Version 1

Code No. AG51202

InviTrans T7 体外转录试剂盒(Low dsRNA)

InviTrans T7 In Vitro Transcription Kit (Low dsRNA)

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.

ACCURATE BIOLOGY 艾科瑞生物

➢ 产品概述

本产品是大肠杆菌重组表达来源的噬菌体 T7 RNA 聚合酶，是对野生型 T7 进行了改造优化，突变得到的可以大幅度降低 dsRNA 含量的 T7 RNA 聚合酶。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 μg 的 RNA，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	AG51202 (50 rxns / 20 μl)
10X In Vitro Transcription Buffer	100 μl
NTP Mix (25 mM each)	400 μl
T7 RNA Polymerase Mix(Low dsRNA)	100 μl
RNase free water	1 ml

➢ 保存及运输

保存温度：-20℃保存

运输温度：干冰运输或-20℃冰袋运输。

➢ 产品优势

1. 本产品中各组分均以即用型预混液形式呈现，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 μg 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。

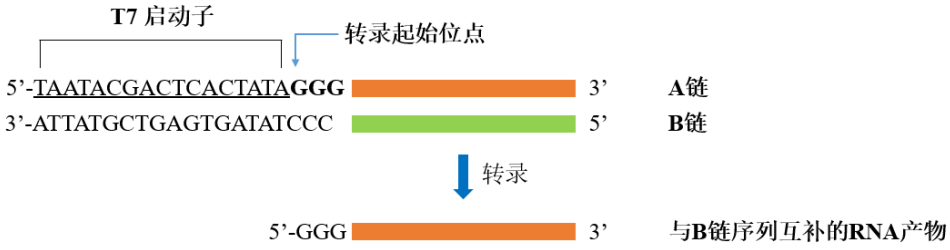


图 1：T7 体外转录过程

➢ 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(Low dsRNA) 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 μl 体系
10X In Vitro Transcription Buffer	1X	2.0 μl
NTP Mix (25 mM each)	10 mM	8.0 μl
T7 RNA Polymerase Mix(Low dsRNA)	–	2.0 μl
DNA Template*1	–	1.0 μg
RNase free water	–	Up to 20 μl

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

2. **体外转录反应程序：**

温度	时间
37℃	2 h*2
4℃	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℃暂存。

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 μl 的转录产物添加 2 μl DNase Ⅰ(5 U/μl)，37℃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℃下暂存。

2. 转录产物检测：

转录产物浓度可能会很高，需使用 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。

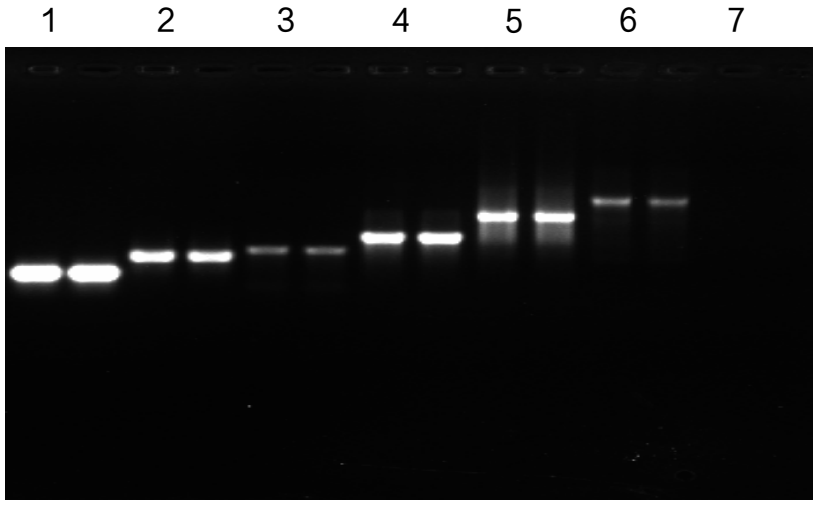
➢ 实验例

1. 以 1μg 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 1～8 kb 之间的片段进行转录。

反应程序：

温度	时间
37℃	2 h

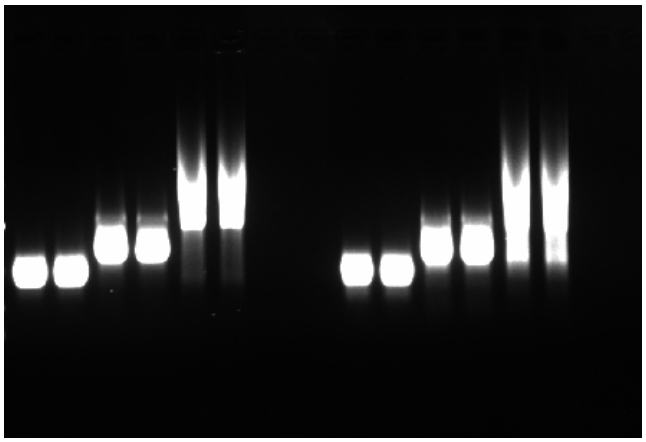
电泳结果如下图所示：（产物稀释 5 倍电泳）



1% TAE 凝胶

1：0.7 kb　2：1.0 kb
3：1.5 kb　4：2.0 kb
5：5.2 kb　6：8.0 kb
7：Blank

2. 分别以长度为 1.0 kb、2.0 kb、5.0 kb，模板量为 1μg 的含 T7 启动子的 DNA 片段为模板，采用本产品以及野生型 T7 RNA polymerase 进行体外转录，转录时间 2h，结果如下图所示：



1% TAE 凝胶

T7 RNA polymerase-WT

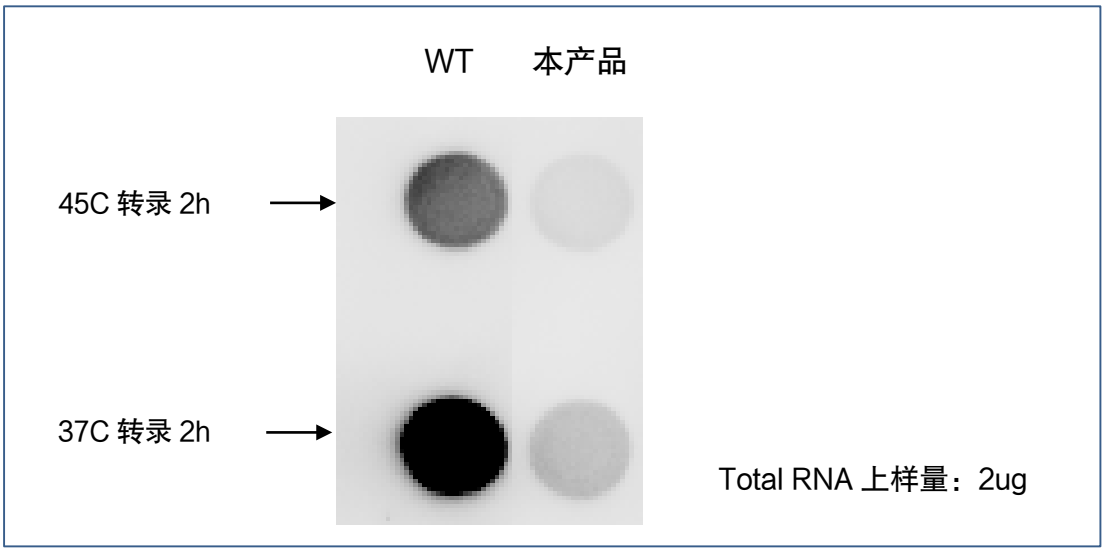
1：1 kb　2：2kb
3：5 kb

T7 RNA polymerase-Mutant

4：1 kb　5：2 kb
6：5 kb

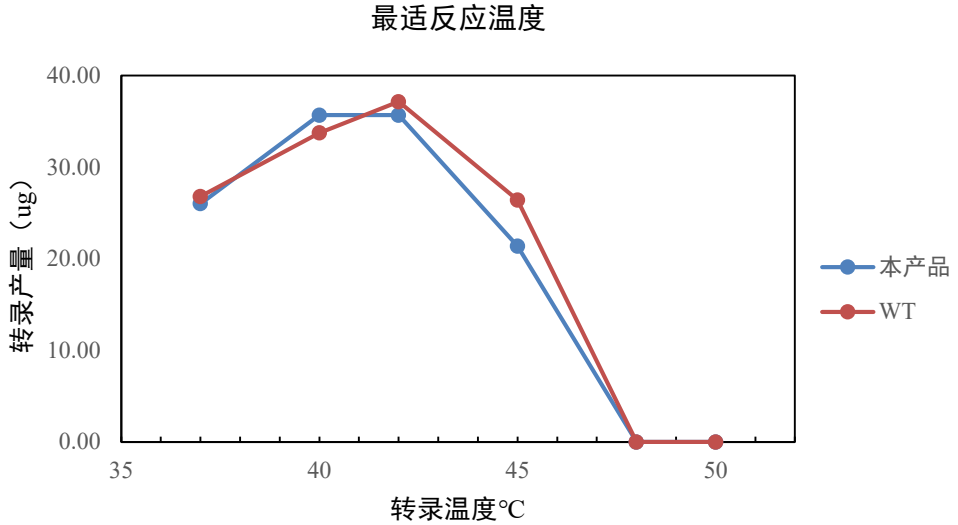
组别	浓度(ng/μl)	产量（μg/孔）	组别	浓度(ng/μl)	产量（μg/孔）
1-1	317.9	105.97	4-1	503.6	167.87
1-2	562.9	187.63	4-2	533	177.67
2-1	408.8	136.27	5-1	487.6	162.53
2-2	352.1	117.36	5-2	602.1	200.70
3-1	528.2	176.07	6-1	508.6	169.53
3-2	481.2	160.40	6-2	508.7	169.57

3. 以长度为 0.5 kb 含 T7 启动子的 DNA 片段为模板，采用本产品与野生型 T7 RNA polymerase 进行体外转录，转录完成的产物纯化后进行副产物检测。



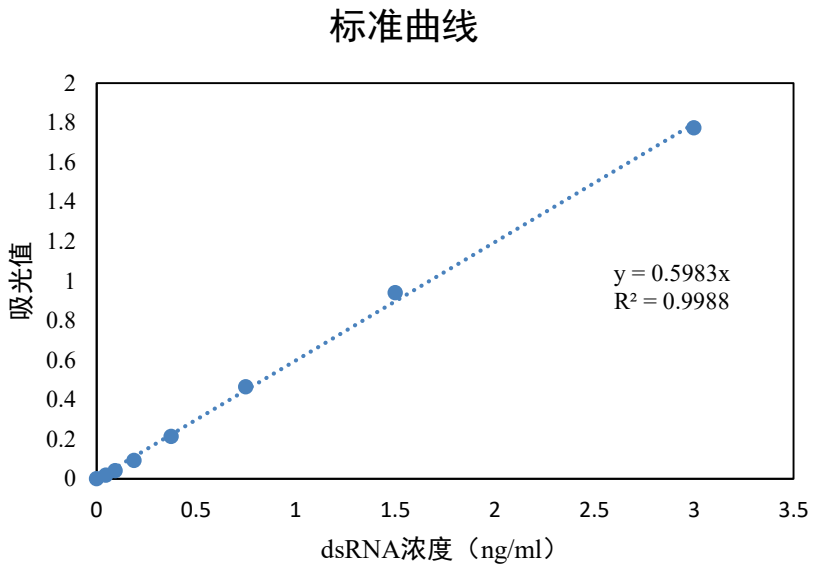
本产品转录产生的 dsRNA 量显著低于野生型，提高转录温度也会让转录副产物显著降低。

4. 以 200 ng DNA 片段为模板，采用本产品与野生型 T7 RNA polymerase 进行不同温度的体外转录，转录完成的产物纯化后进行产量与最适反应温度曲线绘制。



5. 以 200 ng 0.5 kb 含 T7 启动子的 DNA 片段为模板，采用本产品与野生型 T7 RNA polymerase 进行不同温度的体外转录，转录完成的产物纯化后进行 ELISA 检测其副产物生成量。

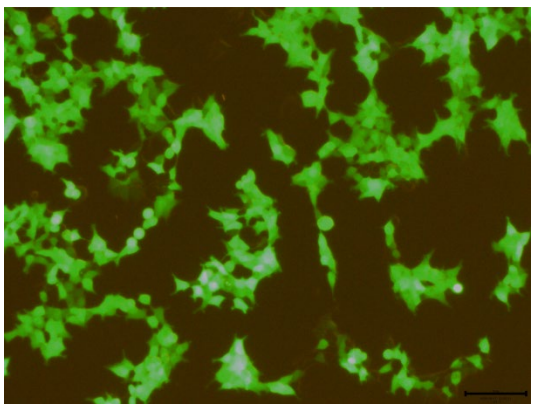
dsRNA 标准品标准曲线制备

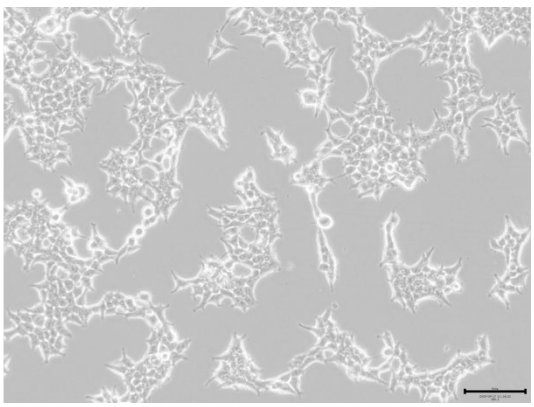


聚合酶	WT	WT	本产品	本产品
转录温度(℃)	37	42	37	42
转录产物稀释倍数	5000X	2000X	2000X	500X
dsRNA 浓度(ng/ml)	2.240	1.386	0.192	0.214
转录产物中 dsRNA(%)	0.235	0.098	0.008	0.003

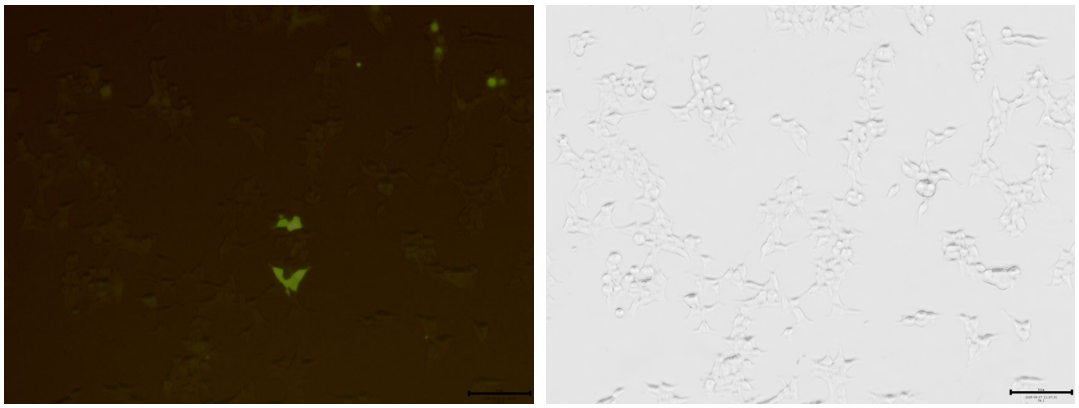
6. 采用 WT 和本产品进行体外转录生产 siRNA，并检测其 siRNA 在 293T 细胞中干扰 EGFP 表达的效果。（该 293T 细胞中包含 EGFP 序列）

Negative control (无 siRNA，转染相同体积的 RNase free H2O)

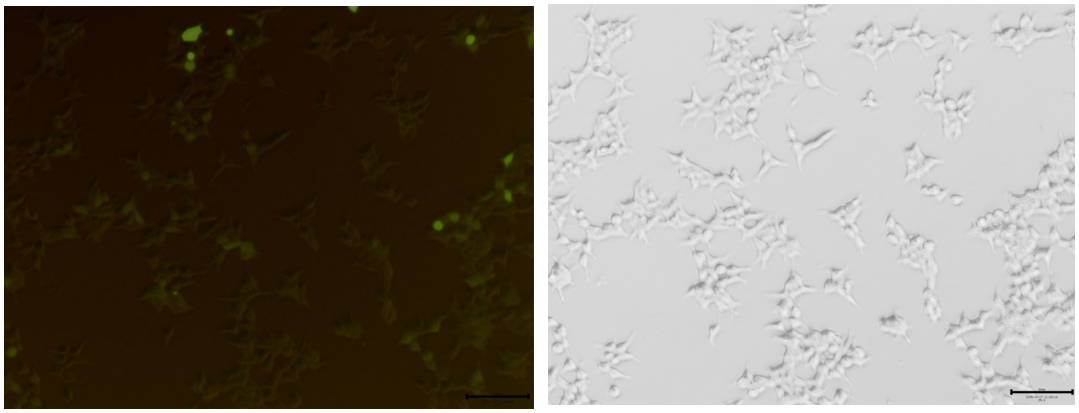




WT 转录 siRNA 稀释 10 倍转染

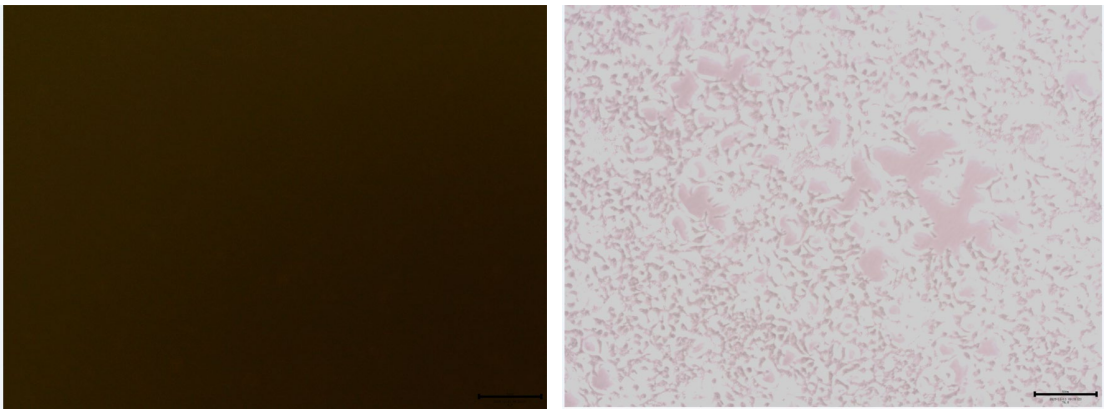


本产品转录 siRNA 稀释 10 倍转染

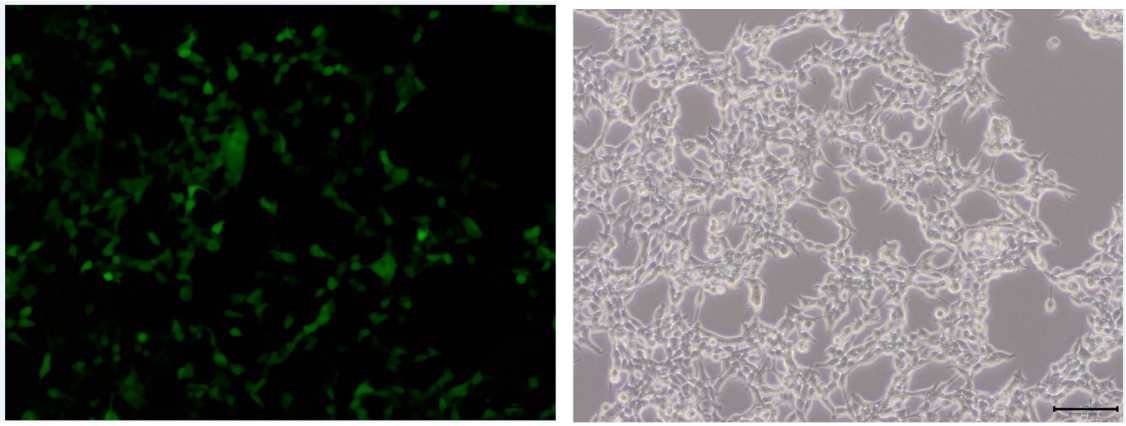


7. 采用 WT 和本产品进行体外转录生产 EGFP-mRNA（需先进行转录，再分别进行 RNA 加尾和加帽），并检测其 EGFP-mRNA 在 293T 细胞中表达的效果。（该 293T 细胞中无 EGFP）

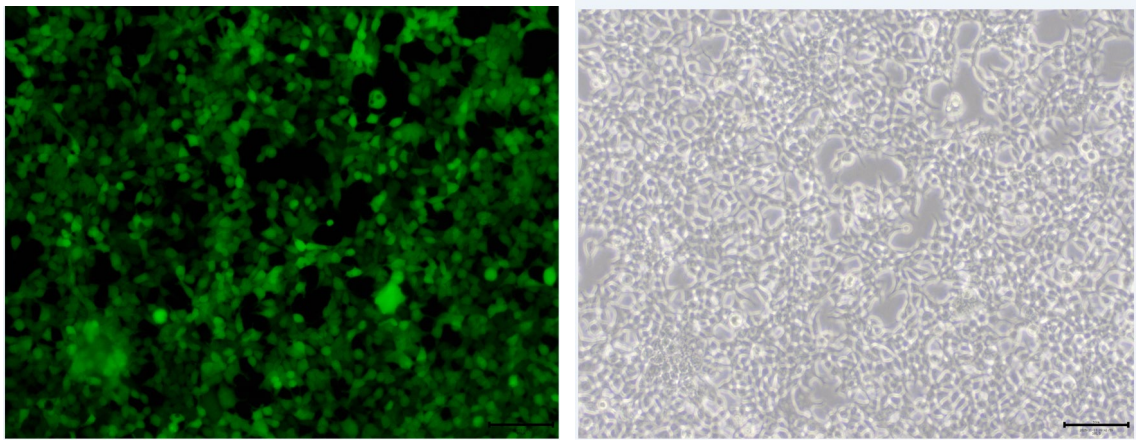
Negative control (无 EGFP-mRNA，转染相同体积的 RNase free H2O)



WT 转录 EGFP-mRNA 稀释 10 倍转染



本产品转录 EGFP-mRNA 稀释 10 倍转染



➢ 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。