

产品概述

共转录加帽是一种在体外转录过程中引入帽结构的方法，主要用于提高 mRNA 的稳定性和翻译效率。mRNA 共转录合成试剂盒使用 T7 RNA 聚合酶并以含有 T7 启动子序列和 AG 起始序列的线型双链 DNA 为模板，NTPs 为底物及帽类似物对 T7 启动子下游的 DNA 序列进行转录，不需要额外的酶法加帽步骤即可高效合成具有 5'-m7G Cap1 结构的单链 RNA，也能够以修饰的核苷酸为底物制备生物素或染料标记的 RNA。本试剂盒以共转录方式合成长转录本或短转录本，提供包括 ATP、CTP、GTP、UTP 及修饰的 N1-Me-pUTP 在内的核苷酸以及帽类似物 Cap AG(3'Acm)(具体结构式如下图 1 所示)，1 μ g 的模板投入量可以产生 150-200 μ g 的 Cap1 RNA。通过本试剂盒转录合成的 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。

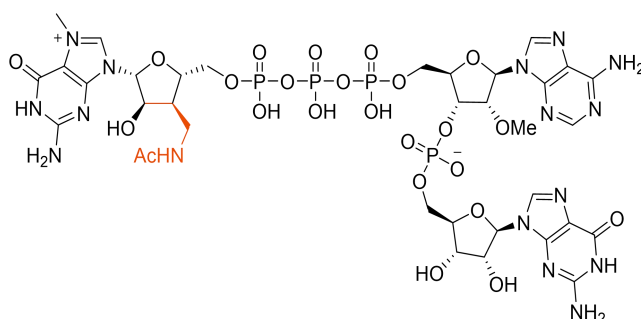


图 1 帽类似物 Cap AG(3'Acm)结构图

试剂盒组成

组分	货号	体积
ATP Solution(100mM)	BP-AS-01	100 μ L
GTP Solution(100mM)	BP-AS-02	100 μ L
CTP Solution(100mM)	BP-AS-03	100 μ L
UTP Solution(100mM)	BP-AS-04	100 μ L
N1-Me-pUTP Solution(100mM)	BP-AS-07	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
DNase I (2U/ μ L)	BP-E04	100 μ L
Cap AG(3'Acm)(100mM)	BP-AS-30	100 μ L
10 $\times$ Co-transcription Buffer	BP-AS-31	100 μ L
Precipitation Reagent	BP-AS-10	1mL
RNase-free ddH ₂ O	BP-AS-11	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 启动子和 AG 起始序列的线性化质粒模板、PCR 产物模板。

试剂：无水乙醇。

实验流程

1. 模板制备

1.1 质粒模板

质粒模板需要不受蛋白质和 RNA 的污染。大多数商业化制备的工业级别或临床级别质粒在 mRNA 共转录合成试剂盒中表现良好。

1.2 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。

1.3 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×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 颗粒化 15min。去上清，再次离心 1min，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，控制浓度约为 1μg/μL。

2. 体外转录

2.1 取出 T7 RNA 聚合酶、RNase Inhibitor、无机焦磷酸酶立即放置在冰上；取出 Cap AG(3'Acm)、ATP Solution、GTP Solution、CTP Solution、UTP Solution 或 N1-Me-pUTP Solution 室温下解冻之后立即转移至冰上；取出 10×Co-transcription Buffer 在室温下解冻，各组分震荡混匀后离心至管底，在室温条件下配制转录反应。

2.2 按下表依次加入各组分：

组分	体积
RNase-free ddH ₂ O	Up to 20μL
ATP Solution(100mM)	2μL
CTP Solution(100mM)	2μL
GTP Solution(100mM)	2μL
UTP Solution 或 N1-Me-pUTP Solution(100mM)	2μL
Cap AG(3'Acm)(100mM)	2μL
10×Co-transcription Buffer	2μL
RNase Inhibitor	1μL
无机焦磷酸酶	1μL
T7 RNA 聚合酶	2μL
DNA Template	1μg

2.3 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。

2.4 转录

使用带热盖的设备, 37°C至少反应 2h, 对于小片段的 RNA ($\leq 300\text{bp}$) 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。

2.5 消化模板 DNA

向反应体系中加入 $2\mu\text{L}$ 的 DNase I, 37°C继续反应 15min, 消化 DNA 模板。

3. 纯化回收

3.1 加入 $2\times$ 反应体积的 RNase-free ddH₂O (预冷), 轻轻地用移液枪混匀。

3.2 加入 $2\times$ 反应体积的 Precipitation Reagent (-20°C保存), 轻轻地用移液枪混匀。

3.3 -20°C至少沉淀 1h。

3.4 4°C, 15000rpm 离心 20min。

3.5 小心地移除上清, 用 $500\mu\text{L}$ 的 70%乙醇清洗沉淀, 4°C, 15000rpm 离心 15min。

3.6 小心地去除 70%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。测定 RNA 浓度, -80°C冷冻保存。

注意事项

1. 使用 PCR 产物模板或线性化质粒模板时, 都需要保证模板中不含乙醇残留, 为此, 在溶解 DNA 沉淀时, 需要开盖使乙醇完全挥发, 此步骤可在洁净工作台中进行。

2. 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。

3. 体系配制时请严格按照说明书中的加样顺序进行加样, $10\times$ Co-transcription Buffer 中含有亚精胺, 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。

4. 使用前应混匀, 避免反复冻融。