CircRNA 合成试剂盒（一步法）

2026V01

产品概述

环状 RNA（Circular RNA，circRNA）是一种通过典型的 5 '-3'磷酸二酯键形成的环形结构的 RNA 分子。相比于线性 RNA，circRNA 不包含 5'端帽结构和 3'端 poly(A)，缺乏游离末端，不易被核酸外切酶降解，比线性 RNA 更稳定。目前常用体外转录制备环状 RNA 的方法主要是通过先体外生成线性 RNA，然后通过酶法连接环化、内含子自剪接核酶切割连接环化。宝锐生物基于 I 型内含子自剪接的成环方式开发出一种操作简单制备环状 RNA 的试剂盒，环状 RNA 制备试剂盒进行环化的原理是，在 GTP 和 Mg^{2+}存在的条件下，环状 RNA 前体分子能通过双酯交换反应实现自动环化，本试剂盒将体外转录与成环两步合并在一步中进行，使用热稳定的 T7 RNA 聚合酶，搭配优化后的反应缓冲液，经过体外转录即可获得环状 RNA，无需进行额外的成环反应。本试剂盒提供的环化反应体系可以按照比例放大反应体系，对环状 RNA 产物的得率无显著影响。

试剂盒组分

组分	货号	体积
ATP Solution（100mM）	BP-AS-01	100μL
GTP Solution（100mM）	BP-AS-02	100μL
CTP Solution（100mM）	BP-AS-03	100μL
UTP Solution（100mM）	BP-AS-04	100μL
Thermostable T7 RNA 聚合酶	BP-E14	100μL
RNase Inhibitor（40U/μL）	BP-E02	100μL
无机焦磷酸酶（0.1U/μL）	BP-E03	100μL
10×Thermostable T7 transcription buffer	BP-AS-25	100μL
DNase I（2U/μL）	BP-E04	100μL
Precipitation Reagent	BP-AS-10	1mL
RNase R（20U/μL）	BP-E08	50μL
10 × RNase R Buffer	BP-AS-14	1mL
RNase R Dilution Buffer	BP-AS-15	1mL
RNase-free ddH_2O	BP-AS-11	1mL
Control Template（circGFP）	BP-AS-33	5μL

保存条件

-20±5°C存储。

自备材料

耗材：无核酸酶 PCR 管、无核酸酶移液枪头、RNA 纯化回收磁珠（如有必要）等。

模板：带 T7 启动子的质粒模板、PCR 产物模板。

试剂：无水乙醇。

实验流程

1. 模板制备

1.1 质粒线性化

质粒 DNA 必须在目的基因下游用限制性内切酶线性化才能被转录。即使只存在少量的环形质粒也会产生非常长的异质性 RNA 转录本，通常需要在凝胶上检查线性化后回收的模板 DNA 是否被完全切割。

1.2 线性化产物回收

按照以下条件结束线性化过程：

1/20 体积 0.5M EDTA、1/10 体积 3M 醋酸钠或 5M 醋酸铵、2 倍体积无水乙醇，混合均匀，在-20°C沉淀 1h，也可过夜沉淀，随后在离心机中以大于 12000rpm 的转速将 DNA 离心 15min；去上清，70%乙醇洗沉淀后在离心机中以大于 12000rpm 的转速将 DNA 离心 10min；去上清，再次离心 5-10s，然后用 10μL 的移液枪小心地清除残留液体。在洁净工作台中尽可能吹干残留液体，使乙醇完全挥发，避免对下游酶活性产生抑制作用。最后使用 RNase-free ddH_2O 溶解沉淀，建议控制浓度约为 1μg/μL。

2. 体外转录反应

2.1 采用 Thermostable T7 RNA 聚合酶进行体外合成，合成条件为 1μg 线性 DNA 模板，50°C反应 1 小时转录生产 RNA。根据所需 RNA 的量，设置多个反应或放大反应体系，即可大规模合成 RNA。具体过程如下：

（1）取出 Thermostable T7 RNA 聚合酶、RNase Inhibitor 和无机焦磷酸酶立即放置在冰上；取出 ATP Solution、GTP Solution、 CTP Solution、UTP Solution 室温下解冻之后立即转移至冰上；取出 10×Transcription Buffer 放置在室温下解冻，在室温条件下配制转录反应，RNA 体外合成体系以 20μL 计，包括以下组分：

试剂	体积
10×Thermostable T7 transcription buffer	2μL
ATP Solution（100mM）	1μL
CTP Solution（100mM）	1μL
GTP Solution（100mM）	1μL
UTP Solution（100mM）	1μL
无机焦磷酸酶（0.1U/μL）	1μL
RNase Inhibitor（40U/μL）	1μL
Thermostable T7 RNA 聚合酶	2μL
Template DNA	1μg
RNase-free ddH_2O	Up to 20μL

（2）混匀：轻轻拨动试管或用移液枪将混合物上下吹打，瞬离收集反应混合物至试管底部。

（3）转录：使用带热盖的设备，50°C反应 1h。

（4）消化模板 DNA：在转录完成后的体系中加入 2μL 的 DNase I 去除 DNA 模板，反应条件为 37°C孵育 15min。

2.2 IVT 产物纯化

转录产物可采用柱纯化、酚/氯仿抽提纯化法、磁珠纯化或氯化锂纯化。

3. RNase R 富集环状 RNA

RNase R 消化反应体系如下，RNase R 在加样时可以用 RNase R Dilution Buffer 稀释至所需浓度。推荐的反应体系可进行等比例扩大，以 20μL 计，具体如下：

试剂	体积
RNA	1μg
RNase R	1-4U
10 ×RNase R Buffer	2μL
RNase-free ddH_2O	Up to 20μL

4. RNase R 处理后的环状 RNA 产物纯化：

本试剂盒提供氯化锂沉淀法纯化 RNA，具体过程如下：

（1）向反应混合物中，加入等体积 RNase free H_2O 和 Precipitation Reagent。
（2）混合均匀后，置于-20°C放置 1 h，以 15000rpm，4°C离心 15min，收集沉淀。
（3）小心地移除上清，用 500 μL 70%乙醇清洗沉淀，4°C，15000rpm 离心 15min。
（4）完全吸净 70%的乙醇，在洁净工作台中尽可能吹干残留液体，使乙醇完全挥发。根据下游实验的需要，将 RNA 溶解在对应的溶液或缓冲液中。

注意事项

1. 体外转录的反应对 RNase 高度敏感，反应体系须严格注意不要混入 RNase，实验器材如移液枪头，EP 管严格使用 RNase-free 用品。体系的配制尽可能在无酶环境中配制，可使用清洁后的洁净工作台进行此操作，合成的 RNA 也尽可能避免在洁净工作台以外的区域开盖，以避免 RNase 的污染。
2. 转录体系配制时请严格按照说明书中的加样顺序进行加样，10×Transcription Buffer 需要在恢复至室温后使用，DNA 在低温下容易与亚精胺发生共沉淀，影响转录产量，体系配制过程中，DNA 模板应当是最后加入的组分。
3. RNase R 活性的发挥需要 0.1-1.0mM 的 Mg^{2+}。
4. 随底物 RNA 的增加，可适当增加 RNase R 用量或延长消化时间。
5. RNA 样本中 EDTA 含量可能会影响 RNase R 的活性。
6. 有些 circRNA 或套索结构 RNA 在经长时间 RNase R 消化会导致丰度降低，可能是因为其耐受 RNase R 消化能力弱，可尝试减少 RNase R 用量或缩短消化时间。
7. 使用前应混匀，避免反复冻融。