

● 常见问题及解决方案

1) 本试剂盒的产量大概是多少呢？

答：本试剂盒产量与客户的片段长度相关，根据经验：

- ✓ 500bp 以下的模板，建议增加模板量，起始量为 2μg 或者以上，同时产率也会偏低，大概是模板量的 10 倍；
- ✓ 500bp~1000bp 长度的模板，建议起始量为 1μg，产量大概是 20μg ；
- ✓ 1000bp 长度以上的模板，建议降低起始量，产量大于 20 μg 。（例如：以 4kb 长度的 DNA 为模板，500ng 为起始量，大概能得到 20μg 左右的 RNA。）这个需自行摸索。

2) 转录产物长度是否有限制？

答：本试剂盒的转录产物长度一般为 4kb 以内，最长可合成 14kb 的转录本，若超出 4kb，请自行进行实验条件优化，以得到最优结果。

3) 产物电泳拖尾现象

答：电泳过程中有拖尾现象，可能原因：①实验操作过程被 RNA 酶污染；②DNA 模板被 RNase 污染。体系中的 RNA 酶抑制剂只能抑制痕量的 RNA 酶残留，建议重新纯化模板 DNA，并在实验过程中使用 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 H<sub>2</sub>O 配制。

4) 短片段转录产物产量低

答：转录起始片段短会抑制反应，转录产物小于 0.3 kb 时，延长反应时间或增加模板量可以提高 RNA 产量。过夜反应(16 h)或者使用 2 μg 模板可以使 RNA 产量最大化。



In Vitro HiScript T7 RNA Synthesis Kit

货号：T317A/B

● 产品包装

组分	T317A	T317B
T7 Enzyme Mix	40 μL	200 μL
5× T7 Reaction buffer	80 μL	400 μL
DNase I (1U/μL)	20 μL	100 μL
rNTP(25mM)	120 μL	600 μL
Purification Reagent A	200 μL	1 mL
Purification Reagent B	40 μL	200 μL
Control DNA Template	20 μL	100 μL

● 储存条件

收到本产品后，请立即置于-20℃保存。

技术咨询：

QQ/973107308      Tel/18927539098      Email/enzyvalley@163.com

● 产品简介

EnzyValley® In Vitro HiScript T7 RNA Synthesis Kit 是经分子进化的 T7 RNA polymerase 和优化的反应体系组合得到的试剂盒。本试剂盒以四种 rNTP 为底物，利用含有 T7 启动子的 DNA 模板，从 T7 启动子下游开始，合成与 DNA 模板中反义链互补的 RNA，如 mRNA、lncRNA、shRNA。

预计 1 µg 的模板投入量可以产生 150-200µg 的 RNA，合成的 RNA 可用于诸如 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。

为方便客户对转录合成得到的 RNA 进行纯化，此试剂盒还提供了用于纯化的配套试剂。

● 用途

- 1) 合成单链 RNA。
- 2) 合成高特异性 RNA 探针。
- 3) 合成 siRNA 前体。
- 4) 制作 RNA 剪接反应 (RNA Splicing) 的前体。
- 5) 以帽类似物 (Cap analog) 为引物，制作 Capped mRNA。

● 自备材料

客户需要自备线性化 DNA 模板、预冷无水乙醇、预冷 70%乙醇、RNase-free H<sub>2</sub>O 或 1 X TE 溶液及其它相关的实验试剂耗材等。

● 使用注意

- 1) 为了特定区域的有效转录，建议在其区域下游把模板 DNA 预先切成平端或 5'突出末端。
- 2) 缓冲液中的亚精胺与核酸结合可能形成不溶物。建议最后加入模板 DNA。

● 模板 DNA 的制备

带有双链 T7启动子的线性化质粒、PCR 产物或者合成的 DNA 片段都可以作为本试剂盒的体外转录模板，模板可用 TE 缓冲液或 RNase-free H<sub>2</sub>O 溶解，推荐浓度0.5µg/uL。

- 1) 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。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 及盐残留对体系的影响。
- 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。PCR 扩增模板时将 T7启动子 (TAATACGA CTCATATAGGG)加在正义链的上游引物的5' 端。PCR 产物经电泳切胶回收纯化后方可用于体外转录反应。

● T7 体外转录实验

- 1) 按下表配制反应体系。

Add RNase-free H <sub>2</sub> O	To 20 µL
5× T7 Reaction buffer	4 µL
rNTP(25mM)	6 µL
T7 Enzyme Mix	2 µL
模板 DNA	20ng ~ 1µg

- 3) 用移液器轻轻吸打混匀反应体系（请勿剧烈震荡混匀），瞬时离心以确保溶液全部汇集在管底。
- 4) 置于热循环仪上37℃孵育反应2~4h（反应时间可根据合成 RNA 长度大小进行适当调整优化），反应结束后将体系置于冰上，建议尽快进行下一步纯化，不建议将体系冻存保存。

● T7 体外转录 RNA 的纯化

- 1) 去除 DNA 模板。往上一步的反应体系中加入 1µL DNase I (1U/µL)，并用移液器混合均匀，瞬时离心使溶液全部汇集于管底，置于热循环仪上 37℃孵育反应 30min，以彻底的消除体系中的 DNA 模板，可根据 DNA 模板的长短适当优化反应时间。
- 2) 加入 67µL RNase-free H<sub>2</sub>O、10µL Purification Reagent A 和 2µL Purification Reagent B，轻轻混合均匀后加入预冷无水乙醇 300µL，轻轻混合均匀后放置于-20℃冰箱中两个小时或过夜沉淀，若放置于-80℃的冰箱中至少需要沉淀 1 个小时以上。
- 3) 沉淀后，使用低温冷冻离心机在 4℃、13000rpm 的条件下离心 30min，离心后可明显看到 RNA 沉淀。弃去上清后加入 1ml 预冷 70%乙醇，颠倒离心管洗涤沉淀，建议重复洗涤步骤一次。
- 4) 最后于低温冷冻离心机在 4℃、13000rpm 条件下离心 10min，弃去上清后（尽量把剩余乙醇洗液全部去除）干燥晾干 RNA 沉淀至透明。
- 5) 加入 30~50µL RNase-free H<sub>2</sub>O 或 1 X TE 溶液溶解晾干后的 RNA 沉淀，室温放置 5min 直至 RNA 沉淀充分溶解。使用微量分光光度计（如 Nanodrop）或 Qubit 等对 RNA 的浓度及纯度进行检测，使用琼脂糖凝胶电泳或者 Agilent 2100、Agilent2200 等仪器检测确认 RNA 的完整性。