



GSPure® T7 Thermostable and High Yield RNA Synthesis Kit

产品简介

T7 耐高温高产量 RNA 合成试剂盒可在较高温度 50°C 下进行体外转录，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，获得 RNA 产物。T7 耐高温高产量 RNA 合成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。高温反应有助于减少 dsRNA 副产物的形成，减少转录产物 RNA 的免疫原性。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。

产品规格

货号	产品	规格	保存条件
R0405	GSPure®T7 Thermostable and High Yield RNA Synthesis Kit	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 ~ 200µg 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(Thermostable)	100µL
10× Hi-yield IVT Buffer A	100µL
ATP(100mM)	100µL
UTP(100mM)	100µL
GTP(100mM)	100µL
CTP(100mM)	100µL
N1-Me-pUTP(100mM)	100µL

运输与保存

≤0°C 运输；-25°C ~ -15°C 条件下可保存一年。



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 耐高温高产量 RNA 合成试剂盒体外转录的模板，模板可用 TE 缓冲液或 RNase-free ddH₂O 溶解。

(1) 质粒模板

带 T7 启动子的线性化质粒模板可以作为转录模板。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 产物经纯化后作模板可得到更高的 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无核酸酶污染的 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× Hi-yield IVT Buffer A 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	XμL
10× Hi-yield IVT Buffer A	2μL
ATP/CTP/GTP/UTP * (100 mM each)	2μL each (10 mM each Final)
DNA Template	YμL (1μg)
T7 RNA polymerase mix(Thermostable)	2μL
总体积	20μL

* 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 N1-Me-pUTP。

- 将试剂充分混合，37°C 孵育 2 h，如需高温反应，可以 50°C 孵育 1 h；
- 20μL 体系反应加入 10U DNase I，37°C 处理 30 min。



(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 μ L
10 \times Hi-yield IVT Buffer A	2 μ L
ATP/CTP/GTP/UTP * (100 mM each)	2 μ L each (10 mM each Final)
Cap analog(100 mM)	1.6 μ L
DNA Template	Y μ L (1 μ g)
T7 RNA polymerase mix(Thermostable)	2 μ L
总体积	20 μ L

* 本试剂盒不含 Cap analog，如需使用请另外购买。

3. 产物纯化

(1) 酚/氯仿纯化法：酚/氯仿抽提可去除蛋白和大部分游离核苷酸。

- 加入 160 μ L RNase-free ddH₂O 将反应产物稀释至 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 10,000rpm 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 30min，4 $^{\circ}$ C 离心 15min，弃上清；
- 加入 150~200 μ L 70%冰点乙醇洗涤 RNA 沉淀，4 $^{\circ}$ C 离心 15min，弃上清；
- 开盖干燥 2min，加入 100~200 μ L RNase free H₂O 或其他缓冲液溶解 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 或其他缓冲液溶解 RNA 沉淀。

(3) 柱纯化：柱纯化可以去除蛋白和游离核苷酸。

(4) 磁珠纯化：磁珠纯化可以去除蛋白和游离核苷酸。

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 最适终浓度为 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 μ 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、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；
- 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。