

Code No. 6141

研究用

Takara

Takara IVTpro™ mRNA
Synthesis System

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	2
● 保 存	2
● 试剂盒外所需主要试剂及器具	2
● 操作注意事项	3
● 目标基因的克隆: (1) Cloning Kit for mRNA Template	3
● 线性化模板质粒的制备: (2) Takara IVTpro T7 mRNA Synthesis Kit	5
● IVT 反应	6
● DNase I 的处理	7
● LiCl 沉淀纯化	7
● 实验例	8
● Troubleshooting	12
● 参考文献	13
● 关联产品	14

● 制品说明

Takara IVTpro™ mRNA Synthesis System由如下两个试剂盒组成。

(1) 使用了TriLink公司的Cap类似物 [CleanCap Reagent AG 或 CleanCap Reagent AG (3' OME)]、可轻松用于构建*in vitro* transcription (IVT) 模板质粒的克隆试剂盒。

(2) 使用构建的模板质粒, 通过*in vitro* transcription (IVT) 来合成高质量、高产量CleanCap修饰mRNA的试剂盒。

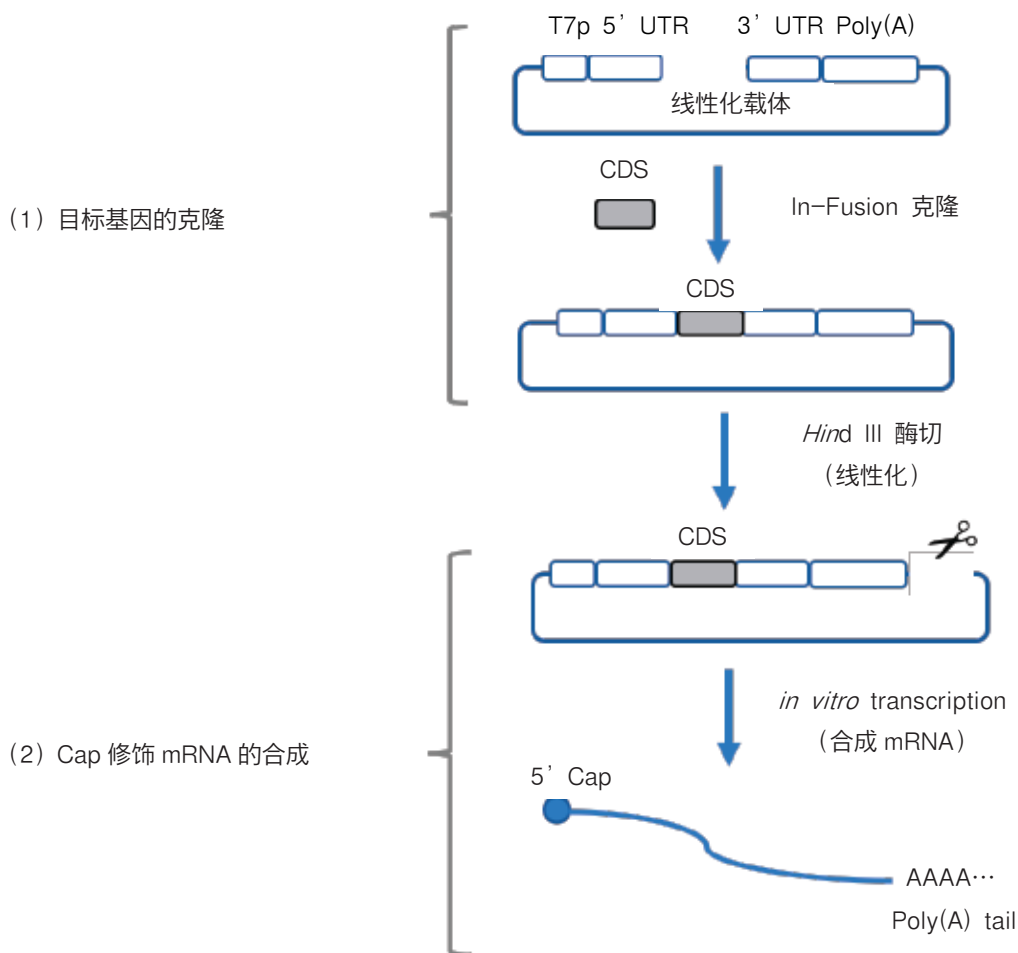


图 1. 本产品的实验流程概要

(1) Cloning Kit for mRNA Template (Code No. 6143)

由于预线性载体中含有T7 promoter、转录起始序列 (AGG)、5' -UTR (untranslated region)、3' -UTR、Poly(A)序列 (105碱基), 故仅通过In-Fusion®克隆想要表达的基因编码序列 (coding sequence: CDS), 便能构建可用于人类、小鼠等哺乳动物细胞的使用了CleanCap Reagent AG进行mRNA合成用的模板质粒。

(2) Takara IVTpro T7 mRNA Synthesis Kit (Code No. 6144)

以含有T7 promoter序列的双链DNA为模板, 通过*in vitro* transcription (IVT) 反应来合成mRNA的试剂盒。真核生物中的高效蛋白质翻译需要RNA的5' 端有Cap结构, 本产品使用CleanCap Reagent AG (TriLink公司的Cap类似物: 需要另外购买), 能够高效制备具有Cap结构的mRNA。此外, 为了降低导入细胞中的免疫原性, 可以使用假尿苷代替普通尿苷 (UTP), 而且不会明显降低mRNA的产量。

● 制品内容

Cloning Kit for mRNA Template*1 (Code No. 6143) (10 次反应)

ⓁTV	Linearized Template Vector (50 ng/μl)	10 μl
ⓁLuc	FLuc Control Fragment (100 ng/μl) *2	10 μl
ⓁIn-Fusion	5X In-Fusion Snap Assembly Master Mix*3	20 μl

Takara IVTpro T7 mRNA Synthesis Kit*1 (Code No. 6144) (20 次、20 μl 反应体系)

ⓁTB	10X Transcription Buffer	40 μl
ⓁATP	10X ATP	40 μl
ⓁCTP	10X CTP	40 μl
ⓁGTP	10X GTP	40 μl
ⓁUTP	10X UTP	40 μl
ⓁEM	10X Enzyme Mix	40 μl
ⓁH ₂ O	Nuclease-Free Water	1 ml × 3
ⓁDNase I	DNase I	80 μl
ⓁLiCl	Lithium Chloride Precipitation Solution	600 μl
ⓁPCT	Positive Control Template (FLuc) (0.5 μg/μl) ·	10 μl

*1: 可以单独购买;

*2: 用于 In-Fusion 克隆的对照 DNA 片段, 其中包含了 *Photinus pyralis* 荧光素酶 CDS, 优化用于人类细胞。

*3: 与 In-Fusion Snap Assembly Master Mix (Code No. 638943/638944/638947 – 638949) 相同。

*4: 由 T7 启动子 + 5' UTR + FLuc-CDS + 3' UTR + Poly(A) 组成的线性化质粒 DNA。

● 保 存: -20°C

● 试剂盒外所需主要试剂及器具

【试剂】

- 感受态细胞
 - *E. coli* HST08 Premium Competent Cells (Code No. 9128)
 - Stellar™ Competent Cells (Code No. 636763) 等
- SOC培养基
- LB (Luria-Bertani) 培养基
- LB / 卡那霉素 (50 μg/ml) 平板
- *Hind* III (Code No.1060A/B)
- Cap类似物
 - CleanCap Reagent AG (TriLink公司: Code No. N-7113-1/5/10)
 - CleanCap Reagent AG (3' OMe) (TriLink公司: Code No. N-7413-1/5/10)
- 修饰NTP
 - N¹-Methylpseudouridine-5' -Triphosphate
 - Pseudouridine-5' -Triphosphate
 - 5-Methoxyuridine-5' -Triphosphate
 - 5-Methylcytidine-5' -Triphosphate等
- 乙醇、3 M醋酸钠 (pH5.2)、TE buffer (含0.1 mM EDTA)

【实验器具】

- 反应试管、微量移液器、吸头
- 恒温水浴箱或Thermal cycler
- 冷却离心机
- 分光光度计

● 操作注意事项

如果双链 DNA 模板、试剂、用于反应的试管、微量移液器吸头等混入 RNase 污染, 会导致反应后获得的 RNA 收量降低, RNA 会发生片段化。反应中应使用专用试管和微量移液器吸头, 并佩戴新的一次性手套以防止 RNase 污染。

● 目标基因的克隆: (1) Cloning Kit for mRNA Template

(1) 产品概要

Cloning Kit for mRNA Template (Code No. 6143) 的产品概要如图 2 A/B 所示。

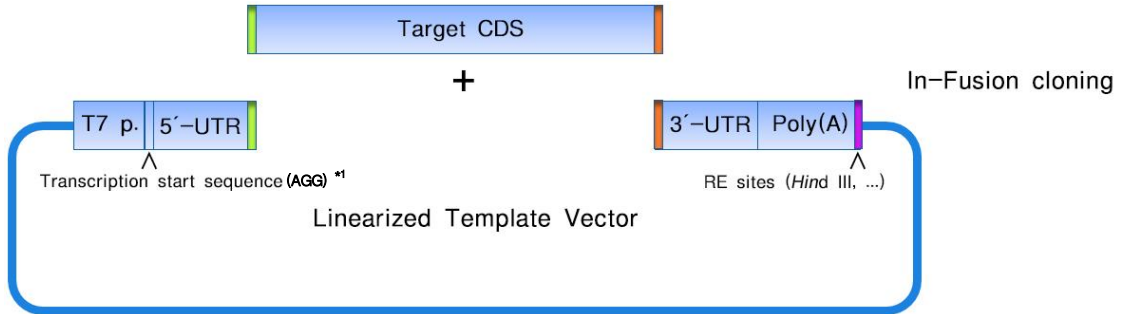


图 2A. 通过 In-Fusion 克隆*2构建模板质粒

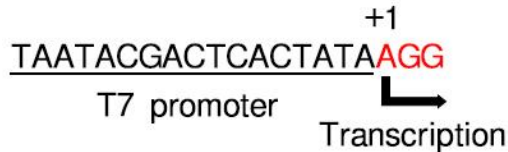


图 2B. 使用 CleanCap Reagent AG 时的 DNA 模板转录起始序列 (AGG)

* 1: “Transcription start sequence (AGG)” 是使用 CleanCap Reagent AG 有效制备带 Cap 结构的 mRNA 时所需的转录起始序列。

* 2: In-Fusion 克隆的详细内容参照本公司网站的 In-Fusion Snap Assembly Master Mix (Code No. 638947~638949) 页面。

(2) 模板 DNA 的制备

※以下方案中使用 Cloning Kit for mRNA Template (Code No. 6143)。

A) 目标基因的 CDS 设计

1. 获取要表达基因的 CDS 信息。
 - 表达某基因时需要其 CDS (翻译成蛋白质的起始密码子到终止密码子的 DNA 序列)。表达基因的部分区域也需要起始密码子和终止密码子序列 (参照 B) 通过 PCR 方法制备目的 CDS 片段)。
 - 虽然载体端也包含一个终止密码子序列, 但为了确保目标蛋白质的翻译终止, 请准备包含终止密码子在内的 CDS。
2. 根据引入 mRNA 的细胞种类, 优化 CDS 密码子。
 - 请使用在线工具或市售软件。
 - 在 *in vitro* transcription 合成 RNA 时, 为了抑制哺乳动物宿主细胞的免疫原性会使用假尿苷等代替一般尿苷 (UTP) (参考文献 1), 但降低序列本身中包含的 U 的使用频率也很重要 (参考文

- 献 2 和 3)。请考虑符合生物种类的密码子优化以及平衡 U 的使用频率来设计 CDS。
3. 确认模板质粒线性化过程使用的限制性内切酶识别位点 (推荐 *Hind* III) 不存在于要克隆的目标基因的 CDS 中。如果要使用的限制性内切酶位点存在于 CDS 中, 则使用不改变氨基酸序列的不同的密码子(例如: 丝氨酸密码子的“UCU”到“UCC”)来改变 DNA 序列。
【注意】本载体中强烈推荐使用 *Hind* III。
 - 使用限制性内切酶使模板质粒线性化, 以使目的 mRNA 的转录大小均质化。据报道, 当用限制性内切酶切断的模板质粒末端为 3' 突出时, 还会合成对应于非预期反义或载体序列的 RNA (参考文献 4), 因此推荐会形成 5' 突出或平滑末端的限制性内切酶。此外, mRNA 的 Poly(A) 序列之后的额外序列可能会降低 mRNA 的翻译效率。请使用尽可能不会残留额外序列的限制性内切酶进行酶切。
 4. 通过合成 DNA 或 cDNA 克隆等制备所需的基因的 CDS。

B) 通过 PCR 方法制备目的 CDS 片段

1. 如下所示, 在能够进行目的基因 CDS 扩增的 Forward 和 Reverse 引物的 5' 端, 添加 15 个碱基的 In-Fusion 序列 (红色)。
- 起始密码子 (蓝色) 和终止密码子 (绿色: 互补链)
- 在设计 CDS 中加入上述 In-Fusion 序列的合成双链 DNA 片段也可用于 In-Fusion 克隆。此时, 请继续 C) In-Fusion 克隆。

例: FLuc

Forward primer:

5' -AGAGAACCCGCCACCATGAGGACGCCAAGAACATCAA-3'

Reverse primer:

5' -CGAGGCTCCAGCTCATCACGCGGATCTTGCCGC-3'

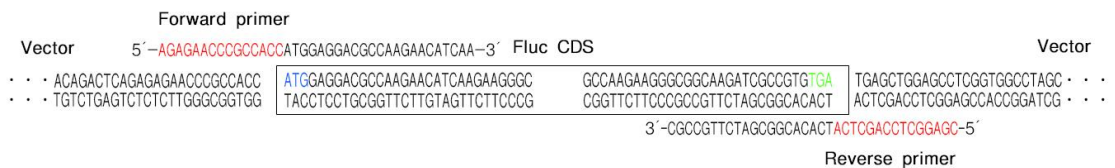


图 3. 目标 CDS 片段的扩增 (例: FLuc)

2. 使用上述引物, 对本产品的 **LTV** Linearized Template Vector 的两端及分别有 15 个碱基重叠区的 CDS 进行 PCR 扩增。
 - 请使用具有高保真性的 PrimeSTAR® Max DNA Polymerase (Code No. R045A/B)、或具有高保真及高 PCR 成功率的 TaKaRa Ex Premier™ DNA Polymerase (Code No. RR370S/A/B、RR371S/A/B) 来进行目标基因的 CDS 片段扩增。
3. 取部分反应液 (如 5 μl) 进行琼脂糖凝胶电泳, 确认扩增的 PCR 产物及其含量。
 - 通过 DNA 纯化进行洗脱后, 需要约 50~100 ng/μl 的 DNA 溶液。与大小相当的 DNA 标记的条带量进行比较, 并确认已扩增了足够量。
4. 如果获得足够量的 PCR 产物为单条带时, 请使用离心柱纯化试剂盒 (例如 NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Code No. 740609.10/.50/.250)) 进行纯化。
 - 纯化后不立即使用时, 请保存于 -20°C。
 - 如果有多个扩增产物, 请尝试切胶回收目标 PCR 产物, 或进行 PCR 条件优化、重新设计引物。

C) In-Fusion 克隆

1. 在室温下溶解 (LTV) Linearized Template Vector 和 CDS 片段, 轻轻混合后进行离心。
2. 制备如下反应液。

<每个反应>

试剂		使用量
(LTV)	Linearized Template Vector (50 ng/ μ l)	1 μ l
	添加了 In-Fusion 序列的 CDS 片段 *	100 ng
	Nuclease-Free Water	X μ l
(In-Fusion)	5X In-Fusion Snap Assembly Master Mix	2 μ l
Total		10 μ l

*: 使用 (FLuc) FLuc Control Fragment 时, 请使用 1 μ l (100 ng)。

3. 50°C保温 15 分钟。
 - 反应后不立即使用时, 请保存于冰上或-20°C。

D) 转化

使用 Stellar Competent Cells 或 *E. coli* HST08 Premium Competent Cells 时的操作流程如下所示。使用转化效率不低于 1×10^8 cfu/ μ g 的感受态细胞。

1. 在冰上融化感受态细胞。
2. 轻轻混合后, 将 50 μ l 感受态细胞转移到试管中。
3. 加入 2.5 μ l 反应液轻轻混匀, 冰上静置 30 分钟。
4. 将感受态细胞在 42°C下热激 45 秒。
5. 在冰上冷却 1~2 分钟。
6. 加入 450 μ l SOC 培养基, 在 37°C下振荡培养 1 小时。
7. 将 50 μ l 培养基原液和 SOC 培养基中的 10 倍稀释溶液涂在含有卡那霉素的 LB 板中, 在 37°C 下过夜培养。

E) 预期结果

使用 (FLuc) FLuc Control Fragment 时, 涂有 50 μ l 培养基原液的平板一般会产生 100 个以上菌落。液体培养基培养菌落, 并使用标准提取方法 (如 NucleoSpin Gibraltar (Code No. 740588.10)) 制备质粒。确认获得质粒的序列。所用的 (LTV) Linearized Template Vector 的序列、以及对 (FLuc) FLuc Control Fragment 进行 In-Fusion 克隆时使用的序列信息参照产品页面。

- 根据所使用的大肠杆菌或培养方法如果不同, Poly(A)序列可能会缩短。建议对产生的菌落衍生质粒进行准确测序, 再制备多个大肠杆菌克隆的甘油管冻存。

Poly (A)序列部分可以使用以下引物进行确认。

Poly(A) Forward 引物: 5' -CCTCGGTGGCCTAGCTTCTT-3'

Poly(A) Reverse 引物: 5' -CAGGGCTTCCCAACCTTACC-3'

● 线性化模板质粒的制备: (2) Takara IVTpro T7 mRNA Synthesis Kit

※以下方案中使用 Takara IVTpro T7 mRNA Synthesis Kit (Code No. 6144)。

A. 线性化模板质粒的制备

a) 限制性内切酶的处理

合成 RNA 中使用的 DNA 模板序列所需最终浓度为 0.5~1.0 μ g/ μ l。考虑限制性内切酶处理后乙醇沉淀或柱纯化引起的回收率损失, 请参照以下实施例确定要进行限制性内切酶处理的质粒质量。

【例】

<每个反应>

模板质粒	50 μg
10X M Buffer	20 μl
Nuclease-Free Water	X μl
<i>Hind</i> III (15 U/μl)	10 μl
Total	200 μl

使用 *Hind* III (Code No. 1060A/B), 在 37°C 条件下进行 3 小时限制性内切酶处理。

- 如果限制性内切酶处理不彻底, 存在未切割的环状模板质粒, 则会合成大于目的大小的 RNA。取一部分已酶切处理过的 DNA 进行琼脂糖凝胶电泳, 以确认环状质粒被完全切断。

b) 乙醇沉淀

1. 在限制性内切酶处理后的溶液中添加 1/10 量的 3M 乙酸钠 (pH5.2) 及 2 倍量的乙醇。
 2. 充分混合, 在 -20°C 冷却至少 15 分钟。
 3. 在离心机中以最大速度离心 15 分钟以沉淀 DNA。
 4. 小心去除上清液, 加入 1 ml 70%乙醇, 在相同条件下再次离心。
 5. 再次小心去除上清液, 将沉淀干燥。
 6. 然后用 H_2O Nuclease-Free Water 或 TE buffer (含 0.1 mM EDTA) 溶解 DNA, 并测量 DNA 浓度。如有必要, 将溶液浓度调整为 0.5~1.0 μg/μl。使用之前放在 -20°C 条件下冷冻保存。
- 如果发现使用以上制备方法得到的线性化模板质粒合成的 mRNA 出现片段化, 怀疑可能有 RNase 污染。为了防止 RNA 分解, 将限制性内切酶处理后质粒进行苯酚: 氯仿提取, 然后通过乙醇沉淀进行纯化。

B. PCR 模板的制备

将 PCR 产物作为模板时, 将 T7 promoter 至 Poly (A) 的序列进行 PCR 扩增后, 请采用与上述相同的标准纯化方法进行制备。

● IVT 反应

1. 试剂的准备。
 - 10X Enzyme Mix 以外的所有必要组分应在室温下融化, 轻轻混合并离心后再使用。
 - 轻轻旋转 10X Enzyme Mix, 使用之前都存放于冰上 (不能涡旋)。
2. 在室温下加入下列各组分以制备反应溶液。

※请务必按照下列顺序添加各组分。

【使用了 CleanCap Reagent AG 或 CleanCap Reagent AG (3' OMe) 的 mRNA 合成反应】

<每个反应>

H_2O	Nuclease-Free Water	X μl
TE	10X Transcription Buffer* ¹	2 μl
ATP	10X ATP* ²	2 μl
CTP	10X CTP* ²	2 μl
GTP	10X GTP* ²	2 μl
UTP	10X UTP* ²	2 μl
	CleanCap Reagent AG* ³	1.6 μl
	DNA 模板* ⁴	1 μg
EM	10X Enzyme Mix	2 μl
Total* ⁵		20 μl

* 1: TB I0X Transcription Buffer 中含有亚精胺。亚精胺可与核酸形成复合物，在某些情况下会沉淀为不溶性物质，因此请务必按照上述顺序添加组分。

* 2: **各 NTP 浓度为 100mM。**使用修饰 NTP 时，请将相应的 NTP 进行等量替换。

* 3: 使用 CleanCap Reagent AG[或 CleanCap Reagent AG (3' OMe)]时，请按照与 NTP 为 4/5 摩尔比（最终浓度 8 mM）进行使用（参照图 4 A/B）。

* 4: 请使用带有 AGG 转录起始序列的模板。最佳模板量因所用模板的大小和类型而异，但通常应在 0.5~2 μg 的范围内使用（参照图 5）。对于 CT Positive Control Template (FLuc)，请使用 2 μl (1 μg)。

* 5: 可根据所需量增大反应体系（参照图 6 A/B）。

3. 充分混合后，在 37°C 保温 2 小时。

- 请根据目标长度和所需的 RNA 产量调整反应时间。（参照图 7 A/B）。
- 反应结束后，可能会产生白色沉淀。此为由反应释放的焦磷酸盐和反应溶液中的镁产生的焦磷酸镁。不会影响后续操作，请继续进行下一步实验“DNase I 的处理”。

● DNase I 的处理

IVT 反应-3. 的反应后，加入 4 μl 的 DNase I 轻轻混合后，再次在 37°C 下保温 15 分钟。

● LiCl 沉淀纯化

LiCl 沉淀法可以有效去除未渗入的 NTP 和蛋白质。但是，RNA 链长低于 300 个碱基，或者 RNA 浓度低于 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 时，则无法有效回收 RNA。此时，请尝试用标准苯酚：氯仿提取后的乙醇沉淀纯化、离心柱纯化（NucleoSpin RNA Clean-up (Code No. 740948.10/.50/.250)）。通过这些方法纯化的 RNA 可用于转染、电穿孔或显微注射等实验（参照图 8 A/B）。

1. 在 DNase I 处理后的约 24 μl IVT 反应液中加入 30 μl H_2O Nuclease-Free Water 和 30 μl LiCl Lithium Chloride Precipitation Solution 使反应停止。

- 使用 Lithium Chloride Precipitation Solution 前请在室温下将其融解。融解后，如果充分混合后仍可见沉淀，可 37°C 保温溶解。如果仍有沉淀物，请直接使用，对性能没有影响。

2. 混匀后，在 -20°C 下保持冷却至少 30 分钟。

3. 使用冷却离心机的最大转速在 4°C 下离心 15 分钟以沉淀 RNA。

4. 小心去除上清液，并用 1 ml 70% 乙醇清洗沉淀。

5. 再次使用冷却离心机的最大转速在 4°C 下离心 15 分钟。

6. 再次小心去除上清液。

7. 室温干燥沉淀，并溶解在 100 μl H_2O Nuclease-Free Water 中。

- 请注意：过度干燥会使 RNA 在 H_2O Nuclease-Free Water 中难以重悬。
- 根据 RNA 产量，溶解可能需要一些时间。将其置于室温或 4°C，适当混匀并检测。

8. 溶解后用 NanoDrop 等测定 RNA 浓度。如果不立即使用 RNA 样品，请在 -20°C 以下条件冷冻保存。

- 如果未掺入的 NTP、Cap 类似物、或使用过的模板 DNA 残留在 RNA 溶液中，则会影响 OD 测量。请务必对按照上述方法进行纯化后的样品进行测量。
- 如有必要，使用变性琼脂糖/丙烯酰胺凝胶或 Bioanalyzer (Agilent) 来测定获得的 RNA 的长度和纯度。

● 实验例

【实验例 1-A】

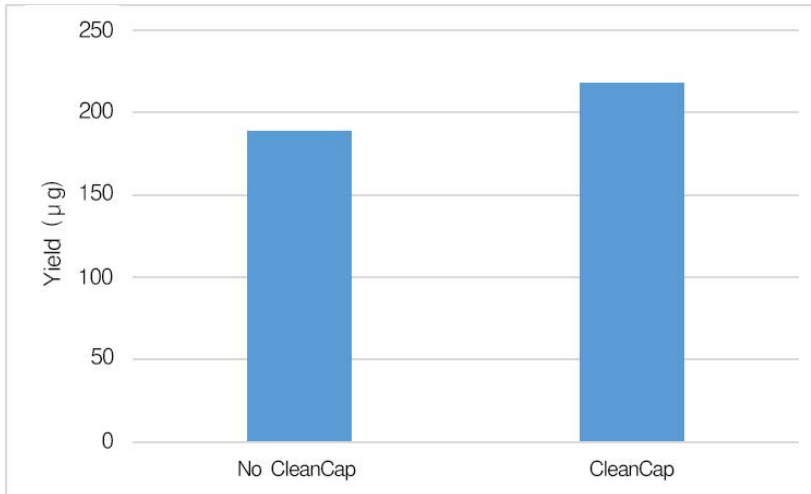


图 4 A. 使用 CleanCap Reagent AG(3' OMe)时的 RNA 产量

<方法>

分别在 IVT 反应液中加入和不加入 CleanCap Reagent AG (3'OMe)的情况下, 合成 FLuc mRNA。

<结果>

使用 CleanCap 对合成的 RNA 产量没有影响。

【实验例 1-B】

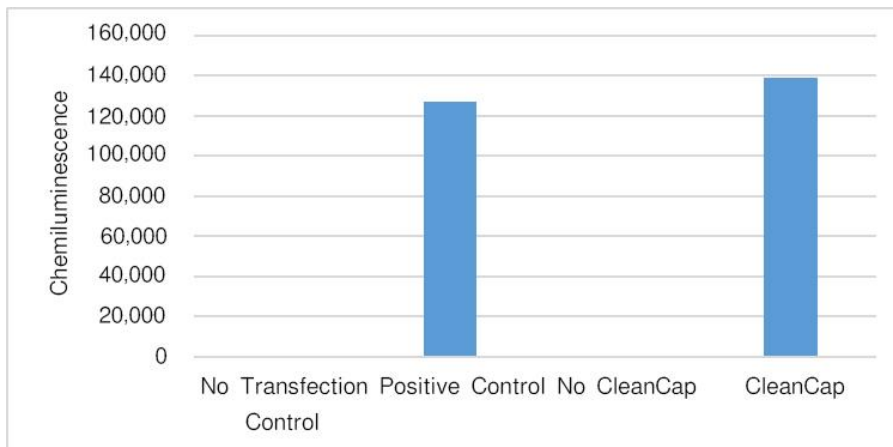


图 4B. 使用 CleanCap Reagent AG (3' OMe)合成的 FLuc mRNA 在 HEK293T 细胞中的表达

<方法>

使用 *Trans* IT-mRNA Transfection Kit (Code No. MIR2225/MIR2250/MIR2255/MIR2256) 将实验例 1-A 中获得的 0.5 µg RNA 转染到 HEK293T 细胞中。

<结果>

24 小时后, 收集细胞并测定 FLuc 的活性, 结果表明, 含有 CleanCap 的 IVT 反应液合成的 FLuc mRNA 与市面上销售的 FLuc mRNA positive control 具有相同的活性。另一方面, 在未加入 CleanCap 的 IVT 反应液中合成的 FLuc mRNA 没有观察到活性。这表明 Cap 结构对于 mRNA 有效翻译成蛋白质是必不可缺的。

【实验例 2】

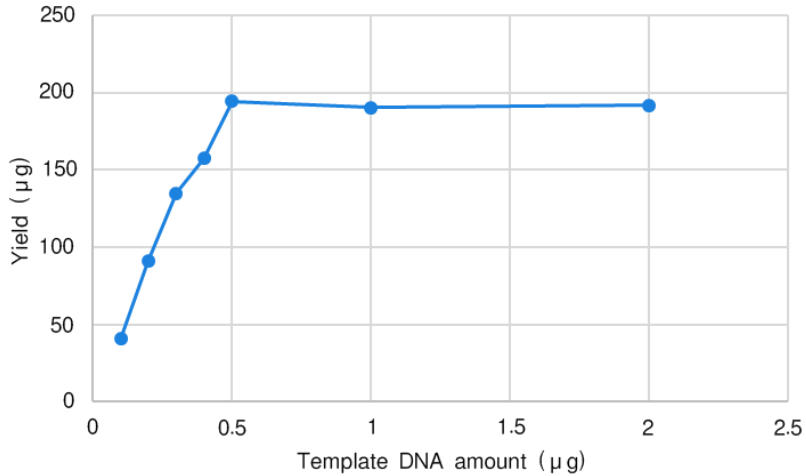


图 5. 模板 DNA 和 RNA 产量的关系

<方法>

使用不同量的 Positive Control Template(FLuc)作为模板，加入 CleanCap Reagent AG (3'OMe) 和 N1-甲基假尿苷进行不同反应时间的 IVT 反应。(20 µl 反应体系)。

<结果>

RNA 产量在模板 DNA 0.5 µg 时达到峰值，而高于该模板加量 (0.5~2 µg) 时，RNA 产量变化很小。

【实验例 3-A】

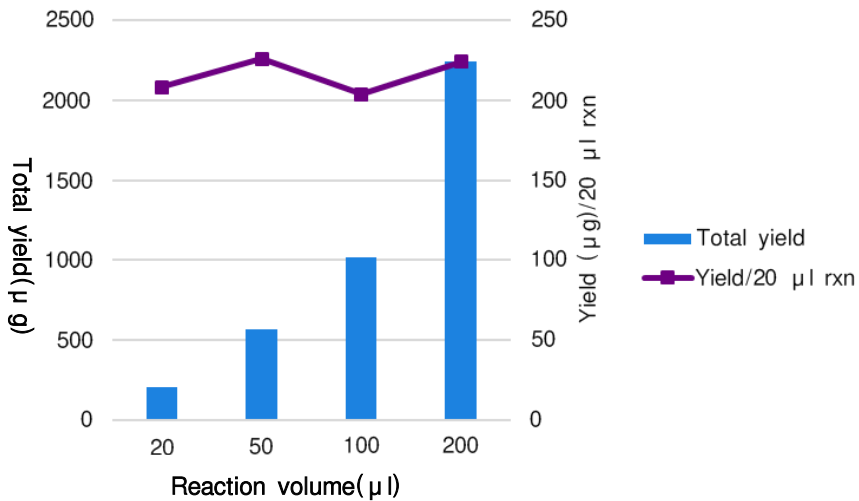


图 6 A. IVT 反应溶液规模与 RNA 产量的关系

<方法>

以 Positive Control Template (FLuc) 为模板，加入 CleanCap Reagent AG (3'OMe) 进行 IVT 放大实验。除反应液体积外，均按本说明书所述内容进行。

<结果>

RNA 产量与反应液体积成正比，并且按比例放大反应溶液体积不会影响产量。

【实验例 3-B】

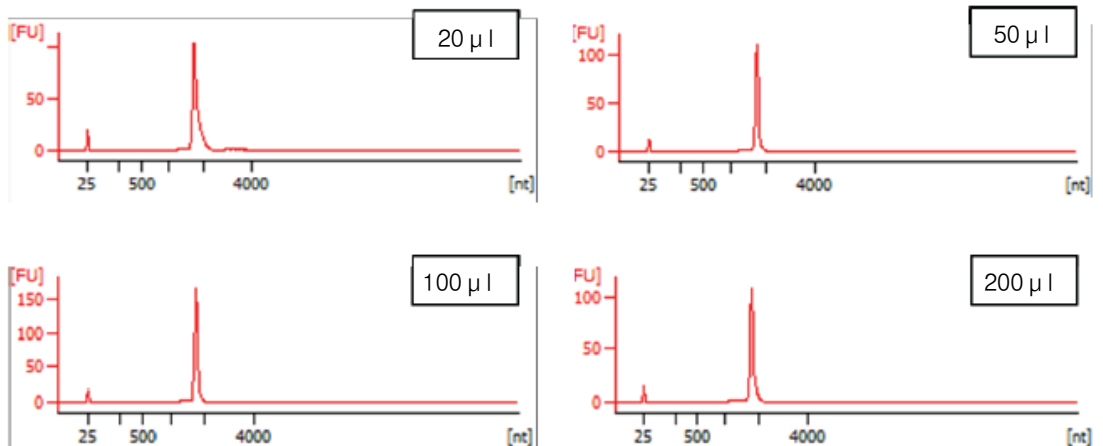


图 6B. RNA 产物的 Bioanalyzer 分析

<方法>

使用 Bioanalyzer 分析实验例 3-A 中获得的 1 ng RNA 产物。

<结果>

IVT 反应体积的放大不会影响 RNA 产物的质量。

【实验例 4-A】

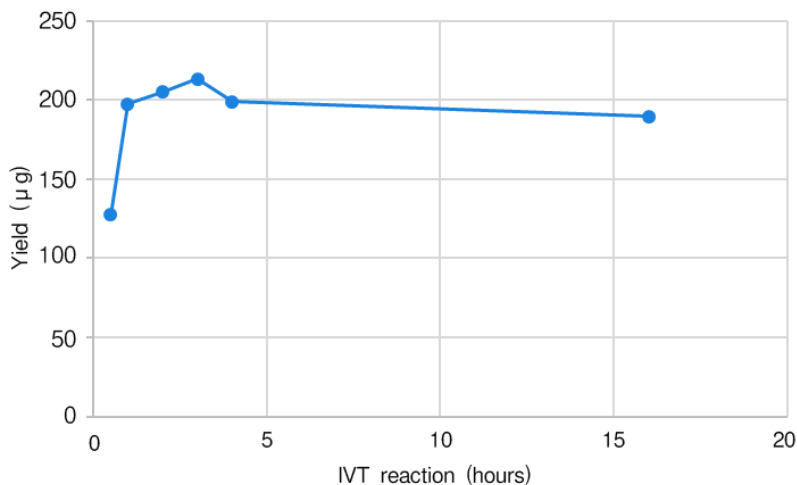


图 7A. IVT 反应时间与 RNA 产量的关系

<方法>

使用 Positive Control Template(FLuc)作为模板，加入 CleanCap Reagent AG (3'OMe) 和 N1-甲基假尿苷进行不同反应时间的 IVT 反应。

<结果>

当合成的 mRNA 长度为大约 1.9 kb 时，RNA 产量在约 1 小时内达到峰值，之后（1~16 小时）观察到的变化很小。

【实验例 4-B】

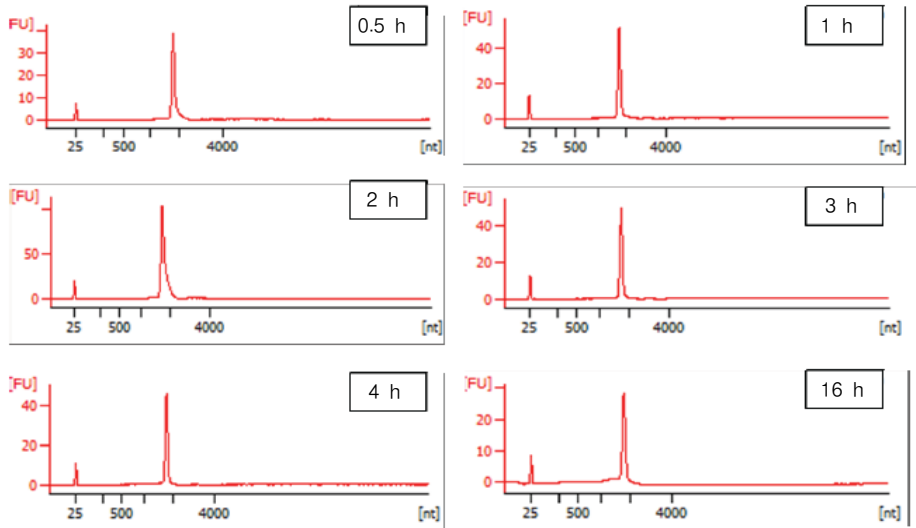


图 7 B. 使用 Bioanalyzer 分析 RNA 产物

<方法>

使用 Bioanalyzer 确认实验例 4-A 中获得的 1 ng RNA 产物。

<结果>

反应时间不会影响 RNA 产物的质量。

【实验例 5-A】

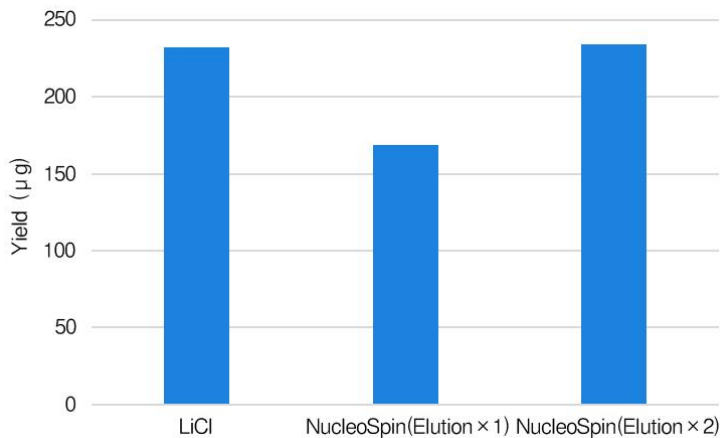


图 8 A. 通过 LiCl 沉淀法和离心柱法进行 RNA 纯化的比较

<方法>

在含有 CleanCap Reagent AG (3' OMe)和 N1-甲基假尿苷的 IVT 反应液中合成 FLuc mRNA，并通过 LiCl 沉淀法或 NucleoSpin 等离心柱法进行简易纯化。

<结果>

使用离心柱法进行一次洗脱获得的 RNA 量低于 LiCl 沉淀法，但两次洗脱 (50 µl × 2) 的 RNA 量与 LiCl 沉淀法相当。强烈建议使用离心柱法时进行两次洗脱。

【实验例 5-B】

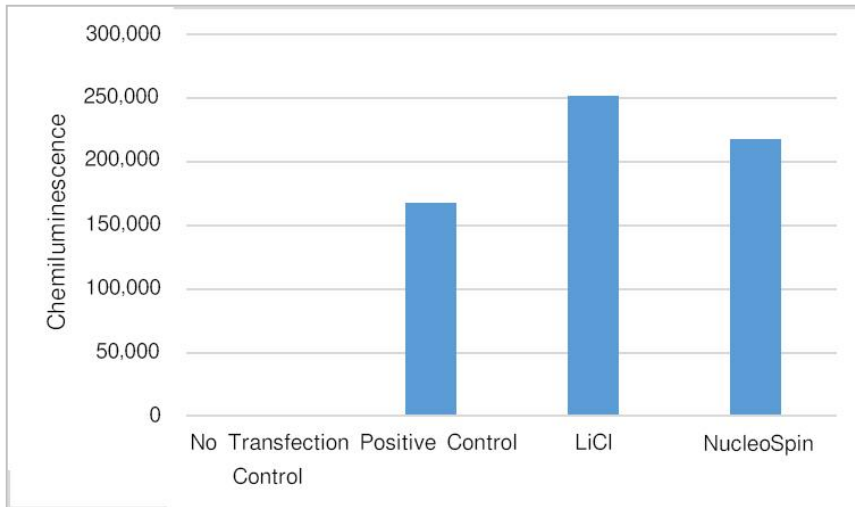


图 8 B. 简易纯化法获得的 FLuc mRNA 在 HEK293T 细胞中的表达

<方法>

使用 *TransIT*-mRNA Transfection Kit 将实验例 5-A 中获得的 0.5 μ g RNA 转染到 HEK293T 细胞中。

<结果>


收集 24 小时后的细胞并测定 FLuc 的活性，确认到两者的活性均与市售的 FLuc mRNA Positive Control 相同甚至更高。

● Troubleshooting

【未获得目标模板质粒时】

- In-Fusion Snap Assembly Master Mix (Code No. 638943/638944/638947-638949) 用户手册中记载的 Troubleshooting Guide。
请参照如下本公司网站。<https://www.takarabiomed.com.cn/>
- In-Fusion Cloning tips and FAQs
请参照如下本公司 US 网站。<https://www.takarabio.com>

【其他情况】

问题点	原因	解决方案
RNA 产量低	RNase 污染模板 DNA	用苯酚：氯仿提取限制性内切酶处理后的模板 DNA，然后通过乙醇沉淀进行纯化。
	模板 DNA 量不合适	请对制备的模板 DNA 进行琼脂糖凝胶电泳，确认 DNA 量。如果出现与 OD 测量值不一致，请尝试再次纯化模板 DNA。
	反应时间不充分	请延长 IVT 的反应时间。
	RNA 链长低于 300 bp，或 RNA 浓度低于 0.1 μg/μl	请尝试用标准苯酚：氯仿提取后的乙醇沉淀纯化、离心柱法纯化，而不是 LiCl 沉淀法。
	RNA 沉淀损失	请尽量使用吸头小的微量移液管小心地去除上清液。
	RNA 溶解/洗脱不充分	根据 RNA 产量的不同，溶解有可能需要较长时间。请在室温或 4℃ 下放置，充分混匀并在 RNA 完全溶解后再测定 RNA 量。如果仍然未溶解，请添加溶解液。此外，在用离心柱法纯化洗脱时，有时会出现 1 次洗脱不充分的情况。强烈推荐 2 次洗脱（例如 50 μl × 2）。
	试剂仪器或操作方面的 RNase 污染	反应所使用的试管、吸头等应为专用，反应时佩戴一次性手套，防止 RNase 混入。
	试剂变质	请将使用的酶放置于冰上。请勿过度混匀或冻融。如果使用  Positive Control Template (Fluc) 无法获得超过 100 μg 的 RNA，请重新购买本产品。
RNA 比目标大小更大	模板质粒线性化不足	再次用限制性内切酶处理模板质粒，并在使用前通过琼脂糖凝胶电泳确认质粒完全线性化。
	RNA 变性不充分	请使用变性琼脂糖凝胶或丙烯酰胺凝胶进行电泳。
RNA 比目标大小更小	包含了与 T7 RNA Polymerase 的转录终止信号相似的序列	如果可能，请更改序列。改变编码序列时，请在保持氨基酸序列不变的情况下进行密码子转换。
发现低于目标大小的片段化 RNA	RNase 污染	反应所使用的试管、吸头等应为专用，反应时佩戴一次性手套，防止 RNase 混入。

● 参考文献

- 1) Karikó, K. *et al.* Incorporation of pseudouridine into mRNA yields superior nonimmunogenic vector with increased translational capacity and biological stability. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther.* (2008) **16**: 1833 - 1840.
- 2) Vaidyanathan, S. *et al.* Uridine Depletion and Chemical Modification Increase Cas9 mRNA Activity and Reduce Immunogenicity without HPLC Purification. *Mol Ther Nucleic Acids.* (2018) **12**: 530-542.
- 3) Xia, X. Detailed Dissection and Critical Evaluation of the Pfizer/BioNTech and Moderna mRNA Vaccines. *Vaccines (Basel).* (2021) **9**: 734.
- 4) Schenborn, E. T. and Mierendorf, R. C. A novel transcription property of SP6 and T7 RNA polymerases: dependence on template structure. *Nucleic Acids Res.* (1985) **13**: 6223 - 6236.

● 关联产品

Cloning Kit for mRNA Template (Code No. 6143)
Takara IVTpro™ T7 mRNA Synthesis Kit (Code No. 6144)
PrimeSTAR® Max DNA Polymerase (Code No. R045A/B)
TaKaRa Ex Premier™ DNA Polymerase (Code No. RR370S/A/B, RR371S/A/B)
E. coli HST08 Premium Competent Cells (Code No. 9128)
Stellar™ Competent Cells (Code No. 636763)
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Code No. 740609.10/.50/.250)
NucleoSpin Plasmid (Code No. 740588.10/.50/.250)
Hind III (Code No. 1060A/B)
NucleoSpin RNA Clean-up (Code No. 740948.10/.50/.250)
*Trans*IT-mRNA Transfection Kit (Code No. MIR2225/MIR2250/MIR2255/MIR2256)
In-Fusion Snap Assembly Master Mix (Code No. 638943/638944/638947 – 638949)

In-Fusion is a registered trademark of Takara Bio USA, Inc.
PrimeSTAR is a registered trademark of Takara Bio Inc.
IVTpro and Ex Premier are trademarks of Takara Bio Inc.
Stellar 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>

v202212Da