



GSPure® T7 Co-transcription RNA Synthesis Kit (N1-Me-pUTP, CAP GAG)

产品简介

T7 共转录加帽 RNA 合成试剂盒 (N1-Me-pUTP, CAP GAG) 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, 加帽试剂 CAP GAG 以共转录方式被掺入 mRNA 的 5'端, 使客户能够简单快速地获得大量带有 Cap1 的 RNA 产物。Cap1 的添加可以保护 mRNA 免于降解, 从而确保 mRNA 的翻译效率。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。修饰核苷酸可以有效降低 mRNA 的免疫原性, 抑制先天免疫激活, 使 mRNA 可能成为再生医学、疾病治疗和细胞重编程的有力工具。

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。

产品规格

货号	产品	规格	保存条件
R0411	GSPure® T7 Co-transcription RNA Synthesis Kit (N1-Me-pUTP, CAP GAG)	50 rxns	-25°C ~ -15°C

性能优势

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。

下游应用

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。

产品组分

组分	50 reactions
T7 RNA polymerase mix 2.0	100 μL
10 \times Reaction buffer A	100 μL
10 \times Reaction buffer 4	100 μL
ATP(100mM)	100 μL
UTP(100mM)	100 μL
GTP(100mM)	100 μL
CTP(100mM)	100 μL
N1-Me-pUTP(100mM)	100 μL
帽子类似物 cap1(3'OH AG)(100mM)	80 μL



使用说明

1. 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 T7 共转录加帽 RNA 合成试剂盒体外转录的模板，模板可用 TE 缓冲液或 RNase-free ddH₂O 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 产物经纯化后做模板可得到更高的 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。

2. 共转录加帽反应

(1) 准备反应相关试剂，置于冰上融化；

(2) 在室温下按照下表的顺序进行加样：

组分	体积
无核酸酶水或 DEPC 处理水	X μ L
ATP(100mM)	2 μ L(10 mM Final)
GTP(100mM)	2 μ L(10 mM Final)
CTP(100mM)	2 μ L(10 mM Final)
UTP/N1-Me-pUTP(100mM) *	2 μ L(10 mM Final)
帽子类似物 cap1(3'OH AG)(100mM)	1.6 μ L
10 \times Reaction buffer A *	2 μ L
线性化模板 DNA	Y μ L(1 μ g)
T7 RNA polymerase mix 2.0	2 μ L
总体积	20 μ L

*UTP/ pUTP 两者根据需求选其一添加即可；

*共转录体系在使用 10 \times Reaction buffer A 时，若转录产量较低，可以改用 10 \times Reaction buffer 4。根据需要进行共转录帽类似物与修饰核苷酸，还可选择吉赛生物 T7 共转录加帽 RNA 合成试剂盒 (pUTP, CAP GAG(3'OMe)) /R0408、(pUTP, CAP GAG) /R0409、(N1-Me-pUTP, CAP GAG(3'OMe)) /R0410。

(3) 将试剂充分混合，37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h；

(4) 20 μ L 体系反应加入 10U DNase I 37 $^{\circ}$ C 处理 30 min。



3. 产物纯化

(1) **酚/氯仿纯化**: 可以去除蛋白和游离的核苷酸。

- 加入 160 μ L RNase-free ddH₂O 将反应产物稀释到 180 μ L, 并加入 20 μ L 3M 的乙酸钠 (pH=5.2), 用移液器吸打混匀;
- 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 5min, 将上层溶液转移至新的 EP 管中;
- 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;
- 加入 2 倍体积的无水乙醇, 混匀, -20 $^{\circ}$ C 孵育至少 30 min, 4 $^{\circ}$ C 离心 15 min, 弃上清;
- 加入 150 ~ 200 μ L 70%冰点乙醇洗涤 RNA 沉淀, 4 $^{\circ}$ C 离心 15 min, 弃上清;
- 开盖干燥 2 min, 加入 100 ~ 200 μ L RNase free ddH₂O 或其他缓冲溶液溶解 RNA 沉淀。

(2) **氯化锂纯化**: 可以去除蛋白和大部分游离的核苷酸。

- 加入等体积的氯化锂沉淀液 (5M) 到反应产物中;
- 混匀后于 -20 $^{\circ}$ C 沉淀 30 min, 4 $^{\circ}$ C 12,000 rpm 离心 15 min, 弃上清;
- 加入 200 μ L 70%冰点乙醇洗涤 RNA 沉淀, 4 $^{\circ}$ C 12,000 rpm 离心 15 min, 弃上清, 重复 2 ~ 3 次;
- 开盖干燥 5 ~ 10 min, 确定完全干燥后, 加入 100 ~ 200 μ L RNase-free ddH₂O 或其他缓冲溶液溶解 RNA 沉淀。

(3) **柱纯化**: 可以去除蛋白和游离的核苷酸。

(4) **磁珠纯化**: 可以去除蛋白和游离的核苷酸。

4. RNA 定量

(1) **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 A₂₆₀ 读数确定体外转录 RNA 的产量。对于单链 RNA, 1 A₂₆₀ \approx 40 μ g/mL。

(2) **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

1. 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；
2. 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、吸头和反应管进行体系配制；
3. 反应体系需要在室温下配制，避免在 4°C 时 DNA 与亚精胺发生沉淀；
4. 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；
5. 模板 DNA 线性化不完全，可能降低转录产物产量和纯度；
6. 转录 < 300 nt 的 RNA，可以用 2 μg 的模板，转录时间增加到 4 ~ 8 h；
7. 反应体系体积可根据实际需求按比例进行放大或缩小；
8. 本试剂盒含 2 管 10× Reaction buffer，优先使用 10× Reaction buffer A，共转录体系若在使用 10× Reaction buffer A 产量不佳时，可以使用 10× Reaction buffer 4；
9. 共转录体系 DNA 模板设计推荐以 AGG 为起始序列。

问题解答

1、转录产物产量低或转录失败

①可能是模板自身原因，建议重新纯化或线性化模板；②重新确认模板定量及完整性；③加大模板投入量；

2、产物电泳拖尾现象

①实验操作过程被 RNase 污染；②DNA 模板被 RNase 污染；

3、RNA 产物片段与预期不符

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，建议使用变性胶检测 RNA 产物；③模板 GC 含量高，可能形成高级结构；④RNase 污染；⑤模板序列中包含类似 T7 RNA 聚合酶终止序列，导致转录提前终止，建议尝试不同的 RNA 聚合酶。