

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、内含子自剪切核酶切割连接环化。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, 本试剂盒操作仅需一步孵育即可完成, 因此环化产物不需要进行纯化, 可直接用于后续实验。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	100 μ L
GTP Solution (100mM)	BP-AS-02	200 μ L
CTP Solution (100mM)	BP-AS-03	100 μ L
UTP Solution (100mM)	BP-AS-04	100 μ L
T7 RNA 聚合酶	BP-E01	100 μ L
RNase Inhibitor (40U/ μ L)	BP-E02	100 μ L
无机焦磷酸酶 (0.1U/ μ L)	BP-E03	100 μ L
10 $\times$ Transcription Buffer	BP-AS-08	100 μ L
Precipitation Reagent	BP-AS-10	1mL
DNase I (2U/ μ L)	BP-E04	50 μ L
10 $\times$ DNase I Reaction Buffer	BP-AS-13	100 μ L
RNase-free ddH ₂ O	BP-AS-11	1mL
10 $\times$ Circular Buffer	BP-AS-30	1mL
RNase R (20U/ μ L)	BP-E08	50 μ L
10 $\times$ RNase R Buffer	BP-AS-14	1mL
RNase R Dilution Buffer	BP-AS-15	1mL

保存条件

-20 $\pm$ 5 $^{\circ}$ 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℃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，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 ddH₂O 溶解沉淀，建议控制浓度约为 1μg/μL。

2. 体外线性 RNA 的合成

2.1 采用 T7 RNA 聚合酶进行体外合成，合成条件为 1μg 线性 DNA 模板，37℃反应 2 小时转录生产 RNA。根据所需 RNA 的量，设置多个反应或增加反应体系，即可大规模合成线性 RNA。具体过程如下：

(1) 取出 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；涡旋 10×Transcription Buffer，直到完全溶解，一旦解冻，放置在室温下，并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 × Transcription Buffer	2μL
ATP Solution (100mM)	2μL
CTP Solution (100mM)	2μL
GTP Solution (100mM)	2μL
UTP Solution (100mM)	2μL
无机焦磷酸酶	1μL
RNase Inhibitor	1μL
T7 RNA 聚合酶	2μL
Template DNA	1μg
RNase-free ddH ₂ O	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，瞬间收集反应混合物至试管底部。

(3) 转录：使用带热盖的设备，37℃至少反应 2h，对于小片段的 RNA (≤300bp) 体外转录，为了确保充足的产量，建议延长体外转录的时间至 3h。在一定范围 (16h) 内延长体外转录的时间，并不会对产物的质量产生影响。

(4) 消化模板 DNA：在转录完成后的体系中加入 1μL 的 DNase I 和 2μL 的 10×DNase I Reaction Buffer 去除 DNA 模板，反应条件为 37℃孵育 15min。

2.2 线性 mRNA 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. 体外环状 RNA 的合成

将体外合成的线性 RNA 加热到 70℃反应 5min 后，立即将 RNA 放置于冰上静置 3min，以解除 RNA 的多级结构。然后将 RNA 加入到环化反应体系，55℃环化反应 15min 即可得到环状 RNA。

试剂	体积
线性前体 RNA	50μg
GTP Solution (100mM)	2μL
10 × Circular Buffer	10μL
RNase-free ddH ₂ O	Up to 100μL

4. RNase R 富集环状 RNA（成环反应后获得的 RNA 包括大部分环状 RNA 及少数未被环化的线性前体 RNA）：

4.1 RNase R 酶量筛选预实验

RNase R 通过消化残留的线性前体 RNA 来富集环状 RNA。RNase R 在消化线性前体 RNA 的反应体系时可参考如下表格：

试剂	体积
线性前体 RNA	1μg
RNase R	1-4U
10 ×RNase R Buffer	2μL
RNase-free ddH ₂ O	Up to 20μL

37°C消化约 15-30min，进行不同梯度酶量预实验，筛选出合适的酶量（即在完全消化线性前体 RNA 同时最大程度保留环状 RNA 的酶量，此步可根据电泳结果筛选），RNase R 在加样时可以用 RNase R Dilution Buffer 稀释至所需浓度。

4.2 根据预实验筛选的最佳酶量，可进行后续放大实验。

5. 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 H₂O 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）小心地去除 70%的乙醇，根据下游实验的需要，将 RNA 重新悬浮在对应的溶液或缓冲液中。

注意事项

1. 体外转录的应对 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 Mg²⁺。
4. 随底物 RNA 的增加，可适当延长 RNase R 消化时间和增加酶量。
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。