. 实验耗材(如移液器枪头、PCR 反应管、离心管等)应严格使用 RNase-Free 产品。
- c. 为了您的安全和健康，请穿上实验室服，戴上一次性口罩及一次性手套。
- d. 本产品仅供研究使用。



常见问题可扫描上方二维码