

# High Yield T7 RNA Transcription Kit

## 说明书

Cat. No.: EZ5102

### 一、产品简介

本试剂盒是优化的高产量 RNA 体外转录试剂盒，试剂盒中的 T7 RNA Polymerase 从模板 DNA T7 启动子下游开始合成互补 RNA，可以简单快速地获得大量 RNA 分子。本试剂盒以 1 µg 的模板投入量可以产生不低于 200 µg 的 RNA，转录生成的 RNA 可用于 RNA 结构与功能研究、探针杂交、RNA 酶保护、RNAi、显微注射及体外翻译等多种下游应用。

### 二、产品组分

| 货号 (规格)                       | EZ5102-01<br>(50 Rxns, 20 µl/Rxn) | EZ5102-02<br>(250 Rxns, 20 µl/Rxn) |
|-------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| 组分                            |                                   |                                    |
| T7 RNA Polymerase Mix         | 100 µl                            | 500 µl                             |
| 10× Reaction Buffer           | 100 µl                            | 500 µl                             |
| ATP Solution                  | 100 µl                            | 500 µl                             |
| UTP Solution                  | 100 µl                            | 500 µl                             |
| GTP Solution                  | 100 µl                            | 500 µl                             |
| CTP Solution                  | 100 µl                            | 500 µl                             |
| DNase I                       | 50 µl                             | 250 µl                             |
| Control Template (1 µg/µl)    | 10 µl                             | 50 µl                              |
| RNase-free ddH <sub>2</sub> O | 1 ml                              | 5 ml                               |

### 三、保存条件

本试剂盒于 -20°C 可保存 12 个月，过期日期详见产品标签中有效期信息。

### 四、注意事项

1. 为了您的安全和健康，请穿戴实验服、一次性乳胶手套和一次性口罩。
2. 建议将模板纯化后再进行体外转录实验，以避免 RNase、蛋白、RNA 及盐的残留对体外转录体系的影响。

### 五、自备材料

模板：带 T7 RNA 聚合酶启动子序列的线性化质粒、PCR 产物或合成的 DNA 片段。体外转录产物 RNA 纯化试剂盒 (Cat.: EZ5106)。RNase-free ddH<sub>2</sub>O、RNase-free 的 EP 管及移液器吸头、PCR 仪等。

### 六、操作步骤

模板制备：

#### a. 质粒模板：

带 T7 启动子的质粒可以作为转录模板，质粒的线性化和纯度会影响转录的产量及 RNA 的完整性。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，线性化的质粒请确保双链为平末端或编码链 5'端为突出结构。每个反应建议投入 1 µg 线性化质粒作模板。**注意：质粒线性化后，建议纯化后再作为模板体外转录，以避免 RNase、蛋白、RNA 及盐的残留对体外转录体系的影响。**

#### b. PCR 产物模板：

带 T7 启动子的 PCR 产物可以作为体外转录模板。PCR 扩增模板时将 T7 启动子（TAATACGACTCACTATAGGG）加在非编码链的上游引物的 5'端。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。**注意：PCR 产物为转录模板，需电泳确认产物的单一性，建议每个反应体系中加入 0.1 ~ 0.5 µg 模板。**

#### c. 动物合成的 DNA 模板：

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。推荐每个反应体系中加入 0.1 ~ 0.5 µg 模板。

#### 体外转录

1. 将除 T7 RNA Polymerase Mix 外的组分振荡混匀，短暂离心收集于管底，冰上储存备用。
2. 根据所需产物类型选择下面的步骤 a 和 b 两个反应体系配置溶液，建议模板加入 0.1 ~ 1 µg。
  - a. 按下表配制反应体系（非修饰 RNA 体系）：

| 组分                            | 体积        |
|-------------------------------|-----------|
| 10× Reaction Buffer           | 2 µl      |
| ATP Solution                  | 2 µl      |
| UTP Solution                  | 2 µl      |
| GTP Solution                  | 2 µl      |
| CTP Solution                  | 2 µl      |
| DNA 模板                        | x µl      |
| T7 RNA Polymerase Mix         | 2 µl      |
| RNase-free ddH <sub>2</sub> O | 补足至 20 µl |

- b. 按下表配制反应体系（修饰 RNA 体系）：

| 组分                            | 体积        |
|-------------------------------|-----------|
| 10× Reaction Buffer           | 2 µl      |
| ATP Solution                  | 2 µl      |
| UTP Solution                  | 2 µl      |
| GTP Solution                  | 2 µl      |
| CTP Solution                  | 1.5 µl    |
| Modified CTP (10 mM)          | 5 µl      |
| DNA 模板                        | x µl      |
| T7 RNA Polymerase Mix         | 2 µl      |
| RNase-free ddH <sub>2</sub> O | 补足至 20 µl |

**注：**体系以 Modified CTP 为例，若使用其他的 Modified NTP 底物，请参照 CTP Solution 与 Modified CTP 比例配制反应体。

3. 用移液器轻轻混匀各组分，并短暂离心收集，37°C 孵育 2 h。

**注意：**为避免蒸发对反应体系的影响，建议在 PCR 仪中进行反应。可根据产物片段大小适当的调整反应时间，如合成小于 0.3 kb 的 RNA，可将反应延长至 4 h 或更长时间，16 h 过夜反应不会影响产物的质量。

4. （选做）在反应体系中加入 1 µl 的 DNase I，37°C 孵育 15 min，消化转录的 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，也可以用 DNase I 消化。

5. 合成的 RNA 经电泳分析、纯化后，可用于下游实验。

注意：产物浓度极高，需用 RNase-free ddH<sub>2</sub>O 稀释后再检测。

### 产物纯化

非修饰 RNA 可采用柱法纯化或酚/氯仿抽提纯化法；修饰 RNA 推荐使用柱法纯法；对产物片段大小要求较高则推荐使用切胶回收纯化。柱法纯化推荐使用体外转录产物 RNA 纯化试剂盒 (Cat.: EZ5106)，纯化前应加入 80  $\mu$ l RNase-free ddH<sub>2</sub>O 将产物稀释至 100  $\mu$ l，再按说明书进行纯化。由于 RNA 产量较高，为避免超出结合柱的承载能力，请对所需柱子数量进行预估。

### RNA 定量

- a. 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。
- b. 染料法：用 RiboGreen 染料进行 RNA 定量，游离核苷酸不会影响定量，可以对纯化或者未纯化的反应产物中的 RNA 进行准确定量。