

Version 2

Code No. AG51201

InviTrans T7 体外转录试剂盒

InviTrans T7 In Vitro Transcription Kit

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc.



➤ 产品概述

本产品是一种利用 T7 RNA Polymerase 进行体外转录，在较短时间内获得大量 RNA 的试剂盒。以带有 T7 启动子的线性化质粒 DNA、PCR 产物或化学合成的 DNA 片段等为模板 (T7 启动子序列“TAATACGACTCACTATA”)，以 NTP 为底物，T7 RNA Polymerase 从 T7 启动子序列下游开始合成 RNA。本产品每个反应体系可合成 100 ~ 200 μ g 的 RNA，同时本产品可以转录长达 10 kb 的片段。转录合成的 RNA 产物可用于 RNA 结构与功能、RNA 酶保护、探针杂交、RNAi、显微注射、体外翻译和 mRNA 疫苗等研究。

➤ 产品组成

组分名称	AG51201 (50 rxns / 20 μ l)
10X In Vitro Transcription Buffer	100 μ l
NTP Mix (25 mM each)	400 μ l
T7 RNA Polymerase Mix	100 μ l
RNase free water	1 ml

➤ 保存及运输

保存温度：-20°C 保存

运输温度：干冰运输或 -20°C 冰袋运输。

➤ 产品优势

1. 本产品中的底物与酶均以预混液形式呈现，减少了实验步骤，简单方便。
2. 本产品转录的 RNA 产量较高，每个反应体系可获得 100 ~ 200 μ g 的高质量 RNA。

➤ 实验原理

T7 RNA Polymerase 可催化 DNA 片段中 T7 启动子序列下游 NTP 的掺入，从 5'→3' 方向生成与模板序列互补的 RNA，同时 T7 RNA Polymerase 可特异性识别启动子序列 (图 1 中下划线部分)。

T7 RNA Polymerase 的工作方式为：识别正义链(图 1 中的 A 链)的 T7 启动子序列，然后以反义链(图 1 中的 B 链)为模板，从 5'→3' 方向进行转录，转录生成的 RNA 序列与正义链一致。

注：转录起始位点后建议含 ≥ 3 个鸟嘌呤碱基，如转录起始位点后不足 3 个鸟嘌呤，需要在

设计引物时添加至 3 个鸟嘌呤碱基。

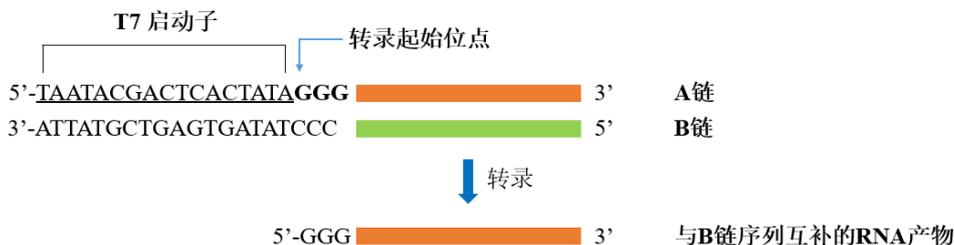


图 1: T7 体外转录过程

➤ 使用前注意事项

1. 请保持实验区域洁净，以避免核酸酶污染。
2. 实验所用的离心管、枪头等耗材均需 RNase-free 级别，以避免 RNase 污染。
3. T7 RNA Polymerase Mix 中甘油浓度较高，使用前短暂离心将所有的溶液收集至离心管底部，减少损失，并用移液器轻柔吸打混匀（避免起泡），然后再进行使用。
4. 10X In Vitro Transcription Buffer 使用前请充分溶解、混匀。
5. 所有反应混合液建议在冰上配制。

➤ 实验前准备

1. 试剂&耗材：

- 1) RNA 纯化试剂盒；
- 2) 0.2 ml RNase free PCR 管，1.5 ml 离心管。

2. 仪器：

PCR 仪、水浴锅或其他温控模块；酶标仪、Qubit 或 NanoDrop 微量分光光度计或其它等效仪器；桌面离心机、振荡器、移液器等。

➤ 操作方法

A. 体外转录模板制备

含 T7 启动子的线性化质粒、PCR 扩增产物或化学合成的 DNA 片段均可作为模板：

1. **线性化质粒：**向含有 T7 启动子的质粒载体中插入目的 DNA 片段，然后使用插入 DNA 片段中无识别位点的限制性内切酶对质粒进行线性化处理，线性化质粒需避免 3'突出端。（具体详见“常见问题与解决方法”。）

▲注：线性化模板建议进行纯化后使用。

2. **PCR 扩增产物：**体外转录时需要确保模板 5'端含有 T7 启动子序列，如果扩增用模板不含 T7 启动子序列，在设计引物时需要在上游引物的 5'端添加 T7 启动子序列，同时为提升体外转录效率建议在 T7 启动子序列前增加保护碱基“TTC”（即保护碱基“TTC”+ T7 启动子序列“TAATACGACTCACTATA”），建议选择高保真酶扩增以确保扩增的准确性。

▲注：PCR 产物需要电泳确认条带的单一性，并建议进行纯化后使用。

3. 化学合成含有 T7 启动子序列的 DNA 片段作为体外转录的模板。

B. 体外转录

以步骤 A 制备的 DNA 片段作为模板进行体外转录反应。

1. 按照下表在冰上配制体外转录体系：

组分名称	反应终浓度	20 μ l 体系
10X In Vitro Transcription Buffer	1X	2.0 μ l
NTP Mix (25 mM each)	10 mM	8.0 μ l
T7 RNA Polymerase Mix	-	2.0 μ l
DNA Template ^{*1}	-	1.0 μ g
RNase free water	-	Up to 20 μ l

*1：每个反应体系推荐加入 1 μ g DNA 模板进行体外转录，可根据转录情况在 0.1 ~ 1.5 μ g 范围内进行调整。

2. 体外转录反应程序：

温度	时间
37°C	2 h ^{*2}
4°C	Hold ^{*3}

*2：转录时间推荐 2 h，可根据实验需求在 1 ~ 8 h 的范围内进行调整，但转录小于 200 bp 的 RNA，建议转录时间延长至 4 h 或者更长时间。

*3：转录产物从仪器中取出后，需尽快进行后续实验操作，若无法及时进行后续的 **3.DNA 模板消化及 C.转录产物纯化及检测**，建议-80°C暂存。如需合成双链 RNA，可参考 <附录：双链 RNA (dsRNA) 合成的方法> 进行实验。

3. DNA 模板消化 (可选)：

转录反应完成后，如需进行 DNA 模板的去除，可加入 DNase I 以去除模板 DNA。

【推荐使用本公司的 DNase I (RNase Free)试剂盒(Code No. AG12001)；

推荐 20 μ l 的转录产物添加 2 μ l DNase I (5 U/ μ l)，37°C孵育 15 min。】

C. 转录产物纯化及检测

1. 转录产物纯化：

转录产物可以采用磁珠法、柱式法、层析法、酚/氯仿纯化、氯化锂沉淀等方法进行纯化，以去除残留的蛋白。纯化后的 RNA 可进行下游实验或于 -80°C 下暂存。

2. 转录产物检测：

转录产物浓度可能会很高，需要使用 RNase free water 稀释后再进行下述检测。

RNA 片段大小检测：电泳检测 RNA 产物的片段大小与质量。

RNA 浓度测定：使用酶标仪测定纯化后的 RNA 产物浓度，也可以使用 NanoDrop 微量分光光度计、Qubit 或其他等效仪器测定 RNA 产物浓度。

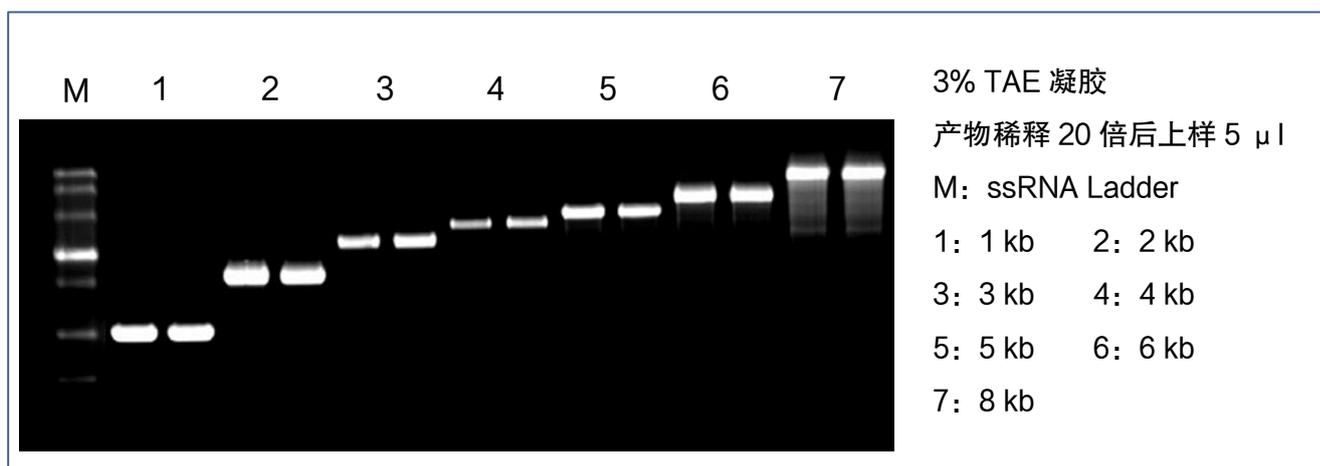
► 实验例

- 以 $1\mu\text{g}$ 含 T7 启动子的 DNA 片段为模板，采用本产品进行体外转录，可对长度在 $1\sim 8\text{ kb}$ 之间的片段进行转录。

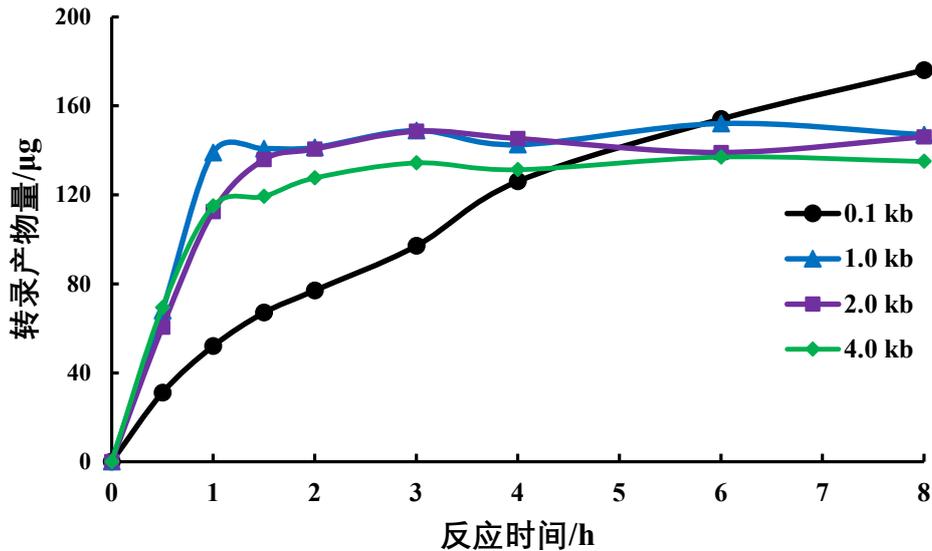
反应程序：

温度	时间
37°C	2 h

电泳结果如下图所示，图中 M 为 NEB 公司的 ssRNA Ladder (Code No. N0362S)：



- 分别以长度为 0.1 kb 、 1.0 kb 、 2.0 kb 、 4.0 kb ，模板量为 $1\mu\text{g}$ 的含 T7 启动子的 DNA 片段为模板，设置不同的反应时间 ($0.5\sim 8\text{ h}$)，采用本产品进行体外转录，结果如下图所示：



常见问题与解决方法

1. 转录产物产量低:

- ❖ 使用 PCR 方法扩增转录模板时, PCR 体系中的正向引物 (5'→3') 不包含保护碱基序列, 建议在 T7 启动子序列前加上保护碱基序列 (推荐使用序列: TTC)。
- ❖ 模板中存在干扰物质抑制反应, 需要重新纯化模板。
- ❖ 模板的投入量低导致产量低, 可适当增加模板的投入量。
- ❖ 转录的时间也会影响转录的产量, 本产品转录时间推荐 2 h, 如产量低可提升转录时间; 转录小于 200 bp 的 RNA, 建议转录时间延长至 4 h 或者更长时间。
- ❖ 实验过程中试剂受到 RNase 污染, 实验需使用无菌无酶的器具, 操作过程中戴一次性口罩和手套, 以防止 RNA 产物被污染或降解。

2. RNA 产物片段大小与预期不符:

- ❖ 质粒模板未完全线性化, 可能会导致 RNA 产物片段大于预期, 建议对线性化模板进行电泳确认条带单一。
- ❖ RNA 产物形成二级结构, 可能会导致 RNA 产物片段大于预期, 建议使用变性凝胶电泳。
- ❖ 对质粒上的目的基因进行线性化处理时形成 3'突出末端, 可能会导致 RNA 产物片段大于预期, 建议不要使用形成 3'突出末端的限制酶或对模板进行平滑化处理。
- ❖ DNA 模板序列中存在 T7 RNA Polymerase 的终止序列或与之相似的序列, 导致 RNA 产物片段小于预期, 建议尝试其他的 RNA 聚合酶。

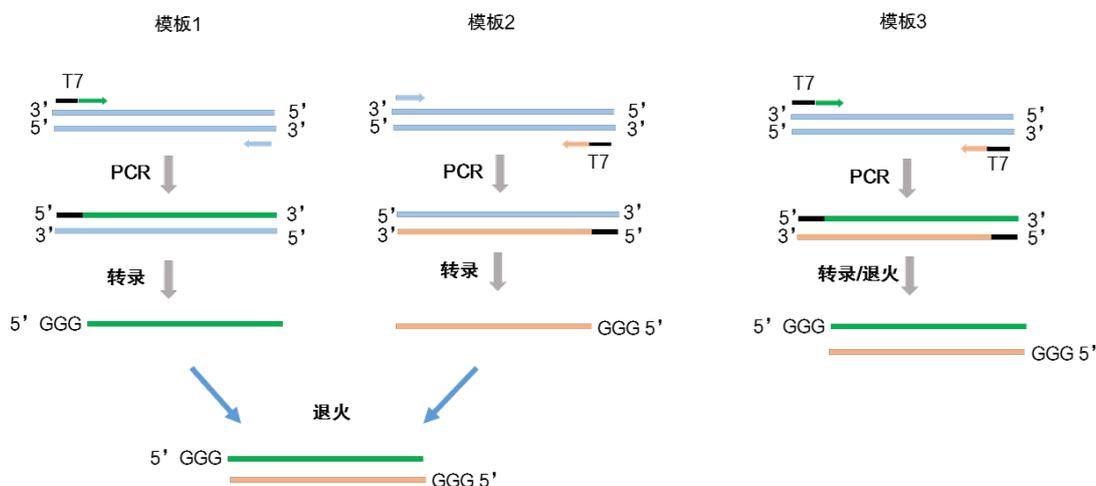
3. 产物电泳出现拖尾现象：

- ❖ 实验耗材存在 RNase 污染,实验所用的离心管、枪头等耗材均需 RNase-free 级别,以避免 RNase 污染。
- ❖ DNA 模板受到 RNase 污染,建议重新纯化模板。
- ❖ 操作过程中被 RNase 污染,操作过程中戴一次性口罩和手套,以防止 RNA 产物被污染或降解。

➤ 附录：双链 RNA (dsRNA) 合成的方法

1. 使用本试剂盒,可参考以下三种方法生产双链 RNA (如下图所示) :

- ① 参照本说明书的方法,将模板 1 和模板 2 分别在两个 PCR 管中转录,再将未纯化的转录产物 1 : 1 混匀,然后 70°C 孵育 10 分钟,缓慢冷却至室温退火形成 dsRNA。
- ② 参照本说明书的方法,将模板 1 和模板 2 在同一个 PCR 管中混合转录,退火成双链 RNA (同一个 PCR 管中,若片段小于 800 bp,产物可在反应过程中互补形成双链 RNA;若片段大于 800 bp,建议转录结束后,70°C 孵育 10 分钟,缓慢冷却至室温退火形成 dsRNA) 。
- ③ 用双端带启动子的模板 3 转录后退火成双链。一般情况下,方案①和②的转录产物量更高,建议按照方案①和②进行。



2. 退火形成的 dsRNA 5' 端含有 3 个 G,可使用 **RNase T1** 特异性的消化去除 3 个 G (用法及用量请参考对应厂家的 RNase T1 使用说明) 以及 DNase I 消化 DNA (可参考步骤 **<B. 体外转录>** 中的 DNA 模板消化步骤)。
3. 产物纯化,参照 **<C. 转录产物纯化及检测>** 步骤进行。