

EasyCap T7 Co-transcription Kit

Cat# NT0001

产品概述

EasyCap T7 Co-transcription Kit 中包含 T7 RNA 聚合酶、NTPs 底物、10×转录 buffer、帽子以及对照 DNA。该试剂盒经过体外转录反应验证和优化，能够对含有 T7 启动子序列的线型双链 DNA 中启动子下游序列进行转录，高效合成单链 RNA。该产品以共转录方式合成不同长度转录本，转录合成的 RNA 可用于 RNA 结构与功能研究、RNA 酶保护、探针杂交、RNAi、显微注射及体外翻译等多方面的下游应用中。

转录时可在底物中加入修饰的核苷酸，从而制备生物素或染料标记的 RNA。

产品/组分信息

组分编码	产品组分	NT0001-10T	NT0001-50T
NT0001-10T/50T-1	T7 RNA Polymerase Mix	20 μ L	100 μ L
NT0001-10T/50T-2	10×Transcription Buffer	20 μ L	100 μ L
NT0001-10T/50T-3	ATP (100mM)	20 μ L	100 μ L
NT0001-10T/50T-4	CTP (100mM)	20 μ L	100 μ L
NT0001-10T/50T-5	GTP (100mM)	20 μ L	100 μ L
NT0001-10T/50T-6	N1-Me-pUTP (100mM)	20 μ L	100 μ L
NT0001-10T/50T-7	NT1001-CAP GAG (100mM)	20 μ L	100 μ L
NT0001-10T/50T-8	Control DNA (500ng/ μ L)	10 μ L	10 μ L

储存方式

-25°C ~ -15°C 保存。

使用说明

1. DNA 模板制备

带有双链 T7 启动子的线性化质粒或 PCR 扩增产物都可以作为 T7 Co-transcription RNA Synthesis Kit 体外转录模板，模板可以用 TE 缓冲液或 RNase free H₂O 溶解。

1.1 质粒模板

将目的 DNA 插入含有 T7 启动子的质粒载体中，然后用限制酶进行处理，待完全线性化后进行纯化。

【注】：

- 环状质粒由于没有有效的终止，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。
- 质粒线性化所选限制酶需要在启动子区域右侧、插入 DNA 片段的下游，且在插入 DNA 片段中无识别位点。选择的限制酶要能形成 5'突出或者平滑末端。
- 为了避免蛋白及盐离子等对体系的影响，质粒线性化后建议纯化后再作为模板进行体外转录。

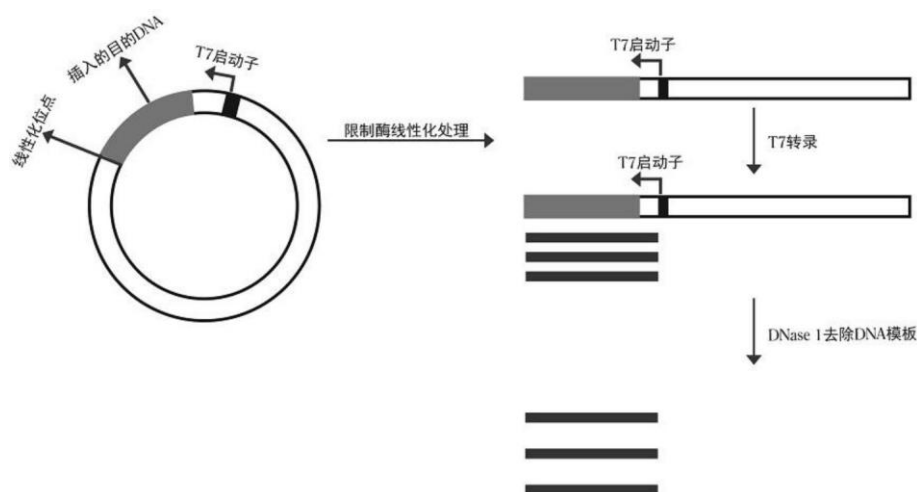


图 1 以线性化质粒为模板进行的体外转录过程

1.2 PCR 产物模板

带 T7 启动子的 PCR 产物可以作为体外转录模板。首先将 T7 启动子序列 (TAATACGACTCACTATA) 加在有义链的上游引物的 5'端, 然后在高保真酶的作用下扩增含 T7 启动子的 DNA 模板, 随后进行转录。PCR 产物可以不经纯化直接作为模板, 但纯化后会得到更高的 RNA 产出。

【注】:

- PCR 产物作为模板时须电泳确认产物的特异性及浓度。
- 为了得到更多高品质的 RNA, 推荐 PCR 产物胶回收之后再作为模板进行体外转录。

2. RNA 体外转录

2.1 试剂准备

将 T7 RNA Polymerase Mix 短暂离心, 置于冰上。将 10×Transcription Buffer 置于室温复温, 核糖核苷酸 (ATP、CTP、GTP、N1-Me-pUTP、NT1001-CAP GAG) 于冰上解冻后, 均混匀并离心至管底。

2.2 反应体系制备

组分	体积 (μL)	终浓度
RNase free H ₂ O	Up to 20	-
10×Transcription Buffer	2	1 ×
ATP/CTP/GTP/N1-Me-pUTP (100mM each)	2 each	10mM each
NT1001-CAP GAG (100mM)	2	10mM
Control DNA (500ng/μL)	1 μg	-
T7 RNA Polymerase Mix	2	-

【注】:

- 反应于室温配置。由于 10×Transcription Buffer 中含有亚精胺, 低温下亚精胺浓度过高会引起 DNA 模板沉淀。
- 短转录本 (<100nt), 模板可使用 2μg, 转录时间增至 4-8 个小时。
- 长转录本 (>1000nt), 建议使用质粒线性化模板进行转录。
- 建议在 PCR 仪中进行反应, 热盖打开, 防止长时间导致反应液蒸发。
- 反应产物可能有白色沉淀。这是反应过程中游离的焦磷酸与反应液中的镁离子形成焦磷酸镁, 不影响后续实验。如想去除, 添加 EDTA 即可消失。添加 EDTA 如果影响后续实验, 也可以离心回收上清。
- 使用试剂、容器等无 RNase 污染。

2.3 将反应体系混合后，短暂离心至管底，37°C 孵育 2-3 个小时。若转录本长度小于 100nt，增加反应时间至 4-8 个小时。

2.4 （可选）反应完成后，每管加入 2μL DNase I (RNase free)，37°C 孵育 15min 以去除模板 DNA。

3. 产物纯化

转录后的 RNA 可以选用 RNA Cleaner 磁珠进行纯化，也可以采用酚/氯仿纯化法，氯化锂沉淀法或柱纯化等，以去除蛋白、游离的核苷酸。纯化后的 RNA 经电泳检测后可进行下游实验或存储于 -80°C。

4. RNA 定量

4.1 紫外吸收法

游离核苷酸会影响定量的准确性，采用此方法前请先进行 RNA 纯化。然后通过测定产物的 A260 读数来确定 RNA 的产量。对于单链 RNA，1 A260 相当于 40μg/mL，所以 RNA 的产量可以如下计算：

$$A260 \times \text{稀释倍数} \times 40 = \mu\text{g/mL RNA}$$

4.2 染料法

用 RiboGreen 染料进行 RNA 定量，游离核苷酸不会影响定量，可以对纯化或未纯化的反应产物中的 RNA 进行准确定量。

5. RNA 大小及质量检测

5.1 为了确定 RNA 的大小，完整度以及质量，需要进行琼脂糖凝胶电泳或聚丙烯酰胺凝胶电泳进行检测。

5.2 毛细管凝胶电泳法

毛细管凝胶电泳法可以用来评估 RNA 完整度及质量，它仅需要少量的 RNA 进行分析，高品质的 RNA 在图谱上应呈现明显且锐利的峰。

常见问题及解决方案

1. 转录产量低

模板的质量与产量密切相关，实验组产量明显低于对照组可能原因有：①实验模板中有抑制反应成分；②实验模板本身原因。

建议：①重新纯化模板；②确定模板定量以及其完整性；③延长反应时间；④加大模板投入量；⑤尝试其它的启动子和 RNA 聚合酶。

2. 短转录本产量低

转录起始片段短会抑制反应，转录产物小于 100nt 时，延长反应时间至 4-8 小时或增加模板量至 2ug 可以提高 RNA 产量。

3. RNA 转录长度大于预期

如果电泳显示产物条带大于预期大小，可能原因：①质粒模板可能没有完全线性化；②有义链 3'端为突出结构；③RNA 存在未完全变性的二级结构。

建议：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。

4. RNA 转录长度小于预期

如果电泳显示产物条带小于预期大小，可能原因：①模板包含类似于 T7 RNA 聚合酶的终止序列；②模板中 GC 含量高。

建议：①降低反应温度（比如，30°C），有时降低温度可以增加转录长度，但会降低产量。或者尝试不同的 RNA 聚合酶进行转录；②若模板 GC 含量高，采用 42°C 进行转录反应，或者添加 SSB 提高产量及转录长度。

5. 转录产物电泳拖尾

电泳过程中有拖尾现象，可能原因：①实验操作过程被 RNase 污染；②DNA 模板被 RNase 污染。

建议：①实验过程中使用 RNase-free 的枪头和 EP 管，佩戴一次性乳胶手套和口罩，所有试剂均用 RNase free H₂O 配制。②重新纯化模板 DNA。

注意事项

1. 反应体系中须严格注意不要混入 RNase。
2. 实验器材（如：枪头、产品管等）注意严格使用 RNase free 用品。
3. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

Technical Support

Copyright © 2023 CYTOCH, All Rights Reserved. The CYTOCH logo is a registered trademark.

To place an order or to obtain a product information, please go to: www.cytoch.com.

Or contact us by:

E-mail: support@cytoch.com

Tel: 400-969-8881

For research use only.

