T7共转录RNA合成试剂盒（Cap1 AG/N1ψ）使用手册

上海合信成生物技术有限公司 #C3050　　50x30 μL反应

目录

1 简介 2
2 DNA 模板制备 3
2.1 质粒模板 3
2.2 PCR 模板 3
2.3 合成的 DNA 寡核苷酸 3
3 RNA 合成操作手册 4
3.1 标准 RNA 合成 4
3.2 带帽结构 RNA 合成 6
3.3 用修饰碱基合成 RNA 7
3.4 用修饰碱基合成帽结构 RNA 9
4 转录合成 RNA 的纯化 10
4.1 吸附柱纯化法 10
4.2 氯化锂沉淀法 11
4.3 酚氯仿萃取&乙醇沉淀法 11
5 反应产物的评估 11
5.1 紫外线吸收定量 11
5.2 通过凝胶电泳分析转录产物 12
6 实验问题排查 12
6.1 对照反应 12
6.2 全长 RNA 产量低 12
6.3 短片段 RNA 产量低 12
6.4 变性凝胶上的 RNA 弥散 12
6.5 RNA 的大小比预期的大 12
6.6 RNA 的大小比预期的小 13
订购信息 13
相关产品 15

T7共转录RNA合成试剂盒（Cap1 AG/N1ψ）包括：

试剂盒的所有成分均应储存在-20°C以下。每个试剂盒含有足够的试剂用于50 x 30µL反应。每个标准反应可以从1.5µg模板中合成多达260µg的RNA。

eGFP Control Template不可用于Cap1 AG合成具有帽结构的RNA。

10X Reaction Buffer ……165µL

ATP (100 mM) ……165µL

GTP (100 mM)……165µL

UTP (100 mM)……165µL

CTP (100 mM)……165µL

N1-ψ (100 mM)……80µL

Cap1 AG (100 mM)……65µL

Enzyme Mix1 ……45µL

T7 Enzyme Mix2……75µL

DNase I ……80µL

DNase I Buffer……80µL

eGFP Control Template (0.2 µg/µL) ……35µL

RNA Storage Buffer……2x2mL

RNase-free Water……2x2mL

合成RNA另外需要的材料（本试剂盒不包括）：

无核酶离心管和移液器吸头等耗材；

微量移液器；

目的DNA模板；

热循环仪或37°C培养箱；

RNA纯化试剂盒（推荐使用上海合信成生物货号 P3050，或者NEB货号T2050）。

1 简介

T7共转录RNA合成试剂盒设计用于体外快速生产大量的RNA。将反应缓冲液、NTP、酶1混合物、酶2混合物和合适的DNA模板组合在一起，就能方便地完成反应。该试剂盒还包含帽子类似物Cap1AG和修饰的核苷酸N1φ，可以用于合成具有AG帽子结构的RNA或N1φ修饰核苷酸的RNA。用该试剂盒合成的RNA可用于RNA结构和功能研究、核酶生物化学、具RNase保护

的探针试验和杂交印记、反义RNA和RNAi实验、芯片分析和显微注射，以及体外表达和RNA疫苗等方面。

2 DNA 模板制备

线性化质粒DNA、PCR产物或化学合成DNA寡核苷酸均可用作T7共转录RNA合成试剂盒体外转录的模板，前提是它们在要目的转录序列的上游含有双链T7启动子区域。如图1所示，其展示了最小的T7启动子序列以及经过T7聚合酶转录后的RNA。

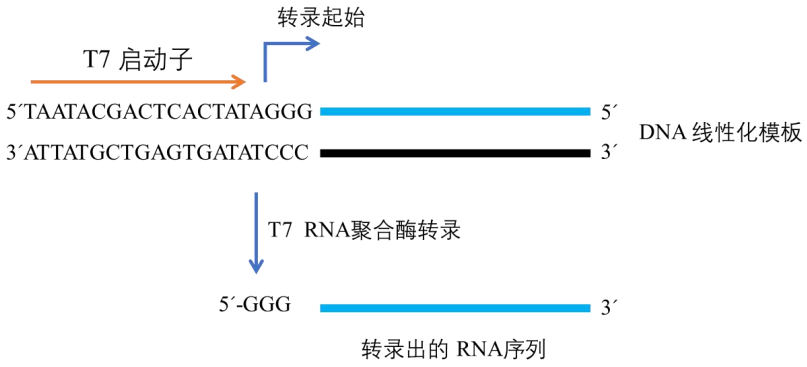

图1. T7 RNA聚合酶转录的起始序列

2.1 质粒模板

高度纯化、完全线性化的质粒模板对于使用T7共转录RNA合成试剂盒至关重要。模板DNA的质量会影响转录效率以及所合成RNA的完整性。合成RNA的产量与模板的纯度成正比。只要产品以超螺旋为主，不被RNase、蛋白质、RNA和盐类等污染，任何纯化方法都可以使用。质粒DNA必须在要转录的目的序列下游用限制内切酶完全线性化，才能要产生确定长度的RNA。相反，由于T7聚合酶的高处理能力，环状质粒模板会产生较多的长链异质性RNA。使用限制性内切酶对质粒DNA进行线性化后，建议硅胶膜吸附法或磁珠分离法纯化模板DNA。

2.2 PCR 模板

含有正确方向的T7启动子的PCR产物可以用于T7共转录RNA合成试剂盒的转录。虽然可以直接使用PCR反应后的混合物，但纯化后PCR产物的合成RNA产量更高，因此不建议直接使用未纯化的PCR产物。PCR产物可以按照上述质粒限制性内切酶消化的方案进行纯化。在将PCR产物用作T7共转录RNA合成试剂盒的模板之前，应检测其浓度，并在琼脂糖凝胶上确认扩增片段的大小。一般来说，在30μL体外转录反应中可使用0.15-1.5μg的PCR产物。

2.3 合成的 DNA 寡核苷酸

具有双链T7启动子序列的合成的DNA寡核苷酸，要么完全是双链，要么大部分是单链，

则可用于T7共转录RNA合成试剂盒的转录。一般来说，使用合成的DNA寡核苷酸作为转录模板的产量相对较低，而且还因合成寡核苷酸的序列、纯度和制备方法而异。

3 RNA 合成操作手册

我们强烈建议配戴手套和口罩，并使用不含核酸酶的离心管和试剂，以避免RNase的污染。标准反应为30μL，但也可以按需进行放大反应。反应应在无核酸酶的离心管或PCR管中进行。

3.1 标准 RNA 合成

1）解冻合成反应所需的试剂盒成分，试剂混匀后进行短暂离心以将溶液收集到离心管底部。放在冰上待用。

2）在室温下按以下顺序配制反应混合物：

试剂	使用量（μL）	终浓度
Nuclease-free water	X	
10x Reaction Buffer	3	1X
ATP (100 mM)	3	10 mM
GTP (100 mM)	3	10 mM
CTP (100 mM)	3	10 mM
UTP (100 mM)	3	10 mM
Template DNA	X	1.5μg
Enzyme Mix 1	0.825	
T7 Enzyme Mix 2	3	
总体积	30	

3）充分混匀并短暂离心，然后在37°C下孵育2小时。

反应时间取决于模板的数量、质量和RNA的长度。对长于0.3 kb的转录产物，2小时的孵育时间应能获得最高产量。反应时间在60分钟以内时，可使用水浴或加热金属模块；反应时间超过60分钟时，建议使用干燥空气培养箱或热循环仪，以防止样品蒸发。

对于短RNA（<0.3 kb）的转录产物，建议孵育时间为4小时或更长。如果将孵育时间延长至16小时（过夜）也是可行的。例如，我们用1.5 μg的质粒模板转录50-mer RNA，在37°C孵育过夜后就能获得很好的产量。

推荐短转录产物（<0.3 kb）的反应如下：

试剂	*使用量（μL）*	*终浓度*
Nuclease-free water	*X*	
10x Reaction Buffer	*3*	*0.67X*
ATP (100 mM)	*3*	*6.7 mM*
GTP (100 mM)	*3*	*6.7 mM*
CTP (100 mM)	*3*	*6.7 mM*
UTP (100 mM)	*3*	*6.7 mM*
Template DNA	*X*	*1.5μg*
Enzyme Mix 1	*0.825*	
T7 Enzyme Mix 2	*3*	
总体积	*45*	

上述体系与标准反应体系相比，用水量增加了15μL。但是其他试剂盒组分的使用体积保持不变。试剂盒中的材料足够进行50个反应。

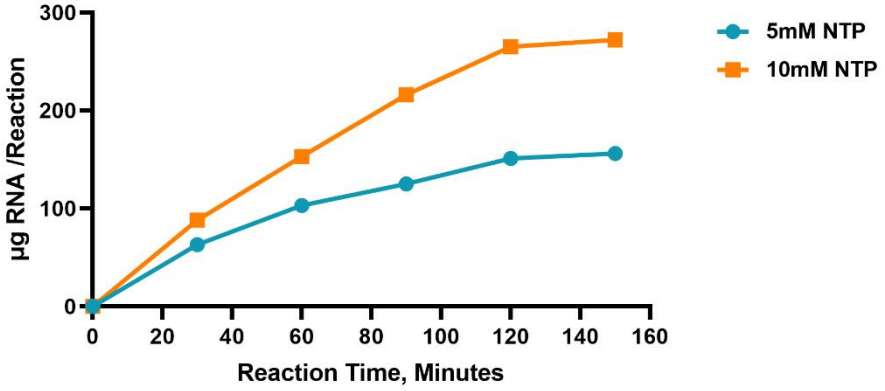

图2. 不同转录时间以及不同 NTP 含量的体外转录产量

在30μL标准反应中每个NTP分别使用3.0 μL和1.5 μL，从1.5 μg对照DNA模板转录合成961nt RNA的时间-产量曲线。

该反应在热循环仪中进行37°C孵育。转录产物通过RNA纯化试剂盒纯化（见货号P3050），使用NanoDrop进行RNA定量。

4）可选项：DNase I处理以去除DNA模板。按下表顺序在转录反应体系中加入试剂以去除模板DNA，混匀后在37°C孵育15分钟。

试剂	**标准反应用量（30μL）**	**短片段反应用量（45μL）**

DNase I Buffer	1.5μL	2.25μL
DNase I	1.5μL	2.25μL

5）对转录合成的RNA进行纯化（推荐使用上海合信成生物货号 P3050，或者NEB货号 T2050），再通过凝胶电泳分析转录产物。

3.2 带帽结构 RNA 合成

1）解冻合成反应所需的试剂盒成分，试剂混匀后进行短暂离心以将溶液收集到离心管底部。放在冰上待用。

2）在室温下按以下顺序配制反应混合物：

试剂	使用量（μL）	终浓度
Nuclease-free water	X	
10x Reaction Buffer	1.5	0.5X
ATP (100 mM)	1.5	5mM
GTP (100 mM)	1.5	5mM
CTP (100 mM)	1.5	5mM
UTP (100 mM)	1.5	5mM
Cap1 AG (100 mM)	1.2	4mM
Template DNA	X	1.5μg
Enzyme Mix 1	0.825	
T7 Enzyme Mix 2	1.5	
总体积	30	

3）充分混匀并短暂离心，然后在37°C下孵育2小时。对于短片段RNA（＜0.3 kb），建议孵育时间延长至16小时（过夜），以获得更佳产量。上述反应可获得80-130μg的RNA，并且加帽效率大于80%。

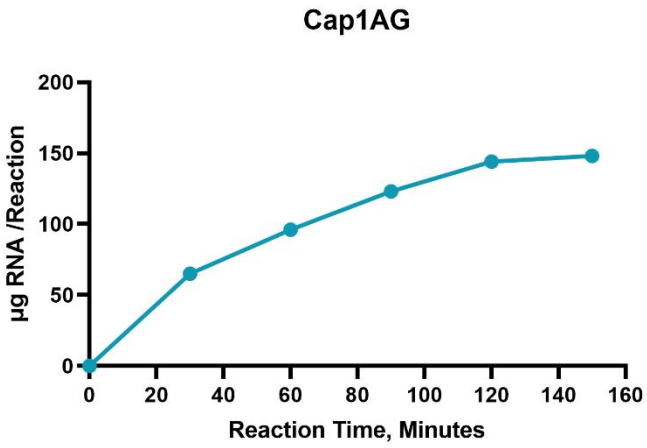

图3. 添加帽类似物 Cap1AG后的体外转录产量

该反应在热循环仪中进行37°C孵育。转录产物通过RNA纯化试剂盒纯化（见货号P3050），使用NanoDrop进行RNA定量。

4）可选项：DNase I处理以去除DNA模板。按下表顺序在转录反应体系中加入试剂以去除模板DNA，混匀后在37°C孵育15分钟。

试剂	**标准反应用量** **（30 µL）**
DNase I Buffer	1.5 µL
DNase I	1.5 µL

5）对转录合成的RNA进行纯化（推荐使用上海合信成生物货号 P3050，或者NEB货号 T2050），再通过凝胶电泳分析转录产物。

3.3 用修饰碱基合成 RNA

这个试剂盒按照下述操作指南，可以使用Biotin修饰或者荧光基团修饰（如Cy5、Cy3等）的碱基合成带修饰的RNA，推荐使用的修饰与未修饰碱基比是1:3。除N1-ψ外，本试剂盒不提供其他修饰碱基。

如果是使用N1-ψ或者ψ作为修饰碱基，推荐进行全取代修饰。下述操作以N1-ψ为例。

1）解冻合成反应所需的试剂盒成分，试剂混匀后进行短暂离心以将溶液收集到离心管底部。放在冰上待用。

2）在室温下按以下顺序配制反应混合物：

试剂	使用量（µL）	终浓度
Nuclease-free water	X	
10x Reaction Buffer	1.5	0.5X

ATP (100 mM)	1.5	5mM
GTP (100 mM)	1.5	5mM
CTP (100 mM)	1.5	5mM
N1-ψ (100 mM)	1.5	5mM
Template DNA	X	1.5μg
Enzyme Mix 1	0.825	
T7 Enzyme Mix 2	1.5	
总体积	30	

3）充分混匀并短暂离心，然后在37°C下孵育2小时。对于短片段RNA（＜0.3kb），建议孵育时间延长至16小时（过夜），以获得更佳产量。上述反应可获得100-150μg的RNA。

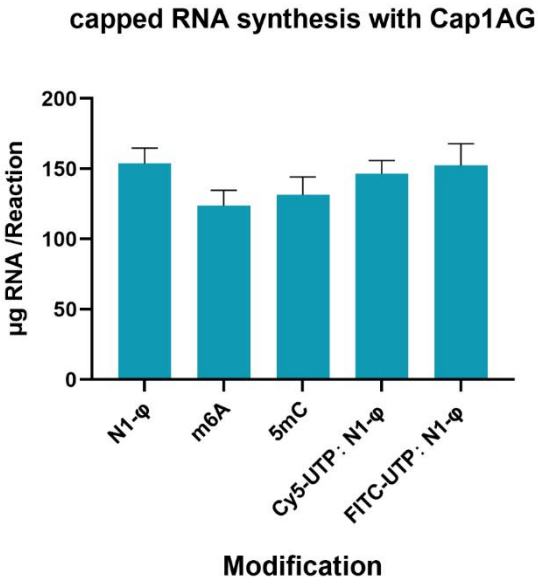

图4. 体外转录不同修饰 RNA 的产量

在30μL反应中使用不同修饰核苷酸取代，从1.5μg对照DNA模板转录合成961nt RNA的产量。该反应在热循环仪中进行37°C孵育。转录产物通过RNA纯化试剂盒纯化（见货号P3050），使用NanoDrop进行RNA定量。

4）可选项：DNase I处理以去除DNA模板。按下表顺序在转录反应体系中加入试剂以去除模板DNA，混匀后在37°C孵育15分钟。

试剂	**标准反应用量（30μL）**
DNase I Buffer	1.5μL
DNase I	1.5μL

5）对转录合成的RNA进行纯化（推荐使用上海合信成生物货号P3050，或者NEB货号T2050），再通过凝胶电泳分析转录产物。

3.4 用修饰碱基合成帽结构 RNA

下述操作以N1-ψ修饰碱基和Cap1 AG帽结构（试剂盒已提供）为例。

1）解冻合成反应所需的试剂盒成分，试剂混匀后进行短暂离心以将溶液收集到离心管底部。放在冰上待用。

2）在室温下按以下顺序配制反应混合物：

试剂	使用量（μL）	终浓度
Nuclease-free water	X	
10x Reaction Buffer	1.5	0.5X
ATP (100 mM)	1.5	5mM
GTP (100 mM)	1.5	5mM
CTP (100 mM)	1.5	5mM
N1-ψ (100 mM)	1.5	5mM
Cap1 AG (100 mM)	1.2	4mM
Template DNA	X	1.5μg
Enzyme Mix 1	0.825	
T7 Enzyme Mix 2	1.5	
总体积	30	

3）充分混匀并短暂离心，然后在37°C下孵育2小时。对于短片段RNA（＜0.3 kb），建议孵育时间延长至16小时（过夜），以获得更佳产量。上述反应可获得N1-ψ修饰碱基对UTP全取代100-150μg的RNA，并且加帽效率大于80%。

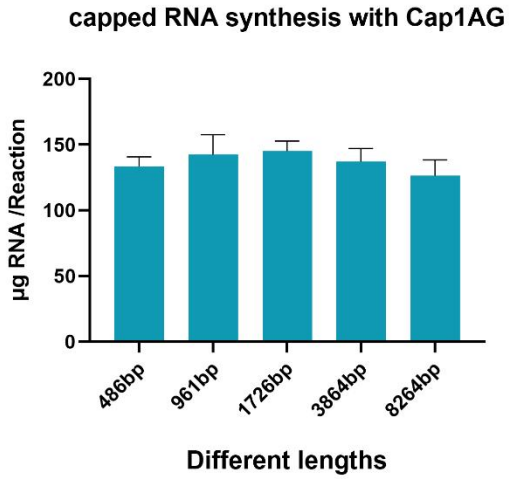

图5. 体外转录不同长度 RNA 的产量

在30µL反应中，从1.5µg不同DNA模板转录合成不同长度N1-ψ全取代修饰帽结构RNA的产量。该反应在热循环仪中进行37°C孵育。转录产物通过RNA纯化试剂盒纯化（见货号P3050），使用NanoDrop进行RNA定量。

4）可选项：DNase I处理以去除DNA模板。按下表顺序在转录反应体系中加入试剂以去除模板DNA，混匀后在37°C孵育15分钟。

试剂	标准反应用量 （30µL）
DNase I Buffer	1.5µL
DNase I	1.5µL

5）对转录合成的RNA进行纯化（推荐使用上海合信成生物货号P3050，或者NEB货号T2050），再通过凝胶电泳分析转录产物。

4 转录合成 RNA 的纯化

通过体外转录合成的RNA推荐进行纯化以获得高纯度的产物。合成RNA的纯化方法包括：吸附柱纯化法、氯化锂（LiCl）沉淀法和酚氯仿萃取&乙醇沉淀法。

4.1 吸附柱纯化法

吸附柱纯化法可以高效去除反应残留的核苷酸、蛋白和盐，并且使用便捷。我们推荐使用高纯度mRNA纯化试剂盒（上海合信成生物，货号P3050；NEB，货号T2050）。上述纯化试剂盒可以高效纯化长度小于0.3kb或者低浓度的RNA产物。详细的操作说明见试剂盒使用手册，并严格根据使用手册进行RNA产物纯化。

4.2 氯化锂沉淀法

使用氯化锂沉淀对合成RNA进行纯化可以去除反应残留的大部分NTPs和蛋白酶。但是，该方法对于长度小于0.3kb或者浓度小于0.1mg/mL的RNA产物的沉淀效果不佳。因此，推荐使用其他的纯化方法。

1）向转录反应体系中添加无核酶以调整反应的初始体积至50μL；

2）添加25μL氯化锂溶液（7.5 M LiCl, 10 mM EDTA），并充分混匀；

3）在-20℃孵育30分钟；

4）在冷冻高速离心机中，使用最高转速4℃离心15分钟进行沉淀；

5）移除上清液，并使用500μL冰浴的70%乙醇浸洗；

6）使用无核酶水重悬RNA产物。产物可直接用于下游应用或保存于-40℃以下。

4.3 酚氯仿萃取&乙醇沉淀法

酚氯仿萃取&乙醇沉淀对于去除蛋白和大部分的残留核苷酸的效果比较好。

1）向转录反应体系中添加无核酶以调整反应的初始体积至180μL；

2）加入20μL的3M乙酸钠（PH5.2）或者5M乙酸铵，然后充分混匀；

3）使用苯酚：氯仿体积比等于1：1的混合物进行萃取，随后再进行2次的氯仿萃取。收集上层水相并转移至新的离心管中；

4）加入2倍水相体积的乙醇以沉淀RNA。在-20℃下孵育大于30分钟，然后通过离心收集RNA沉淀；

5）移除上清液，并使用500μL冰浴的70%乙醇浸洗；

6）使用无核酶水重悬RNA产物。产物可直接用于下游应用或保存于-40℃以下。

5 反应产物的评估

5.1 紫外线吸收定量

RNA浓度可通过测量260nm波长处的紫外光吸光度来确定，但混合物中任何未结合的核苷酸和模板DNA都会影响读数。在量化RNA浓度之前，必须先去除转录反应中的游离核苷酸。将纯化的RNA样品按1:200稀释后，其吸光度读数应在分光光度计的线性范围内。如果使用NanoDrop One，则可能不需要稀释RNA。NanoDrop One可直接读取10-3000ng/μL的RNA浓度。对于单链RNA，A260吸光度为1可以等量于40μg/mL的RNA浓度，所以RNA浓度可以通过如下公式进行计算：

A260 x 稀释倍数 x 40 = _____μg/mL RNA

5.2 通过凝胶电泳分析转录产物

要评估转录产物的长度、完整性和质量，应将转录反应的等分试样在适当的变性琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶上检测。大于0.3kb的转录产物可在琼脂糖凝胶上检测，而小于0.3kb的转录产物则需要变性聚丙烯酰胺凝胶（5-15%）。凝胶应在变性条件下进行，以尽量减少转录产物二级结构的形成。

6 实验问题排查

6.1 对照反应

eGFP对照模板DNA是一个线性化质粒，含有在T7启动子转录控制下的eGFP基因。全长RNA的大小为961nt。对照反应应在2小时内产生≥ 220µg RNA（标准反应体系，不添加Cap和修饰碱基）。

如果对照反应无效，可能是反应设置过程中出现了技术问题。请仔细按照方案重复反应；采取一切预防措施避免RNase污染。如需技术支持，请联系CYNBIO。

eGFP对照模板是通过用PCR法获得的线性化模板，可直接用于开始标准反应。

6.2 全长 RNA 产量低

如果用您的模板进行转录反应生成了全长RNA，但产量明显低于预期，可能是DNA模板中的污染物抑制了RNA聚合酶，也可能是DNA浓度不正确。另外，可能还需要对DNA模板进行额外的纯化。建议采用硅胶膜吸附法或磁珠分离法。

6.3 短片段 RNA 产量低

延长孵育时间和增加模板量可获得较高的短转录产物（<0.3kb）产量。孵育反应长达16小时（过夜）或使用多达3µg的模板将有助于获得最高产量。

6.4 变性凝胶上的 RNA 弥散

如果RNA在变性琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶上出现降解（如弥散），则DNA模板或制备过程可能被RNase污染。被RNase污染的DNA模板会影响RNA合成的长度和产量（低于预期转录长度的涂片）。如果质粒DNA模板被RNase污染，应进行DNA纯化。强烈建议全程佩戴手套和口罩，以及使用无核酶的耗材。

6.5 RNA 的大小比预期的大

如果变性凝胶上的RNA比预期的要大，则模板质粒DNA可能未完全消化。即使是少量未消化的环状DNA也会产生大量长转录产物。检查模板是否完全消化，如果确认质粒未消化，则重复限制性酶消化。当RNA存在较强的二级结构而未完全变性时，也可观察到较大尺寸的

条带。

6.6 RNA 的大小比预期的小

如果变性凝胶分析显示存在比预期大小更小的条带，这很可能是由于聚合酶过早终止所致。一些与T7 RNA聚合酶终止信号相似的序列会导致过早终止。在较低温度下（如30°C）孵育转录反应可增加全长转录产物的比例，但产量会降低。对于富含GC的模板或具有二级结构的模板，在42°C下孵育可提高全长转录产物的产量。

订购信息

货号	产品名称	规格
C3050	All In One High-Yield T7 Co-Transcription Kit (Cap1AG/N1ψ)	50rxns

本产品仅用于科学研究使用，不用于人类或动物的治疗或诊断目的。

相关产品

货号	产品名称	产品类型	规格
C3050	All In One High-Yield T7 Co-Transcription Kit (Cap1AG/N1ψ)	NA	50rxns
P3050	High Pure mRNA CleanUp Column Kit (1mg)	NA	30uL*50 rxns
L0250	mRNA Ladder	NA	50 gel lanes
Cm0350	Combo试剂盒	NA	C3050+ P3050+ L0250
110109	EGFP-L- Cap1 AG（N1）	mRNA	100ug/500ug/1mg/5mg
110209	Fluc-L- Cap1 AG（N1）	mRNA	100ug/500ug/1mg/5mg
110509	Cre-L- Cap1 AG（N1ψ）	mRNA	100ug/500ug/1mg/5mg
110409	Cas9-L- Cap1 AG（N1ψ）	mRNA	100ug/500ug/1mg/5mg
110709	OVA-L- Cap1 AG（N1ψ）	mRNA	100ug/500ug/1mg/5mg
110609	EPO-L- Cap1 AG（N1ψ）	mRNA	100ug/500ug/1mg/5mg
110309	mCherry-L- Cap1 AG（N1ψ）	mRNA	100ug/500ug/1mg/5mg
210509	tdTomato-L- Cap1 AG（N1ψ）	mRNA	100ug/500ug/1mg/5mg
110126	EGFP-L- Cap1 AG（N1ψ）	mRNA-LNP	100ug/500ug/1mg/5mg
110226	FLUC-L- Cap1 AG（N1ψ）	mRNA-LNP	100ug/500ug/1mg/5mg
110326	mCherry-L- Cap1 AG（N1ψ）	mRNA-LNP	100ug/500ug/1mg/5mg
210526	tdTomato-L- Cap1 AG（N1ψ）	mRNA-LNP	100ug/500ug/1mg/5mg
110726	OVA-L- Cap1 AG（N1ψ）	mRNA-LNP	100ug/500ug/1mg/5mg
110626	EPO-L- Cap1 AG（N1ψ）	mRNA-LNP	100ug/500ug/1mg/5mg

如需提供质粒基因合成、模板线性化、线性/自复制/环状mRNA定制合成、LNP包裹、LNP定制和抗体—LNP靶向递送等服务，请咨询：021-52277692

销售热线：021-52277692

客服邮箱：sales@cynbio.cn