



## GSPure® T7 Low dsRNA and High Yield RNA Synthesis Kit

### 产品简介

T7 低 dsRNA 高产量 RNA 合成试剂盒经过 T7 RNA Polymerase 突变体的筛选与转录反应体系的优化，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，简单快速地获得大量 RNA 产物，同时产物中的 dsRNA 较低。T7 低 dsRNA 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。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
R0412	GSPure®T7 Low dsRNA 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(Low dsRNA)	100µL
10× IVT Buffer 9	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；避免反复冻融。



## 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 低 dsRNA 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× IVT Buffer 9 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
RNase-Free ddH <sub>2</sub> O	XμL
10× IVT Buffer 9	2μL
ATP/CTP/GTP/UTP * (100 mM each)	2μL each (10 mM each Final)
DNA Template	YμL (1μg)
T7 RNA polymerase mix(Low dsRNA)	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。

- 充分混匀，瞬时离心，37°C 孵育 2 h；
- DNA 消化：为去除 DNA 模板，每 20μL 体系反应加入 10U DNase I，混匀后瞬时离心，37°C 孵育 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
RNase-Free ddH <sub>2</sub> O	X $\mu$ L
10 $\times$ IVT Buffer 9	2 $\mu$ L
ATP/CTP/GTP/UTP * (100 mM each)	2 $\mu$ L each (10 mM each Final)
Cap analog(100 mM)	1.6 $\mu$ L
DNA Template	Y $\mu$ L (1 $\mu$ g)
T7 RNA polymerase mix(Low dsRNA)	2 $\mu$ L
总体积	20 $\mu$ 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 $\mu$ L RNase-Free ddH<sub>2</sub>O 将反应产物稀释至 180 $\mu$ L，并加入 20 $\mu$ L 3M 的乙酸钠 (pH=5.2)，用移液枪吸打混匀；
- 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 $\mu$ 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 $\mu$ L RNase-Free H<sub>2</sub>O 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 -20 $^{\circ}$ C 沉淀 30 min，4 $^{\circ}$ C 12,000 rpm 离心 15 min，弃上清；
- 加入 200 $\mu$ 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 $\mu$ L RNase-Free ddH<sub>2</sub>O 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 A<sub>260</sub> 读数确定体外转录 RNA 的产量。对于单链 RNA，1A<sub>260</sub>≈40 $\mu$ 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 RNase-Free ddH<sub>2</sub>O、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 2μg 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。