

使用说明书

T7 RNA Synthesis Kit

Cat. No. PC035 (50 reactions)

PC036 (100 reactions)

产品货号	产品内容	产品编号	规格	储存温度
PC035	T7 RNA Polymerase Mix	PC035-01	100 μ L	-20℃, 保存1年
	10 $\times$ IVT Buffer	PC035-02	100 μ L	-20℃, 保存1年
	ATP Solution (100 mM)	PC035-03	100 μ L	-20℃, 保存1年
	CTP Solution (100 mM)	PC035-04	100 μ L	-20℃, 保存1年
	GTP Solution (100 mM)	PC035-05	100 μ L	-20℃, 保存1年
	UTP Solution (100 mM)	PC035-06	100 μ L	-20℃, 保存1年
	Control DNA Template (0.5 μ g/ μ L)	PC035-07	10 μ L	-20℃, 保存1年
	LiCl Solution	PC035-08	1.2 mL	4℃, 保存1年
	DTT (100 mM)	PC035-09	50 μ L	-20℃, 保存1年
	ddH ₂ O (DNase/RNase Free)	QP006-07	2 $\times$ 1 mL	-20℃, 保存1年

■ 产品说明

T7 RNA Synthesis Kit 设计用于在体外生产大量 RNA。将T7 RNA Polymerase Mix、4种单独提供的核苷酸、和合适的线性 DNA 模板组合在一起, 就能方便地完成反应。该试剂盒还可以通过加入帽子类似物来合成有帽子的RNA; 或根据实验要求替换试剂盒中的UTP, 使用修饰的UTP来合成修饰的RNA。试剂盒还包含LiCl Solution, 用于去除转录产物的游离核苷酸、酶及大部分模板以获得粗纯化的RNA。

■ 应用

大量合成各种RNA, 包括但不限于:

1. 疫苗或基因表达用的mRNA
2. 环状RNA前体
3. 带有标记的RNA探针

■ 体外转录实验流程

1. 模版制备

转录序列上游含有双链 T7 启动子区域的线性化质粒 DNA、PCR 产物或合成的 DNA 片段都可用作 T7 RNA Synthesis Kit 体外转录的模板。

A) 质粒线性化

高纯度和线性化完全的质粒对于获得高产量和完整的 RNA 是必要的。直接使用未线性化的质粒产量会大幅降低且包含更多过长的副产物。为了制备大量特定长度的 RNA，必须将质粒完全线性化。可通过电泳进行质控，验证线性化 DNA 的单一性和完整性。同时线性化质粒的限制性酶切位点应产生平末端或 5' 突出末端。需要对线性化的质粒进行纯化后再做下游的转录实验。

B) PCR 产物

带有 T7 启动子的 PCR 产物可作为体外转录的模板。需要对 PCR 产物进行纯化后再做下游的转录实验。

C) 合成 DNA

合成的带有双链 T7 启动子序列的双链或单链的 DNA 可作为体外转录的模板。

2. 体外转录

A) 按照下表顺序，在冰上配置反应体系（先加水，最后加 DTT）：

组分	体积 (μL)	终浓度
ddH ₂ O (DNase/RNase Free)	Total 20	
10× IVT Buffer	2	1×
ATP/CTP/GTP/UTP Solution	2 each	10 mM
DNA template	x	1 μg
T7 RNA Polymerase Mix	2	
DTT	1	5 mM

B) 充分混匀后（请勿涡旋），瞬时离心，37℃反应2 h。

3. 使用 LiCl 沉淀法纯化 RNA

A) 分别加入等体积的RNase-free ddH₂O和等体积的LiCl溶液，充分混匀后瞬时离心。

B) 在-20℃孵育1 h以上。

C) 在4℃下以12000 rpm离心15分钟，以沉淀 RNA，弃上清，瞬离后用小枪头吸干净。

D) 加入500 μL预冷的70%乙醇洗涤沉淀，无需吹起沉淀。

E) 在4℃下以12000 rpm离心5分钟，弃上清，瞬离后用小枪头吸干净。

F) 置于金属浴 37℃ 开盖干燥 5 min, 加入 50-100 μL 65℃ 预热的 RNase-free ddH₂O 或其它缓冲液溶解 RNA, 加热时间隔性涡旋, 完全溶解需要 1~3 min, 将 RNA 储存在 -20℃ 或更低温度下。

4. (可选) 使用 DNase I (Cat. No. PC024) 去除 DNA 模版

加入 12 μL 10× DNase I Buffer 和 2 μL DNase I, 加 RNase-free ddH₂O 补足至 120 μL, 混匀后在 37℃ 孵育 10 分钟。反应后加入 60 μL LiCl 溶液, 进行纯化步骤。

■ 注意事项

1. T7 RNA Polymerase Mix 易氧化, 每次配制反应时加入 DTT 可保证其性能。DTT 请妥善保存, 勿常温久置或开盖久置。
2. 模板线性化不全会降低产物的产量及影响产物纯度。
3. 醇残留会极大影响 IVT 效率, 请保证回收的模板 260/230 在 2.2 以上。在用沉淀法回收时请保证每次离心后将上清吸干净; 在用过柱法回收时请保证两次乙醇洗涤后有空转去除乙醇的步骤。
4. 使用纯化的 PCR 产物作为模板时加入的模板量可降低。
5. 转录产物大小 <300 nt, 反应时间可延长至 4~16 h, 增加模板的起始量至 2 μg, 可增加短转录本的产量。
6. 模板浓度越大, 反应速度越快。模板浓度足够大后, 继续提高模板浓度只影响反应速度, 不影响产量, 要提高产量可配置多个反应或扩大反应体系。
7. 阳性模板为酶切线性化质粒模板, 编码 Gluc, 纯化后可转染测试。该模板的 T7 启动子后以 AG 起始, 兼容需要 AG 起始的帽子类似物。
8. LiCl 在 -20℃ 沉淀 RNA 时, 若冰箱温度不够低会导致沉淀效果下降, 推荐将产物放在 -20℃ 的密闭容器内进行醇浴, 或延长 -20℃ 的孵育时间。请不要置于 -80℃, 冻结后沉淀效果下降。
9. 用 LiCl 纯化 RNA 时, 加入 70% 乙醇前必须确认液体已完全移除, 否则会沉淀 NTP 导致最后浓度测量获得偏高的结果。
10. 用 DNase I 去除模板需在 LiCl 纯化后进行才能获得 qPCR 无法检出 DNA 模板的纯度。若只需粗纯化, 只用 LiCl 纯化即可, 因为 LiCl 不能有效沉淀 DNA 和蛋白质, LiCl 纯化后 DNA 模板的条带不可见。
11. LiCl 沉淀非常依赖于 RNA 浓度, 多次纯化时需保持 RNA 浓度高于 500 ng/μL。
12. LiCl 纯化 RNA 时, 37℃ 开盖干燥 5 min 是对 20 μL 体系产物而言的; 若扩大了反应体系, 需要延长干燥时间到 10 min 或者改为 65℃ 开盖干燥 1 min。注意不要过度干燥, 干燥指定时间后, 剩余液体一般为水。

PC035-091324

该产品仅限于实验科学研究用, 若有任何单位或个人将该产品用于临床诊断、治疗等其他国家专门规定的特殊用途, 本公司概不承担任何责任。



地址: 广州高新技术产业开发区广州科学城揽月路 3 号 F 区 F801
电话: 020-28069288 / 020-28069233

邮编: 510663
网址: www.igenebio.com