

Code No. 6140

研究用

Takara

In vitro Transcription T7 Kit
(for siRNA Synthesis)

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品内容	1
● 保 存	1
● 实验操作注意	1
● 模板 DNA 的制备	1
● <i>in vitro</i> transcription 反应	2
● DNase 处理	3
● 转录 RNA 精制	3
● 制作 siRNA	3
● 实验例	4
● Troubleshooting	8
● 参考文献	9
● 关联产品	9

本产品是利用T7 RNA Polymerase进行体外转录 (*in vitro* transcription), 大量合成siRNA的试剂盒。试剂盒使用了T7 RNA Polymerase, 以含有T7 Promoter序列的线型双链DNA为模板, 可以对Promoter下游的DNA序列进行转录, 高效合成单链RNA。试剂盒中附带有Control Template (线型Plasmid DNA), 以20 ng的Control Template为模板, 在20 μ l的转录反应体系中, 可以合成约10 μ g的2 kb单链RNA。另外, 本试剂盒含有RNase T1, 该酶可特异性切断单链RNA的鸟苷酸3'端的磷酸。体外转录反应后可以合成siRNA。

(注意) 本试剂盒适用于合成大量RNA, 不推荐用于制作高比活性的RNA probe。

● 制品内容 (50 次量, 20 μ l 反应体系)

10 \times Transcription Buffer	100 μ l
T7 RNA Polymerase (50 U/ μ l)	100 μ l
RNase Inhibitor (40 U/ μ l)	25 μ l
ATP Solution (50 mM)	100 μ l
GTP Solution (50 mM)	100 μ l
CTP Solution (50 mM)	100 μ l
UTP Solution (50 mM)	100 μ l
RNase free DNase I (5 U/ μ l)	200 μ l
Control Template (50 ng/ μ l)	20 μ l
RNase T1 (100 U/ μ l)	25 μ l
RNase T1 Dilution Buffer	700 μ l
RNase free dH ₂ O	1 ml
10 \times Annealing Buffer*	500 μ l

* 二条 Oligo DNA 退火时使用。

Buffer 组成: 100 mM Tris-HCl (pH8.0), 500 mM CH₃COOK, 10 mM EDTA。

● 保存: -20 $^{\circ}$ C

● 实验操作注意

1. 反应体系中须严格注意不要混入 RNase。
2. 实验器材 (如: 枪头、Microtube 等) 注意严格使用 RNase Free 用品。
3. 实验操作时请注意戴一次性手套, 防止 RNase 污染。

● 模板 DNA 的制备

含有 T7 启动子, 线性化质粒或 PCR 扩增产物可以作为模板。

T7 启动子序列



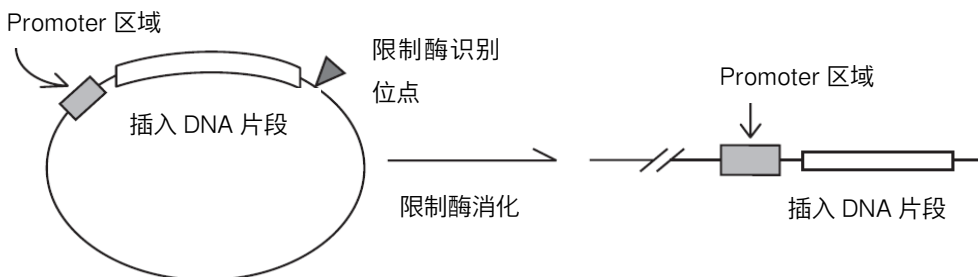
粗体字 +1 的 G 开始转录 RNA。

1. 质粒作为模板

向含有 T7 启动子的质粒载体中插入目的 DNA, 然后用限制酶进行处理。这时, 在启动子区域右侧、插入 DNA 片段的下游, 使用在插入 DNA 片段中无识别位点的限制酶对质粒进行线性化处理。请使用能形成 5' 突出或者平滑末端的限制酶。反应结束后, 进行 Proteinase K 处理及精制反应。

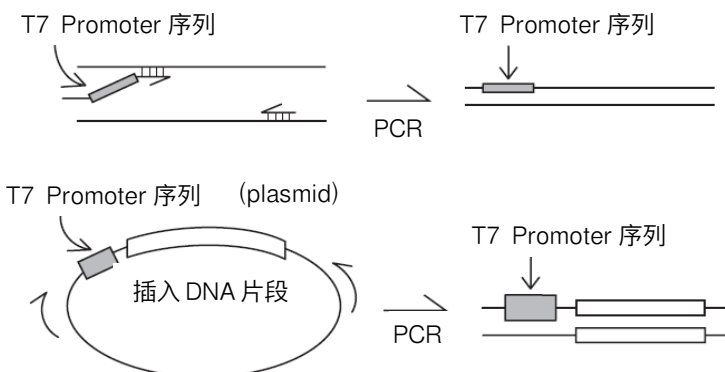
- 1) 限制酶反应液中, 加入终浓度为 100 μ g/ml 的 Proteinase K 与终浓度为 0.5% 的 SDS。
- 2) 37 $^{\circ}$ C 反应 30 分钟。
- 3) TE 饱和的苯酚/氯仿处理。

- 4) 加入 1/10 体积的 3 M 醋酸钠及 2.5 倍体积的乙醇进行乙醇沉淀。
- 5) 离心回收的 DNA 沉淀用 80%乙醇洗净处理。
- 6) RNase-free TE Buffer 溶解。



2. PCR 扩增产物作为模板

T7 启动子 (TAATACGACTCACTATAGGG) 添加在 sense primer 的 5' 端 (这时, 在 T7 启动子序列的上游添加 6~10 个核苷酸可以更有效地促进 T7 RNA polymerase 结合并合成 RNA)、或者插入目的片段的质粒 DNA 的 T7 启动子上游设定 sense primer 及 anti-sense primer 进行 PCR 扩增。扩增产物可使用 NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Code No. 740609 .10/.50/.250) 进行精制。



● *in vitro* transcription 反应

- (1) 配制下列反应液。

试剂	使用量
10× Transcription Buffer	2 μl
ATP Solution	2 μl
GTP Solution	2 μl
CTP Solution	2 μl
UTP Solution	2 μl
RNase Inhibitor	0.5 μl
T7 RNA Polymerase	2 μl
RNase free dH ₂ O	X μl
linear template DNA*	20 ng~1 μg
Total	20 μl

*10× Transcription Buffer 中含有亚精胺。亚精胺与核酸形成复合体易产生沉淀。模板 DNA 必须最后添加。

上述反应体系为 20 μl, 可适当增减反应体系。

- (2) 将上述溶液均匀混合后轻微离心，将转录反应液收集于反应管底部，42℃反应 1~2 小时。
 注意：反应结束后，有可能产生白色沉淀。这是反应过程中游离的焦磷酸与反应液中的镁离子形成焦磷酸镁，不影响后续实验。如想除去，添加 EDTA 即可消失。添加 EDTA 如果影响后续实验，离心回收上清也可以。

● DNase 处理

如果想要除去 DNA，转录反应后按下面方法进行 DNase 处理。

- (1) 转录反应后，向其中加入 10~20 U/20 μl 反应液的 RNase free DNase I，混匀。
- (2) 37℃反应 30 分钟。

● 转录 RNA 精制

A. 按照下面方法进行苯酚/氯仿抽提、异丙醇沉淀。

反应液体积低于 100 μl 时，加入 RNase free dH₂O 补足至 100 μl。

- (1) 加入等体积的苯酚 (pH4.5) /氯仿/异戊醇 (25: 24: 1)，vortex 搅拌，12,000 rpm 室温离心 2 分钟。
- (2) 上层 (水层) 移至新 tube 中，加入等体积的氯仿/异戊醇 (24: 1)，vortex 搅拌，12,000 rpm 室温离心 2 分钟。
- (3) 上层 (水层) 移至新 tube 中，加入 1/10 体积的 3 M 醋酸钠、等体积的异丙醇，充分混合均匀。
- (4) 室温放置 5 分钟后，15,000 rpm 室温离心 5 分钟。
- (5) 除去上清，80%乙醇洗净沉淀。
- (6) 干燥后加入 RNase free dH₂O 或者 TE Buffer 溶解沉淀。
- (7) 如有必要，可小量分装保存于-20℃~-70℃。

B. 也可以使用下述商业化产品 (当 transcript RNA size>200 bases)

NucleoSpin RNA Clean-up (740948.10/740948.50/740948.250)

NucleoSpin RNA Clean-up XS (740903.10/740903.50/740903.250)

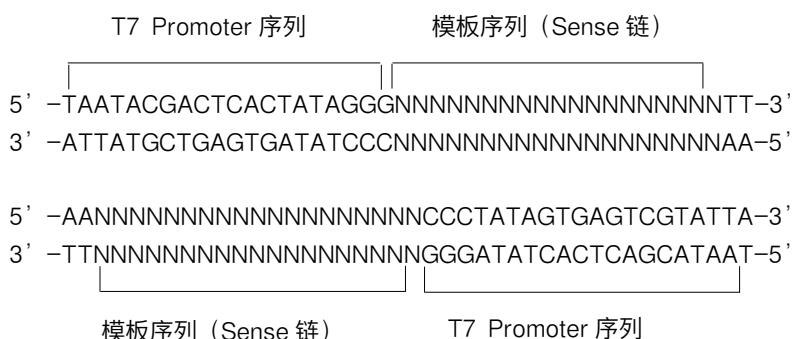
● 制作 siRNA

按照下面的方法利用本试剂盒可以制作 siRNA。

(概要)

<Step 1>

制备向 T7 启动子序列附加 siRNA 序列的双链 DNA Oligonucleotide 两组。



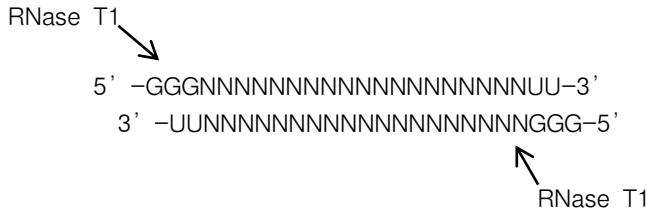
<Step 2>

制备的两组双链 DNA Oligonucleotide 作为模板在一个 tube 中进行 *in vitro* transcription 反应。同时合成 Sense 与 anti-sense RNA。合成的 RNA 可形成双链。



<Step 3>

DNase I 消化模板 DNA Oligonucleotide, RNase T1 分解 RNA 一条链的 GGG 部分。



<Step 4>

精制并回收 3' 末端突出 2 个碱基的 siRNA。



(DNA Oligonucleotide 的设计)

关于制备 siRNA 用的合成 Oligonucleotide 的设计,首先需要确定目的 siRNA 序列,然后 siRNA 的 sense、anti-sense 分别设计一组,向 T7 启动子适当的方向共合成 4 条 Oligonucleotide。在 T7 启动子的上游添加 6 个左右的任意碱基可提高转录效率。

● 实验例

合成针对 GFP 的 RNA 干扰用 siRNA 进行 RNA 干扰实验,确认使用本试剂盒进行体外转录合成的 siRNA 在 RNA 干扰实验中的效果。

1. 合成下列单链 Oligo DNA

分别合成 4 条正常实验用的单链 Oligo DNA (见图 1) 以及作为 Negative Control 实验用的 4 条单链 Oligo DNA (见图 2), Negative Control 实验用的 4 条单链 Oligo DNA 的粗黑字部分的 DNA 序列,是对正常实验用的 4 条单链 Oligo DNA 的同一部分进行序列更改 (Shuffle) 后的 DNA 序列,对 GFP 不会发生 RNA 干扰作用。

注意:为了 T7 RNA Polymerase 能够进行有效反应,在设计合成 Oligo DNA 时,T7 Promoter 序列之前(5' 端方向)应多加 6 个碱基。根据我们的经验,以加 GATCAC 为佳。

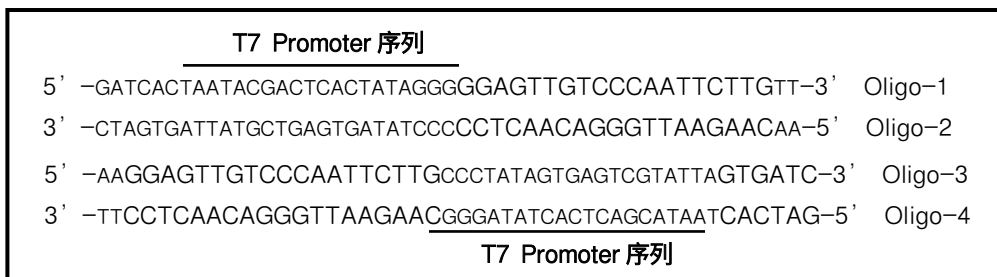


图 1. 正常实验用的 4 条单链 Oligo DNA 序列

T7 Promoter 序列

5' -GATCACTAATACGACTCACTATAGGGGGGATGTCTCACATCTTGTTT-3' n-Oligo-1
 3' -CTAGTGATTATGCTGAGTGATATCCCCCTACAGAGTGTAGAACAAA-5' n-Oligo-2
 5' -AAGGGATGTCTCACATCTTGTCCCTATAGTGAGTCGTATTAGTGATC-3' n-Oligo-3
 3' -TTCCCTACAGAGTGTAGAACAGGGATATCACTCAGCATAATCACTAG-5' n-Oligo-4

T7 Promoter 序列

图 2. Negative Control 实验用的 4 条单链 Oligo DNA 序列

2. 双链 Oligo DNA 的制备

- ① 将合成的单链 Oligo DNA 用灭菌蒸馏水溶解，配制成 100 pmol/μl 的 DNA 溶液。
按下列组份配制 Oligo DNA 退火反应液。

试剂	使用量
10× Annealing Buffer	2 μl
100 pmol/μl Oligo A*	2 μl
100 pmol/μl Oligo B*	2 μl
灭菌水	14 μl

* A、B 必须配对，具体配对情况如下：

Oligo-1 和 Oligo-2；Oligo-3 和 Oligo-4；

n-Oligo-1 和 n-Oligo-2；n-Oligo-3 和 n-Oligo-4。

- ② 将上述 Oligo DNA 退火反应液置于 PCR 扩增仪上，95℃处理 2 分钟后，经 45 分钟冷却至 25℃，然后在 25℃保持 10 分钟。此时一对单链 Oligo DNA 便经退火形成双链 Oligo DNA，双链 Oligo DNA 的浓度为：10 pmol/μl。该溶液可作为模板 DNA 使用。不使用时保存于-20℃。

3. 体外转录反应

- ① 按下列组份配制 RNA 体外转录反应液。

试剂	使用量
10× Transcription Buffer	2 μl
ATP Solution	2 μl
GTP Solution	2 μl
CTP Solution	2 μl
UTP Solution	2 μl
RNase Inhibitor	0.5 μl
T7 RNA Polymerase	2 μl
RNase free dH ₂ O	X μl
10 pmol/μl 双链 Oligo DNA 溶液 (Oligo-1/-2) *1	1 μl
10 pmol/μl 双链 Oligo DNA 溶液 (Oligo-3/-4) *1	1 μl
Total	20 μl*2

* 1. 10× Transcription Buffer 中含有亚精胺。亚精胺与核酸形成复合体易产生沉淀。模板 DNA 必须最后添加。

* 2. 反应体系可以按比例放大

- ② 将上述溶液均匀混合后轻微离心，将转录反应液收集于反应管底部，42℃反应 2 小时。取反应液的一部分进行凝胶电泳确认体外转录后的 RNA 产物。

4. 核酸酶处理

①在体外转录反应后的反应管中加入下列溶液。

试剂	使用量
RNase free DNase I (5 U/ μ l)	2 μ l
RNase T1 (4 U/ μ l) *	1 μ l

*: 4 U/ μ l RNase T1: 使用 RNase T1 Dilution Buffer 稀释试剂盒中的 RNase T1 至 4 U/ μ l。
(稀释后的 RNase T1 应尽快使用, 不宜保存。)

② 37°C反应 2 小时。

5. siRNA 的纯化

① 向上述反应液中加入等体积的水饱和的酸性苯酚/氯仿/异戊醇 (25: 24: 1), 上下充分倒置混合后室温 10,000 rpm 离心 5 分钟。

② 将上层 (水层) 移至另一新的离心管中, 加入等量的 5 M 的醋酸铵 (pH5.6) 和 4 倍量的 99.5%的乙醇。室温静置 5 分钟后, 室温 15,000 rpm 离心 10 分钟。除去上清液后加入 100 μ l 的 80%的乙醇, 室温 15,000 rpm 离心 5 分钟。

③ 除去上清液, 轻微干燥后加入 20~50 μ l 的 RNase Free dH₂O 溶解沉淀。

注: 如果上述纯化方法不能完全去除 NTP, 或反应体系按比例放大时, 建议使用 CHROMA SPIN™ + TE-30 columns (Code No. 636069)。

④ 测定上述溶液的 OD₂₆₀ 值, 凝胶电泳确认 RNA 纯度。

6. RNA 干扰实验 (siRNA 效果检定)

① 将 GFP 表达质粒和 siRNA 溶液同时导入至 293T 细胞中来验证 RNA 干扰效果。

使用 *TransIT*[®]-293 (Code No. MIR2700) 和 *TransIT*-TKO[®] (Code No. MIR2150) 将 GFP 表达质粒和上述配制的 siRNA 溶液同时导入至 293T 细胞中, 细胞经培养后的第二天使用 FCM (Flow Cytometry) 测定细胞中的 GFP 荧光强度 (mean 值)。

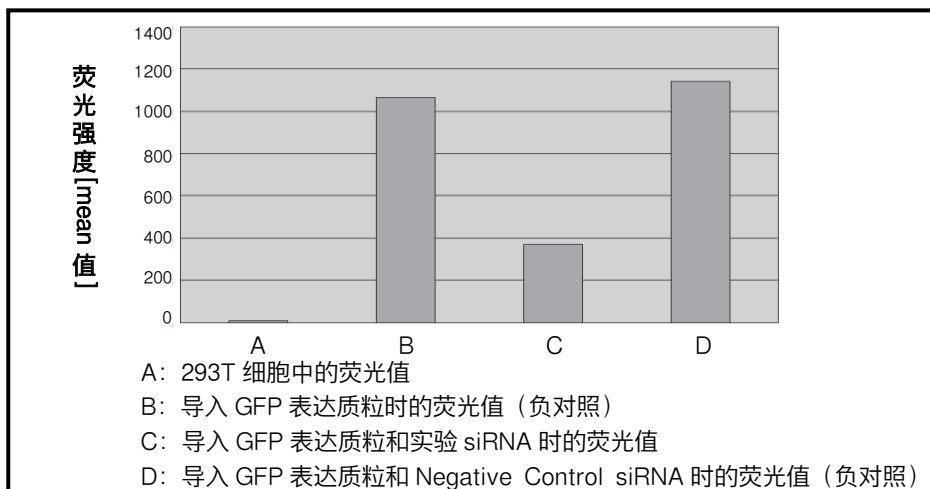


图 3. RNA 干扰实验结果图 (荧光检测结果)

② 在上述①的各种实验细胞中提取 Total RNA, 进行 Real Time RT-PCR 反应, 检定各种情况下的细胞中的 GFP mRNA 表达量。

使用 Smart Cycler II System (Cepheid)、嵌合法检测, 50 ng Total RNA 作为模板, 选择四种管家基因对 RNA 表达量进行校正。

结果显示 (见图 4), GFP mRNA 表达量降低, 经本实验体外转录合成的 siRNA 显示了良好的 RNA 干扰效果。

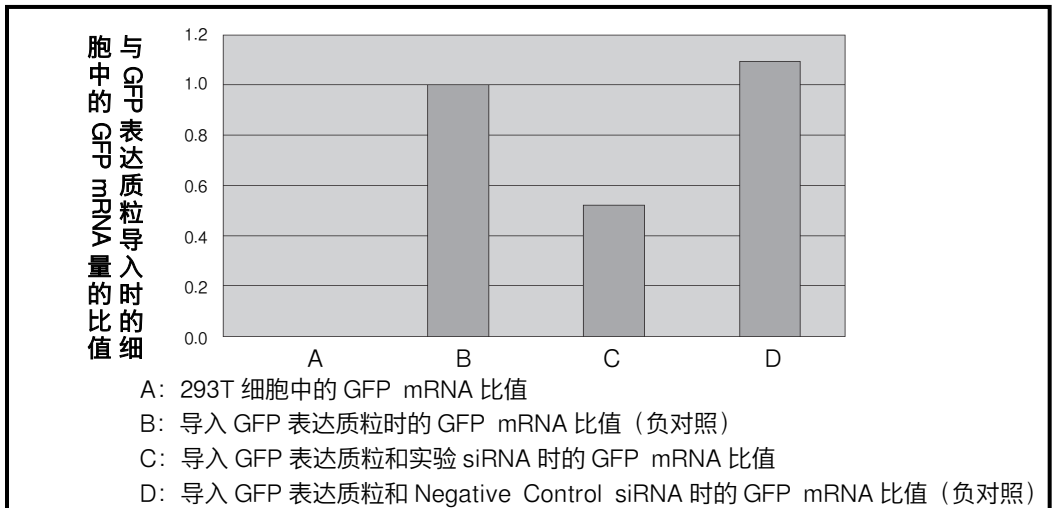
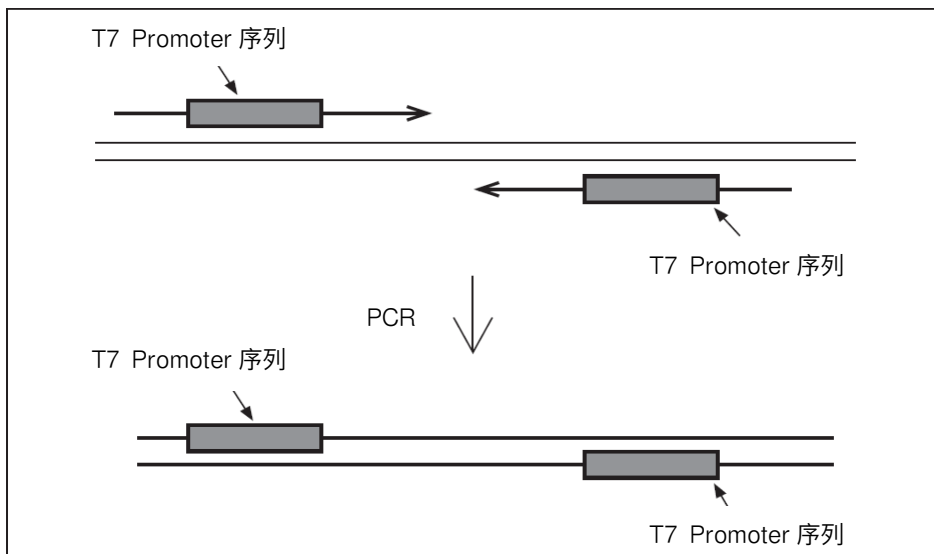


图 4. RNA 干扰实验结果图 (GFP mRNA 量检测结果)

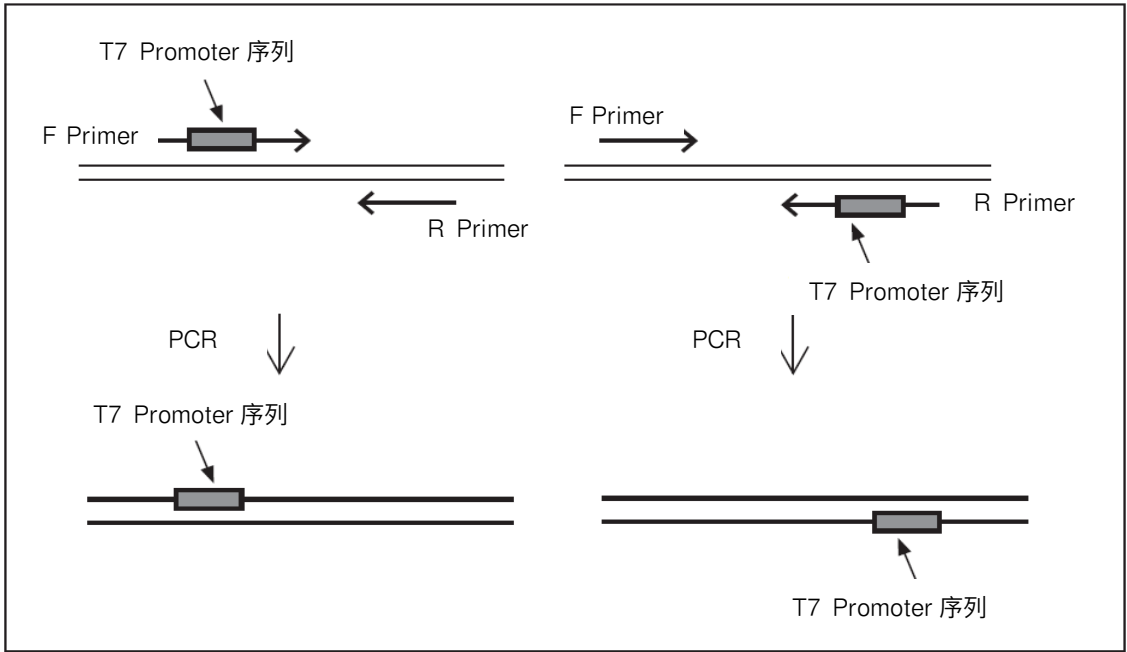
(参考)

利用本试剂盒，按照下面方法合成的双链 RNA 可以作为 Dicer 和 RNase III 的底物。

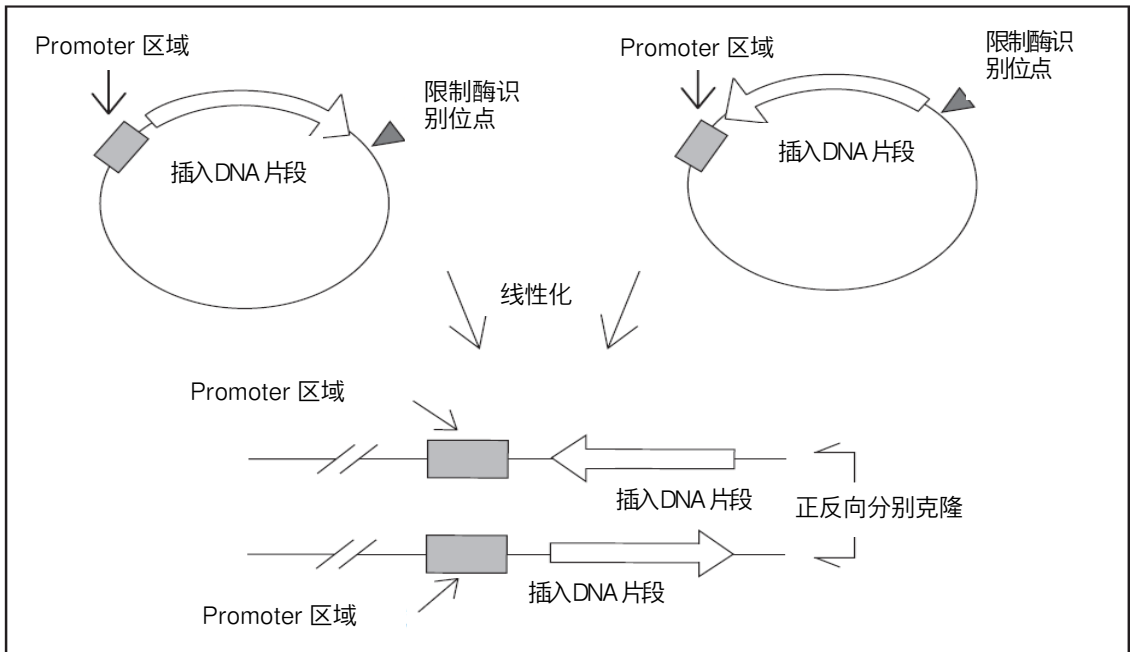
- (A) 利用一对 5' 端添加 T7 启动子序列的引物进行 PCR 扩增, 制作成 5' 端含有 T7 启动子的双链 DNA (见模板例 1)。该双链 DNA 作为模板进行 *in vitro* transcription 反应。合成的 RNA 如果是 800 base 以下可以进行退火形成双链 RNA。但是比 (B) 收量要低。
- (B) 利用一个 5' 端添加 T7 启动子序列的引物、另一个为通常的引物进行 PCR 扩增, 制作成模板例 2 的扩增产物。使用相同量的 PCR 扩增产物为模板在同一 tube 中同时进行 *in vitro* transcription 反应。或者分别使用 PCR 扩增产物为模板进行 *in vitro* transcription 反应后, 退火形成双链 RNA。比 (A) 收量多。
- (C) 向含有 T7 启动子序列的载体正向及反向分别克隆想要转录 RNA 的片段, 然后分别线性化 (见模板例 3)。2 种等量的线性化的质粒作为模板, 在 1 个 tube 中同时进行 *in vitro* transcription 反应。或者分别进行 *in vitro* transcription 反应后, 退火形成双链 RNA。



模板例 1



模板例 2



模板例 3

● Troubleshooting

1. RNA 合成量少

(1) 模板 DNA 混入 RNase 或者 EDTA 等。

→模板 DNA 进行 Proteinase K 处理。

模板溶液中，加入终浓度为 100 $\mu\text{g/ml}$ 的 Proteinase K 与终浓度为 0.5% 的 SDS。37°C 反应 30 分钟后，苯酚/氯仿处理、乙醇沉淀以及 80% 乙醇洗净处理。

- (2) 模板 DNA 中含有 NaCl。
→高浓度 (>30 mM) 的 NaCl 使 RNA Polymerase 活性下降。进行脱盐操作 (使用 Spin Column 或者再次进行乙醇沉淀, 80%乙醇洗净处理 2 次) 除去 NaCl。
 - (3) 模板 DNA 量少。
→制备的模板 DNA, 不仅需要测定吸光度 (OD₂₆₀), 还需要电泳确认, 保证模板 DNA 用量准确。
 - (4) 反应时间短。
→确认反应时间为 1~2 小时。根据模板 DNA 的不同, 有必要适当延长反应时间。请尝试反应时间延长至 4 小时左右。
2. 可见到多个反应产物, 或者无目的产物。
- (1) 使用了能形成 3' 突出的限制酶。
→以质粒 DNA 为模板时, 线性化时如果形成 3' 突出末端, 会合成很长的 transcription RNA (见参考文献 3)。不要使用形成 3' 突出的限制酶。如果无法使用其它限制酶时, 请进行平滑化处理。
 - (2) 质粒线性化时酶切不完全。
→线性化样品要电泳确认。如果酶切不完全, 请再次进行酶切处理。
 - (3) 电泳时 RNA 形成二级结构。
→*in vitro* transcription 反应合成的 RNA 通常使用非变性凝胶电泳。如果形成二级结构, 将出现比预想的条带大或者两条带。这时请使用变性凝胶电泳; 或者合成的 RNA 与变性 Buffer (64%甲酰胺、26 mM MOPS, pH7.2、6.45 mM 醋酸钠、0.6 mM EDTA) 混合, 65°C 15 分钟处理后电泳可以消除 RNA 二级结构的条带。

● 参考文献

- (1) Davanloo, P., Rosenberg, AH., Dunn, JJ., Studier, FW. Cloning and expression of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase. : *Proc Natl Acad Sci USA*. (1984) **81**: 2035–2039.
- (2) Browning, K S. Transcription and translation of mRNA from polymerase chain reaction-generated DNA. *Amplifications*. (1989) **3**: 14–15.
- (3) Schenborn, E T. and Mierendorf Jr, R C. A novel transcription property of SP6 and T7 RNA polymerase : dependence on template structure. *Nuc Acids Res*. (1985) **13**: 6223–6236.
- (4) Heinonen, J E., Smith, Cl., and Nore, B F. Silencing of Bruton's tyrosine kinase (Btk) using short interfering RNA duplexes (siRNA). *FEBS Letter*. (2002) **527**: 274–278.

● 关联产品

T7 RNA Polymerase (Code No. 2540A/B)
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Code No. 740609.10/.50/.250)
CHROMA SPIN™+TE-30 Columns (Code No. 636069)
NucleoSpin RNA Clean-up (740948.10/.50/.250)
NucleoSpin RNA Clean-up XS (740903.10/.50/.250)

CHROMA SPIN is a trademark of Takara Bio USA, Inc.

注意

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

未经Takara Bio Inc.书面许可授权或批准，不得制造、许诺销售、销售、进口Takara产品，或者使用Takara产品所有的相关专利及相关商标。

如果您需要其他用途的许可授权，请联络我们，或访问我们网站www.takarabio.com。

您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。

所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

本文件由宝日医生物技术（北京）有限公司翻译制作，最新版本文件请参考 Takara Bio Inc.网站。为正确使用 Takara 产品，您应当掌握本产品的相关知识和使用说明。

技术咨询热线：

0411-87641685, 87641686

4006518761, 4006518769

TAKARA BIO INC.

URL: <https://www.takarabiomed.com.cn>

v202106Da