

T7高效体外转录试剂盒

T7 High Yield RNA Synthesis Kit

本产品需干冰运输；-20°C保存，保质期12个月。

货号规格

货号	规格
FEN101	50次

产品内容

组分	体积
T7 RNA Polymerase Premix	100 μ L
10 \times Reaction Buffer	100 μ L
DNase I(RNase-free, 2 U/ μ L)	50 μ L
ATP(Tris buffered, 75 mM)	100 μ L
GTP(Tris buffered, 75 mM)	100 μ L
CTP(Tris buffered, 75 mM)	100 μ L
UTP(Tris buffered, 75 mM)	100 μ L
Control Template(0.5 μ g/ μ L)	10 μ L
RNase-free ddH ₂ O	5 mL
Lithium Chloride Solution(6 mol/L)	1 mL

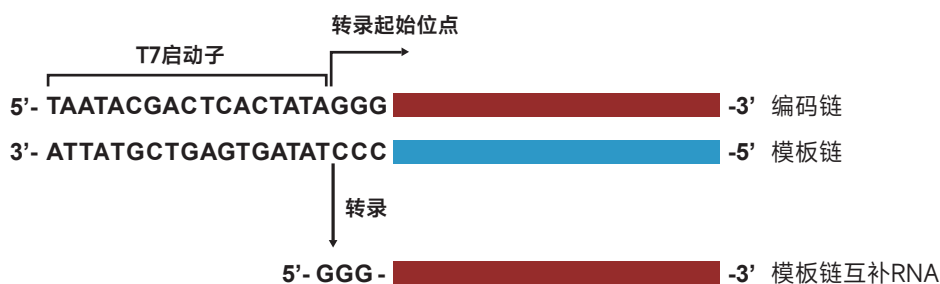
产品简介

本产品是一款基于T7 RNA聚合酶的RNA体外转录试剂盒，其可以含有T7启动子序列的线性双链DNA为模板，以NTPs为底物，从T7启动子下游开始合成与模板DNA中一条链互补的RNA，短时间内即可获得大量的RNA分子。此外，转录时也可在底物中添加修饰后的核苷酸，制备生物素或染料标记的RNA。

本试剂盒可兼容长转录本和短转录本的合成，添加0.5 μ g DNA模板，即可收获100~200 μ g RNA，其转录合成的RNA可用于体外翻译、反义RNA和RNAi以及RNA剪接等相关研究。

操作步骤

转录原理示意图



一、模板制备

带有双链T7启动子的PCR产物、线性化质粒以及合成的DNA片段均可作为本产品的体外转录模板，模板可用TE缓冲液或RNase-free ddH₂O进行溶解(推荐浓度为0.5 μg/μL)。

PCR产物模板(每个反应推荐用量为0.3~0.5 μg)

PCR扩增模板DNA时，将T7启动子序列(TAATACGACTCACTATAGGG)预先加在非编码链上游引物的5'端，即可扩增得到带有T7启动子的PCR产物，经电泳确认其单一性后，即可作为体外转录模板。

线性化质粒模板(每个反应推荐用量为1 μg)

带T7启动子的线性化质粒可作为体外转录模板，需确保其双链为平末端或编码链5'端为突出结构，且质粒的线性化程度和纯度会影响转录的产量及RNA的完整性。

注意：质粒线性化后，需经过纯化方可作为体外转录模板，以避免RNase、RNA、蛋白及盐残留对反应体系的干扰。

合成的DNA模板(每个反应推荐用量为0.3~0.5 μg)

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。

二、体外转录

进行体外转录实验操作，需佩戴一次性手套和口罩，并使用无核酸酶耗材和试剂，以避免引入RNase污染。

1. 将除T7 RNA Polymerase Premix外的其它组分振荡混匀，短暂离心收集于管底，置于冰上备用；
2. 按下表配制反应体系(根据DNA模板的长度确定其用量，推荐用量为0.3~1 μg)：

A. 合成非修饰 RNA

组分	体积
10 × Reaction Buffer	2 μL
ATP	2 μL
GTP	2 μL
CTP	2 μL
UTP	2 μL
T7 RNA Polymerase Premix	2 μL
DNA模板	x μL
RNase-free ddH ₂ O	up to 20 μL

B. 合成修饰 RNA

组分	体积
10 × Reaction Buffer	2 μL
ATP	2 μL
GTP	2 μL
CTP	2 μL
UTP	1.5 μL
Modified UTP(10 mM)*(用户自备)	3.75 μL
T7 RNA Polymerase Premix	2 μL
DNA模板	x μL
RNase-free ddH ₂ O	up to 20 μL

* 体系以Modified UTP为例，若使用其它Modified NTP底物，可参照UTP Solution与Modified UTP比例配制反应体系。



3. 用移液器轻柔混匀各组分，并短暂离心收集于管底，37°C 孵育 2 h；
注意：① 建议在 PCR 仪中进行反应，将热盖打开，以避免蒸发对反应体系造成影响；
② 可根据产物片段大小调整反应时长，如 RNA 产物小于 300 bp，可延长反应至 4 h 或更长时间，16 h 过夜反应对产物质量无影响。
4. (可选) 在反应体系中加入 1 μ L DNase I，37°C 孵育 15 min，去除 DNA 模板；
注意：相对于产物 RNA，模板 DNA 的含量非常低，一般不用去除。
5. RNA 产物经电泳分析及纯化后，即可用于下游实验。
注意：产物浓度极高，需用 RNase-free ddH₂O 稀释后再检测。

三、RNA 纯化

1. 向转录体系中加入等体积的 Lithium Chloride Solution，混匀，12,000 \times g 离心 2 min，小心吸弃上清；
2. 向离心管中加入 200 μ L 75% 乙醇，12,000 \times g 离心 2 min，小心吸弃上清；
3. 重复上一步操作；
4. 吸弃上清后，将离心管开盖室温置于通风处 5 min，以确保彻底去除残留的乙醇；
5. 加入 30~50 μ L 的 RNase-free ddH₂O 溶解 RNA。
注意：产物 RNA 纯化也可根据情况选择酚 / 氯仿纯化法或柱纯化法。

四、RNA 定量

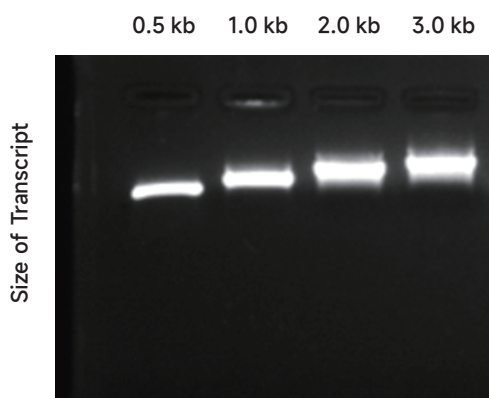
可选择以下方法进行 RNA 定量：

紫外吸收法：游离核苷酸会影响定量的准确性，定量前请先对 RNA 产物进行纯化；

染料法：用 RiboGreen 染料进行 RNA 定量，游离核苷酸不会影响定量，可以对纯化或未纯化的 RNA 产物进行准确定量。

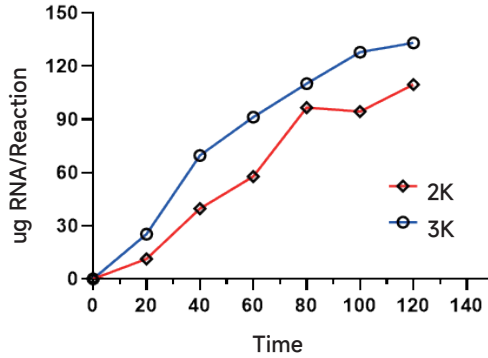
五、结果验证：

在标准体外转录反应体系中分别加入 0.5 kb、1.0 kb、2.0 kb 以及 3.0 kb 的 DNA 模板各 0.5 μ g，37°C 孵育 2 h，反应结束加入 1 μ L DNase I，37°C 孵育 15 min。最后进行 RNA 产物纯化，并通过核酸凝胶电泳进行检测，结果如下。



不同长度转录产物电泳图

在标准体外转录反应体系中分别加入2.0 kb和3.0 kb的DNA模板各0.5 μg ，每隔20 min对RNA转录产率进行统计，对于长片段DNA模板的体外转录，通常反应2 h即可得到100 μg 以上的RNA。



反应时间与RNA产量的关系

注意事项

1. 为了您的安全和健康,请穿实验服并戴一次性手套操作;
2. 本产品仅限科研使用。

常见问题

问题描述	可能原因	解决方案
转录产物产量低	①模板中存在抑制反应的成分; ②模板本身质量不佳。	对照组产量正常,但实验组产量低,说明模板本身存在问题,请尝试以下方案: a.重新纯化模板; b.进行模板定量并确认其完整性; c.延长37°C反应时间; d.加大模板用量; e.尝试其它的启动子和RNA聚合酶。
短片段转录产物产量低	转录起始片段短会抑制反应	转录产物小于0.3 kb时,延长反应时间或增加模板量可以提高RNA产量。 过夜反应(16 h)或者使用2 μg 模板可以使RNA产量最大化。
RNA产物片段长度大于预期	①质粒模板可能没有完全线性化; ②编码链3'端为突出结构; ③RNA存在未完全变性的二级结构。	①检查模板是否完全线性化,如有必要,额外进行线性化; ②选择合适的限制性酶,避免产生3'突出端,或者用Klenow Fragment或T4 DNA聚合酶补齐后,再进行转录; ③使用变性胶检测RNA产物。
RNA产物片段长度小于预期	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; ③RNase污染。	①尝试其它RNA聚合酶进行转录; ②采用42°C进行转录反应,或者添加SSB提高产量及转录长度。 ③佩戴一次性手套和口罩,并使用无核酸酶耗材和试剂,以避免引入RNase污染。
RNA产物电泳出现拖尾现象	①实验操作过程被RNA酶污染; ②DNA模板被RNase污染。	建议重新纯化模板DNA,并在实验过程中使用RNase-free的枪头和EP管,佩戴一次性手套和口罩,所有试剂均用RNase-free ddH ₂ O配制。