天净沙系列

CAT#:230802

低温运输，-20℃保存

实时双修饰 T7 体外转录试剂盒

Real-Time Double Modified T7 IVT Kit

使用手册 V1.0

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

用体外转录方法制备的 RNA 是 RNA 药物和 RNA 疫苗的重要原料，但研究发现如果在体外转录时用 5mCTP（5-methylcytosin-5′-triphosphate, CAS#: 327174-86-7）和 m1ΨTP（N1-methyl-pseudouridine-5′-triphosphate, CAS#: 1428903-59-6）分别替代 CTP 和 UTP，得到的修饰 RNA 翻译效果提高 40 多倍，免疫性也大为降低。为此本公司在常规 T7 体外转录试剂的基础上，升级开发了本产品。它具有下列特点：

1. 用 5mC-CTP 代替 CTP，用 m1ψ–UTP 代替 UTP，并且分开而不是以混合液的方式提供，方便用户制备单一种修饰或者双重修饰的 RNA。
2. 即开即用，用户只需提供含 T7 启动子的 DNA 模板即可。
3. 提供体外转录专用荧光染料，加入到体系中可以实时监控反应的进行，便于优化条件。实验结束后不需要浪费宝贵的样本进行电泳。如果担心染料对后续实验有影响，也可以不加。
4. 模版 DNA 可以是线性化的质粒 DNA，也可以是 PCR 扩增产物。
5. 可以合成的 RNA 的最佳长度在 20nt 到 2000 nt 之间。
6. 产品配方经过精心优化，1ug 质粒 DNA 模版可以在 3 小时内合成大约 30 ug 修饰 RNA（具体跟模板 DNA 序列，长度，纯度等相关）。
7. 得到的 RNA 可以用于 RNA 结构研究、核酶生物化学、体外翻译、RNA-蛋白质相互作用、反义技术、SELEX 技术和 RNA 干扰（RNAi）等实验。
8. 本试剂盒足够 50 次 20μL 体系的修饰碱基体外转录实验。
9. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品使用五孔盒包装

成份	编号	规格	包装
2×双修饰 T7 转录预配液 (含 5mCTP 和 m1ΨTP)	220802a	0.5 mL	0.5mL 绿盖管
体外转录专用荧光染料	220803	50 μL	0.5mL 棕色盖
T7 RNA 聚合酶-RI 混合液	91106c	50 μL	0.5mL 红盖管
RNase-free 水	980403	1 mL	1.5mL 蓝盖管
使用手册	230802sc	1 份	无

运输及保存

低温运输，-20℃保存、有效期一年。

自备试剂

Tris 饱和酚、氯仿、RNase-free 75%乙醇(均可从本公司另购)

相关资料

一、制备 DNA 模板（本试剂盒不含所需试剂，此处信息仅供参考）

PCR 片段和质粒 DNA 都可以用作体外转录的模板，但是必须注意以下几点。

1. 一是必须使用线性化的 DNA。如果是质粒 DNA，则必须先用适当的限制性内切酶切成线状。
2. 二是需要转录的 DNA 序列的上游必须有 T7 启动子。如果模板是 PCR 产物，则可以在设计引物时将 T7 启动子序列（5’TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG 3’）加上。如果是将 DNA 片段克隆到载体上，则需要选择有 T7 启动子的载体，并且克隆位点必须位于 T7 启动子下游。
3. 三是需要转录的 DNA 序列的下游端最好不要是 3’突出。如果是 3’突出（比如选择了 Pst I 来线性化质粒），则最好用 T4 DNA 聚合酶修平。
4. 四是必须保证 DNA 模板中没有 RNase。由于提取质粒 DNA 的过程中一般要使用大量的 RNase A，因此质粒 DNA 一般都有严重的 RNase A 污染，所以在用作模板前，最好采取胶回收得方法回收质粒 DNA。并且加入少量总 RNA 一起保温，然后电泳检测 RNA 是否被降解，以此来判断纯化的 DNA 模板是否有残留 RNase A。如果有 RNase 污染，则必须反复酚-氯仿抽提去除残留的 RNase，然后再乙醇沉淀质粒 DNA。

二、体外转录反应

5. 按下表设置体外转录反应：

成分	样品管	阴性对照管
DNA 模板	50 ng 左右的 PCR 片段 或 1 ug 左右的线状质粒	不加
2×双修饰 T7 转录预配液 （含 5mCTP 和 m1ΨTP）	10 μL	10 μL
体外转录专用荧光染料	1 μL	1 μL
T7 RNA 聚合酶-RI 混合液	1 μL	1 μL
补 RNase-free 水到	20 μL	20 μL

注：此为 20 μL 反应体系的用量，对其他反应体系，各成分的用量可以按比例增减。修饰 T7 转录预配液已经含有修饰核苷酸。

6. 在荧光定量 PCR 上 37℃保温 4 小时。每分钟采集一次 SYBR 通道的荧光信号。如果没有加体外转录专用荧光染料，可以不采集荧光信号。不一定要跑慢 4 个小时，可以在荧光信号到达平台期后停止反应

	7. 如果没有加荧光染料，反应结束后需要取 1-3 μL 电泳，此时最好用 DNA 模板做电泳对照。电泳时比阴性对照多出的条带就是扩增得到的 RNA（由于合成的 RNA 长度不均匀，即使长度均匀，但由于自生形成发夹结构，泳动速度也不一致，所以电泳所得 RNA 条带一般都不是清晰，而是比较弥散的电泳条带。但由于 RNA 是单链，分子量比同样长度的 DNA 小一倍，因此 RNA 一般比其双链 DNA 模板电泳速度更快。 8. 如需去除 DNA 模板，需要另购线状 DNA 清除剂。最好不要实用 DNase 法。 9. 再用自备的 RNA 纯化试剂盒纯化修饰 RNA。 10. 最后用自备的单链 RNA 定量试剂盒测定修饰 RNA 的浓度。 11. 将纯化的 RNA 放-80℃保存。
疑难解答	1、没有 RNA 产物。最常见原因是模板有 RNase 污染，可用纯化好的 RNA 跟模板 DNA 一起保温再电泳，再检测其是否有污染。 2、RNA 产量低。最常见的原因是 DNA 模板。在转录序列的第一个和第二个碱基最好都是 G，在前 14 个碱基内避免有 U 存在。 3、RNA 长度比预期的短。可能是模板序列中有 T7 RNA 聚合酶的终止序列。可以改用 SP6 体外转录试剂盒（启动子也必须改成 SP6 启动子）。 4、RNA 长度比预计的长。T7 RNA 聚合酶跟 Taq DNA 聚合酶一样，有不依赖于模板的加尾功能，最多有一半的 RNA 可以带一个或两个碱基的尾巴。如果 RNA 长度比预计的长很多，使用的模板又是质粒 DNA，则可能是质粒线性化不彻底。 5、5’单磷酸还是三磷酸。如果使用 GTP，则得到的 RNA 是三磷酸，体外转录时如果保温时间太长（如 12 小时），则有 50%的三磷酸会变成单磷酸。如果在转录体系中加入 GMP，则 T7 RNA 聚合酶将优先使用 GMP，所得 RNA 产物中 5’端是单磷酸的比例将大大增加。 6、用体外转录试剂盒如何得到带帽 RNA？需加入带帽 NTP 类似物即可，但由于竞争抑制，效果不高。另一方法是使用本公司的加帽试剂盒。
关联产品	SP6 体外转录试剂盒