

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部中进行, 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	40 μ L
GTP Solution (100mM)	BP-AS-02	40 μ L
CTP Solution (100mM)	BP-AS-03	40 μ L
UTP Solution (100mM)	BP-AS-04	40 μ L
Thermostable T7 RNA 聚合酶	BP-E14	40 μ L
RNase Inhibitor (40U/ μ L)	BP-E02	40 μ L
无机焦磷酸酶 (0.1U/ μ L)	BP-E03	40 μ L
10 $\times$ Thermostable T7 transcription buffer	BP-AS-25	40 μ L
DNase I (2U/ μ L)	BP-E04	40 μ L
Precipitation Reagent	BP-AS-10	1mL
RNase R (20U/ μ L)	BP-E08	20 μ L
10 $\times$ RNase R Buffer	BP-AS-14	500 μ L
RNase R Dilution Buffer	BP-AS-15	500 μ L
RNase-free ddH ₂ O	BP-AS-11	1mL
Control Template (circGFP)	BP-AS-33	5 μ L

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, 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 ddH₂O 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℃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 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℃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℃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 ₂ O	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 H₂O 和 Precipitation Reagent。
- (2) 混合均匀后, 置于-20℃放置 1 h, 以 15000rpm, 4℃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℃, 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 Mg²⁺。
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。