



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

产品简介

T7 共转录加帽 RNA 合成试剂盒 (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 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 |
|-------|--|---------|---------------|
| R0409 | GSPure® T7 Co-transcription RNA Synthesis Kit (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 |
| 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/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、(N1-Me-pUTP, CAP GAG(3'OMe)) /R0410、(N1-Me-pUTP, CAP GAG) /R0411。

(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。