



## GSPure® T7 High Yield RNA Synthesis Kit (pUTP)

### 产品简介

T7 高产量 RNA 合成试剂盒 (pUTP) 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, 使客户能够简单快速地获得大量 RNA 产物。本试剂盒也能以修饰核苷为底物获得生物素、染料或放射性标记的 RNA, 以帽子结构或帽子类似结构为底物获得加帽的 RNA。本试剂盒内含常用的修饰核苷 pUTP 供转录需求选择使用。

本试剂盒一个反应能够转录获得 150 ~ 200  $\mu\text{g}$  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
R0406	GSPure® T7 High Yield RNA Synthesis Kit (pUTP)	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  $\mu\text{g}$  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, 也可通过加帽加尾产生 mRNA, 用于体外翻译、转染等下游应用。

### 产品组分

组分	50 reactions
T7 RNA polymerase mix 1.0	100 $\mu\text{L}$
10 $\times$ Reaction buffer A	100 $\mu\text{L}$
10 $\times$ Reaction buffer B	100 $\mu\text{L}$
ATP(100mM)	100 $\mu\text{L}$
UTP(100mM)	100 $\mu\text{L}$
GTP(100mM)	100 $\mu\text{L}$
CTP(100mM)	100 $\mu\text{L}$
pUTP(100mM)	100 $\mu\text{L}$



## 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 高产量 RNA 合成试剂盒体外转录的模板，模板可用 TE 缓冲液或 RNase-free ddH<sub>2</sub>O 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. RNA 合成

实验操作需要佩戴手套，使用无核酸酶污染反应管，以避免 RNase 污染。小体积的反应建议在不核酸酶污染的 PCR 管或八连管中进行。

#### (1) 常规 RNA 合成

- 将各组分在冰上解冻，混匀，瞬时离心收集于管底，冰上储存备用；
- 如果要同时进行多个反应，可以将 10× Reaction buffer 与 NTPs 等体积混合成 mix 混合液备用，每个反应加入 10μL mix 混合液；
- 在室温下按照下表的顺序进行加样：

组分	体积
无核酸酶水	X μL
10× Reaction buffer A	2 μL
ATP/CTP/GTP/UTP *(100 mM each)	2 μL each(10 mM each Final)
模板 DNA	Y μL(1 μg)
T7 RNA polymerase mix	2 μL
总体积	20 μL

\*如为减少产物的免疫原性，可将 UTP 等体积替换为本试剂盒中含有的 pUTP。

- 充分混匀，瞬时离心，37°C 孵育 2h；
- DNA 消化：为去除 DNA 模板，每 20μL 反应添加 10U of DNase I，混匀后瞬时离心，37°C 孵育 30min。



## (2) 加帽 RNA 合成

参照常规 RNA 合成步骤，除加样体系外存在区别。在室温下按照下表的顺序进行加样。

组分	体积
无核酸酶水	X $\mu\text{L}$
10 $\times$ Reaction buffer A **	2 $\mu\text{L}$
ATP/CTP/GTP/UTP *(100 mM each)	2 $\mu\text{L}$ each(10 mM each Final)
Cap analog (100 mM)	1.6 $\mu\text{L}$
模板 DNA	Y $\mu\text{L}$ (1 $\mu\text{g}$ )
T7 RNA polymerase mix	2 $\mu\text{L}$
总体积	20 $\mu\text{L}$

\*\*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 B。底物中的 UTP 可以用等量的修饰核苷进行替换。根据需要进行共转录帽类似物与修饰核苷，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、(N1-Me-pUTP, CAP GAG) /R0411。

## 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 $\mu\text{L}$  RNase-free ddH<sub>2</sub>O 将反应产物稀释到 180 $\mu\text{L}$ ，并加入 20 $\mu\text{L}$  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 $^{\circ}\text{C}$  孵育至少 30 min，4 $^{\circ}\text{C}$  离心 15 min，弃上清；
- 加入 150 ~ 200 $\mu\text{L}$  70%冰点乙醇洗涤 RNA 沉淀，4 $^{\circ}\text{C}$  离心 15 min，弃上清；
- 开盖干燥 2 min，加入 100 ~ 200 $\mu\text{L}$  RNase free ddH<sub>2</sub>O 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 $^{\circ}\text{C}$  沉淀 30 min，4 $^{\circ}\text{C}$  12,000 rpm 离心 15 min，弃上清；
- 加入 200  $\mu\text{L}$  70%冰点乙醇洗涤 RNA 沉淀，4 $^{\circ}\text{C}$  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  $\mu\text{L}$  RNase-free ddH<sub>2</sub>O 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  $A_{260}$  读数确定体外转录 RNA 的产量。对于单链 RNA， $1 A_{260} \approx 40 \mu\text{g/mL}$ 。

### (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  $\mu\text{g}$  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 $\times$  Reaction buffer，常规体系与修饰核苷体系建议根据说明书使用 10 $\times$  Reaction buffer A，共转录体系若在使用 10 $\times$  Reaction buffer A 产量不佳时，可以使用 10 $\times$  Reaction buffer B；
9. 常规体系 DNA 模板常设计为 GGG 为起始序列，是因为 T7 RNA 聚合酶对 GTP 有更高的亲和性；
10. 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

模板的质量与产量密切相关，实验组产量明显低于对照组可能原因有：①可能是模板自身原因；②实验模板中有抑制反应的成分。

建议：①重新纯化模板；②确定模板定量及其完整性；③延长反应时间；④加大模板投入量；⑤尝试其它的启动子和 RNA 聚合酶。

### 2、产物电泳拖尾现象

可能原因有：①实验操作过程被 RNase 污染；②DNA 模板被 RNase 污染。

建议：①实验过程中使用 RNase-free 的吸头和 EP 管，佩戴一次性乳胶手套和口罩，所有试剂均用 RNase free H<sub>2</sub>O 配制；②重新纯化模板 DNA。

### 3、RNA 转录长度大于预期

如果电泳后的条带大于目标条带，可能原因有：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；③有义链 3'端为突出结构。

建议：①确认模板结构，检查模板是否完全线性化，如有必要，额外进行线性化；②将电泳方式由琼脂糖胶换成变性胶来检测 RNA 产物。

### 4、RNA 转录长度小于预期

如果电泳后的条带小于于目标条带，可能原因有：①模板序列中包含类似于 T7 RNA 聚合酶的终止序列；②模板中 GC 含量高形成高级结构。

建议：①降低反应温度（比如，30℃），有时降低温度可以增加转录长度，但会降低产量；②不同的聚合酶识别不同的终止序列，若模板中含终止结构，建议尝试不同的 RNA 聚合酶；③若模板 GC 含量高，采用 42℃进行转录反应，或者添加 SSB 蛋白提高转录效率。