

# TransCap T7 Co-transcription Kit with CAP GAG 共转录加帽T7体外转录试剂盒

使用前请仔细阅读说明书

目录号: JT103

版本号: Version 1.0

保存: -18°C及以下保存一年。

## 产品说明

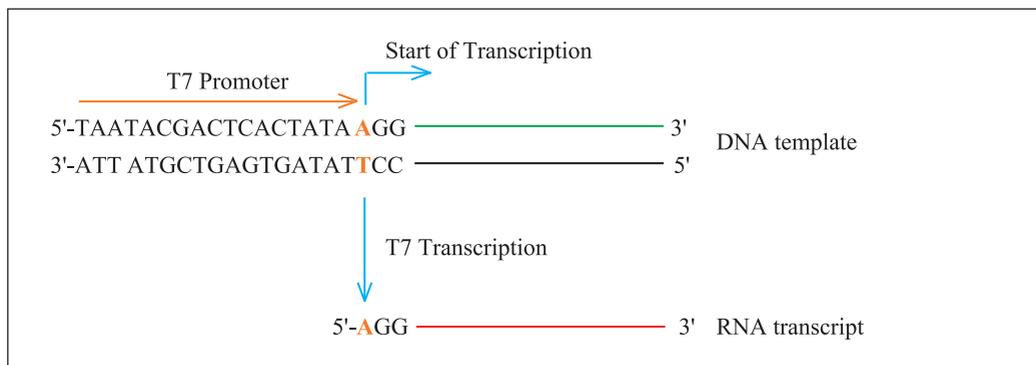
该试剂盒使用T7 RNA polymerase以含有T7启动子序列的线性双链DNA为模板、NTPs为底物,对T7启动子下游DNA序列进行体外转录,同时加帽试剂帽子类似物CAP GAG (ENE)以共转录的方式掺入mRNA的5'端,获得具有5'-m7G Cap1结构的单链RNA。具有Cap1帽子结构的RNA稳定性更好,从而可以保护RNA在细胞中免于降解。本试剂盒使用修饰核苷酸(N1-me-Pseudo UTP)替代常规UTP,修饰的核苷酸可以很好的降低mRNA的免疫原性、抑制先天的免疫激活,使体外转录的mRNA具有更好的核酸酶稳定性和翻译特性,使mRNA在医学、治疗和诊断领域有重大的应用。

本试剂盒一个反应(20 μl体系)能够获得120-160 μg的RNA产物,并可放大生产毫克级别的RNA。制备的RNA可用于体外翻译、RNase保护实验、RNA剪切以及杂交探针标记等。

## 产品组成信息

产品组成	JT103-01 (25 rxns)	JT103-02 (100 rxns)
T7 Transcription Enzyme Mix	50 μl	200 μl
5×T7 Transcription Reaction Buffer	100 μl	400 μl
ATP (100 mM)	30 μl	120 μl
GTP (100 mM)	25 μl	100 μl
CTP (100 mM)	25 μl	100 μl
N1-me-Pseudo UTP (100 mM)	25 μl	100 μl
CAP GAG (ENE)	20 μl	80 μl
DNase I (1 unit/μL)	50 μl	200 μl
500 mM EDTA (pH 8.0)	25 μl	100 μl
RNase-free Water	1 ml	4×1 ml
Transcription Control Template (0.5 μg/μl, 1kb)	10 μl	40 μl

## 共转录加帽RNA合成原理



## 模板制备

### 1、超螺旋质粒DNA

超螺旋质粒需要有一个T7启动子 (RNA转录开始的序列为: AGG)、建议可以加120 bp的poly A尾序列、以及一个有效终止转录的终止子, 常见载体的T7 terminator的终止效率不足70%, 转录反应会产生较多通过终止子的转录产物。推荐以下序列组成的转录终止子。

#### Transcription template

T7 Promoter ————— poly A tail Terminator

T7 Promoter: 5'-TAATACGACTCACTATAA\*GG-3' (\*: A是RNA转录的第一个碱基)

Terminator: 5'-TTCCATCTGTTTTCTTATCTGTTCCTTTCATCTGTTCCTTTTATCTGTTTGT 3'

### 2、线性DNA

一般是经限制性内切酶酶切的质粒或者PCR产物。线性DNA作为转录模板时要避免出现3'突出端, 因而一般选择形成5'突出端或者平末端产物的限制性内切酶。如果无法避免出现3'突出端, 模板DNA在转录前需要用T4 DNA Polymerase处理成平端。酶切产物或PCR产物需要纯化去掉蛋白质、盐离子等以获得高质量的DNA作为模板。

### 3、模板用量

本试剂盒推荐的反应体系适用于大多数模板的反应, 1 μg的模板投入量可以产生120~160 μg的RNA; 然而, 具体产量会因不同模板的长度、纯度、序列和结构而异。对于大多数转录反应, 可通过增大模板投入量及延长反应时间获得更大产量。

### 注意事项

- 避免RNase污染: 请务必使用RNase-free的水、移液枪头和离心管, 操作过程穿戴实验服和手套。
- 请在室温下配制反应: 本试剂盒5×T7 Transcription Reaction Buffer在低温条件下盐浓度高导致盐析出从而影响模板DNA以及酶活性, 因此配制反应体系时除了酶、NTP和帽子类似物需放在冰上暂存, 其他组分均置于室温, 并在室温条件下配制反应。
- 注意加样顺序, 请预先计算好体积, 严格按照以下顺序加入各反应组分: 水→Buffer→NTP→帽子类似物→DNA模板→酶, 模板和酶一定要最后加入。
- 对于 < 500 nt的短片段转录建议使用2 μg模板, 对于100 nt左右超短片段建议使用2 μg模板并延长反应时间至6小时以上, 过夜16小时反应可得到最大产量。
- 若转录时间需达到6小时以上甚至更久, 可使用2 μg模板并将NTP浓度提高至10 mM。

### 操作流程

1. 除了T7 Enzyme Mix之外, 将其余组分短暂离心并收集于管底。
2. 配制转录反应:

Component	Volume
DNA Template	500 ng~2 μg
5× T7 Transcription Reaction Buffer	4 μl
ATP	1.2 μl
GTP	1 μl
CTP	1 μl
N1-me-Pseudo UTP	1 μl
CAP GAG (ENE)	0.8 μl
T7 Transcription Enzyme Mix	2 μl
RNase-free Water	Variable
Total Volume	20 μl



\*注意：提前计算好体系，按照先加水，然后严格按照以下顺序加入各反应组分：水→Buffer→NTP→帽子类似物→DNA模板→酶。

3. 移液枪轻轻混匀各组分并短暂离心收集于管底，37°C孵育2小时。

\*注意：为避免长时间转录反应导致反应液挥发，建议在PCR仪中进行反应并将热盖温度设置为65°C。模板及孵育时间可适当调整。

4. 消化DNA模板：反应结束后，加入2 μl DNase I，37°C反应30分钟；结束后加入1 μl 500 mM EDTA (pH 8.0)终止反应（加入EDTA后应立即进行后续纯化），或者消化完成后不加入EDTA，直接进入纯化步骤。

5. 产物纯化：请参考EasyPure® RNA Purification Kit (ER701) 或MagicPure™ RNA Beads (EC501) 说明书。

6. 转录产物定量、检测：

① 通过紫外分光光度计测定RNA浓度，产物浓度极高，建议稀释后再测。

② 100~1000 nt的RNA产物推荐使用6%丙烯酰胺、7 M尿素变性胶检测，电泳缓冲液为1×TBE Buffer。

• 10×TBE Buffer: 0.9 M Tris Base、0.9 M Boric Acid、20 mM EDTA。

• 凝胶配制方法：每10 ml中，尿素4.2 g，RNase-free Water 4.4 ml，40%（丙烯酰胺:甲叉双丙烯酰胺=19:1）丙烯酰胺1.5 ml，10×TBE Buffer 1 ml，10% AP 100 μl，TEMED 10 μl。AP和TEMED在尿素完全溶解后加入。

③ 500~6000 nt的RNA产物推荐用1%甲醛琼脂糖变性胶检测，电泳缓冲液为1×MOPS Buffer。

• 10×MOPS Buffer: 0.4 M MOPS (pH 7.0)、0.1 M Sodium Acetate、10 mM EDTA。

• 凝胶配制方法：每100 ml中，称量1 g琼脂糖加入72 ml RNase-free Water中，加热溶化后，加入10 ml 10×MOPS Buffer。待溶液冷却至50~60°C时，加入18 ml甲醛（37%），混匀，倒胶。

④ 电泳检测时，取0.2~1 μg RNA，用RNase-free Water稀释至5 μl，加入等体积的2×RNA Loading Buffer混匀，70°C孵育10分钟后冰浴2分钟，全部点样。电泳结束后用Gelstain或EB染色观察。RNA Marker与RNA样品处理方法相同（或参考供应商使用说明书）。

### 数据参考

Fig 1. 使用共转录加帽试剂盒合成800 nt的mRNA，20 μl反应体系中加入500 ng DNA模板，并检测不同时间点的产量，结果显示反应时间在120 min (2 h)时，mRNA的产量达到峰值。实际产量会因具体实验条件的不同而产生差异，本图仅供参考。

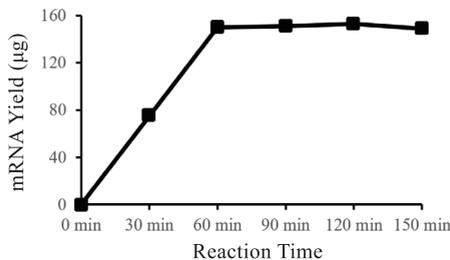


Fig 1. mRNA合成时间累积曲线

Fig 2. 使用帽子类似物对mRNA进行加帽，并通过高效液相色谱分析mRNA的加帽率，表1. 结果显示加帽率达到99%。

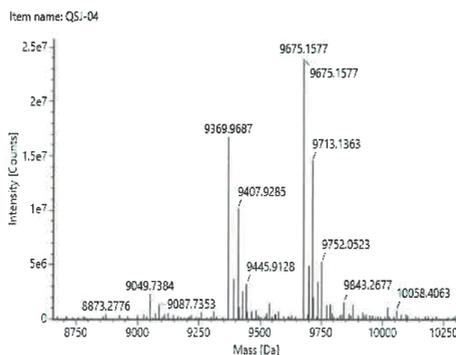


Fig 2. mRNA加帽率分析



表1. 样品成分解卷积结果及加帽率结果分析

Name	Modifiers	Response	Observed mass (Da)	Expected mass (Da)	Mass error (mDa)	Mass error (ppm)	Observed RT (min)	%Cap1
uncapped_monp	/	285962	9221.7516	9221.6159	135.70	14.70	2.90	99.37
Cap1	/	23882538	9675.1577	9674.8543	303.40	31.40	2.90	
Cap1	+K (1)	14576915	9713.1363	9712.9447	191.60	19.70	2.90	
Cap1	+Na (1)	4869230	9697.1357	9696.8362	299.50	30.90	2.90	
Cap1	DIEA	255152	9804.5693	9804.0975	471.80	48.10	2.90	
Cap1	HFIP	1534122	9843.2677	9842.8921	375.60	38.20	2.90	

### 常见问题&解决方案

#### 1. 转录产量低或转录失败

模板质量与RNA产量密切相关，建议设立对照组。若对照组产量低，请联系北京全式金客服，对反应体系配制进行指导；若对照组产量正常但实验组产量低，可能实验组模板本身存在质量问题，建议尝试以下解决方案：①模板可能存在抑制反应的成分，请重新纯化模板，模板DNA应为RNase-free、高纯度；②确定模板定量及其完整性；③延长转录反应时间；④加大模板投入量；⑤尝试其它的启动子和RNA聚合酶。

#### 2. 转录产物电泳出现拖尾现象

可能由以下原因导致：①实验操作过程被RNase污染；②转录模板被RNase污染。

建议重新制备模板DNA，实验用到的耗材及试剂应为RNase-free级别，实验操作中佩戴口罩及一次性乳胶手套，注意RNase污染控制。

#### 3. 转录产物长度大于预期

若电泳显示产物条带大于预期，可能由以下原因导致：①模板没有完全线性化；②有义链3'端为突出结构；③产物RNA存在未完全变性的二级结构。

建议以下解决方案：①检查模板是否完全线性化，需保证线性化完全；②选择合适的限制性内切酶，确保有义链5'端为突出结构或双链为平末端；③检查模板结构，用变性胶检测RNA产物。

#### 4. 转录产物长度小于预期

若电泳显示产物条带小于预期，可能原因有：①模板序列中含有类似T7 RNA聚合酶的转录终止子序列，导致转录提前终止；②模板序列GC含量高而形成高级结构；③RNase污染。

若模板含终止子序列，建议优化RNA序列；若模板GC含量高，可尝试加入SSB蛋白以提高产量和转录长度。

#### 5. 短片段转录产量低

转录片段太短会抑制反应，当转录长度 < 500 nt时，请延长反应时间并增加模板投入量，建议使用2 μg模板，对100 nt超短片段的转录建议使用2 μg模板并反应至少6小时，过夜转录16小时可获得最大产量。

#### 6. 本试剂盒仅供科研或生产使用，不可直接用于人体。

本产品仅供研究，不用于临床诊断。

版本号: V1.0-202601

服务电话 +86-10-57815020

服务邮箱 complaints@transgen.com

