

# mRNA 体外转录 (IVT) 操作详细说明

作为生物大分子，mRNA 可通过体外转录 (IVT, in vitro transcription) 的方法大规模合成。体外合成 RNA (IVT) 主要是以 DNA 为模板通过体外转录得到，常用的是以线性化质粒 DNA 或 PCR 扩增产物为模板利用 RNA 聚合酶在体外转录合成。主要过程是利用含有 T7 启动子序列的 DNA 为模板在含有 RNA 聚合酶的条件下，以 NTP 为底物合成与模板 DNA 中一条链互补的 mRNA，简单快速获得大量的 mRNA 分子，并为其添加 5' 帽子结构，以加强 mRNA 的稳定性，模拟体内 mRNA 合成的过程。

## 1. 模板制备

以质粒模板为例：

- (1) 对模板质粒进行琼脂糖鉴定，根据质粒抗性，配置所需抗性液体 LB 培养基；
- (2) 将质粒转化到感受态细胞，涂板，37°C 培养过夜；
- (3) 挑取 5-10 个单克隆，摇菌 6-8h，进行质粒提取，用琼脂糖电泳检测质粒大小，选择超螺旋状态优势的菌株，过夜摇菌；
- (4) 抽提质粒；
- (5) 琼脂糖凝胶电泳，检测质粒大小和超螺旋状态，选择大小正确且超螺旋比例高的质粒进行后续线性化步骤。

## 2. 模板质粒线性化

以 Bsa I 为例：

1. 实验前将各组分取出解冻，Bsa I 酶置于冰上解冻，其余试剂室温解冻，加入各试剂前震荡混匀瞬离后置于冰上备用（Bsa I 酶不能震荡直接瞬离后置于冰上备用）

加样顺序	组分名称	体积	终浓度
1	RNase free Water	X $\mu$ L	
2	10 $\times$ Buffer	5 $\mu$ L	1 $\times$
3	Plasmid DNA	20 $\mu$ g	0.4 $\mu$ g/ $\mu$ L
4	Bsa I (20U/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L	0.4U/ $\mu$ L
Total reaction volume 50 $\mu$ L			

2. 先加入计算好量的 RNase free H<sub>2</sub>O，之后依次加入剩余试剂，用移液器或振荡混匀，短暂离心 3-5S，将样品收集至管底。37 $^{\circ}$ C 孵育 30min，未酶切完全的情况下可适当增加酶量及酶切时间。

**注：**

- 不同品牌限制性内切酶或不同内切酶所需酶量以及反应时间可能不同，可适当调整酶量及反应时间；
- 为保证下游实验质量，建议确保质粒模板完全线性化，且无 RNase 污染。
- 选择超螺旋比例高的线性化完全质粒用于后续实验，具体可以参考琼脂糖凝胶电泳结果。如下图 1，酶切前的原始质粒超螺旋比例高，酶切后，条带单一，且明亮。如图 2，存在多条带，超螺旋比例不高，IVT 会影响 mRNA 纯度。

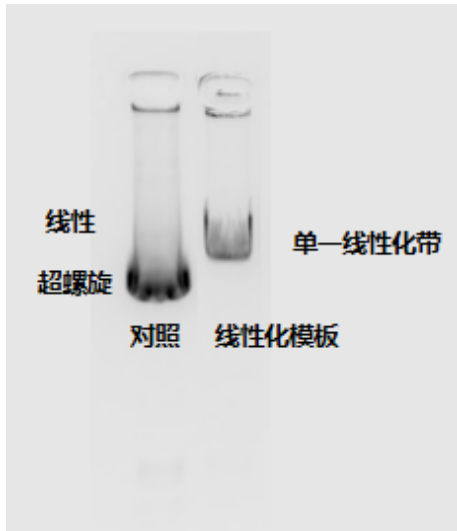


图 1.超螺旋比例较高质粒酶切结果

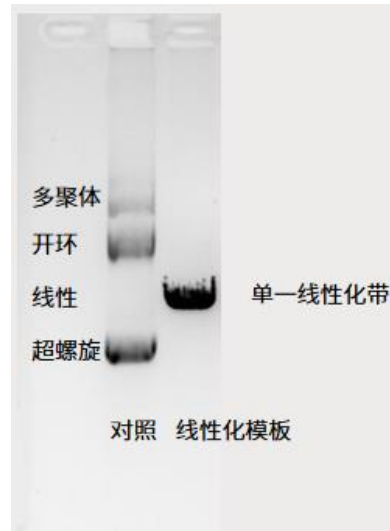


图 2.超螺旋比例较低质粒酶切结果

### 3. 质粒回收

对线性化完成质粒进行回收，可选择 PCR clean up 试剂盒或沉淀等方法回收；

**以酚氯仿回收为例：**

- (1) 向 1.5mL EP 管中加入等体积 (500 $\mu$ L) 酚氯仿异戊醇 (酚：氯仿：异戊醇=25：24：1) ；
- (2) EP 管上下颠倒混匀，13500rpm 离心 1min；
- (3) 使用移液器将上层液体转移至新的 1.5mL EP 管；
- (4) 加入等体积氯仿，混匀，12000rpm 离心 1min；
- (5) 使用移液器将上层液体转移至新的 1.5mL EP 管；
- (6) 加入 2 倍体积无水乙醇和 0.1 倍体积的 NaAc 溶液 (浓度 3M) ， -20 $^{\circ}$ C冻存 30min；
- (7) 冻存结束后，放入离心机，12000rpm 离心 15min，去上清；
- (8) 沉淀中加入 600 $\mu$ L 70%乙醇，12000rpm 离心 5min，去上清；
- (9) 重复 8；
- (10) EP 管室温放置，待乙醇完全挥发后，向沉淀中加入 100 $\mu$ L RNase free Water，溶

解。

#### 4. 模板制备

准备好线性化的质粒模板，并根据需求计算产量及用量，以下为根据经验值推荐的模板及体系用量，仅供参考，由于不同质粒模板的产量会有较大差异，具体产量以实验结果为准。

模板量	mRNA 产量	反应体系体系用量	单位体积产量
1 $\mu$ g	120-220 $\mu$ g	20 $\mu$ L	6-11mg/mL

注：

- 不同模板产量之间可能存在序列、长度、纯度或者结构方面的差异，对于某些模板可通过适当提高模板量来提高产量。
- 整个实验流程对 RNase 高度敏感，反应体系须严格注意不要混入 RNase，实验器材如枪头、EP 管严格使用 RNase-free 用品；实验操作需要注意环境的清洁度，实验人员需要佩戴好口罩与手套，避免人源污染造成反应过程产物降解的风险。
- 实验前后都需要进行实验台面的消杀，保持实验环境的清洁度。

## 酶法（两步法）加帽

### 1. 体外转录 (IVT)

实验前将各组分取出解冻，Enzyme Mix 置于冰上解冻，其余试剂室温解冻。加入各试剂前震荡混匀瞬离后置于冰上备用（Enzyme Mix 酶不能震荡直接瞬离后置于冰上备用）。

1.1 反应体系，可根据实验需要放大：

加样顺序	组分名称	体积	终浓度
1	RNase free Water	X $\mu$ L	
2	10 $\times$ Transcription Buffer A*	2 $\mu$ L	1 $\times$
3	腺嘌呤核苷三磷酸 (ATP) (100mM)	2 $\mu$ L	10mM
4	胞嘧啶核苷三磷酸 (CTP) (100mM)	2 $\mu$ L	10mM
5	鸟嘌呤核苷三磷酸 (GTP) (100mM)	2 $\mu$ L	10mM
6	尿嘧啶核苷三磷酸 (UTP) /Modified UTP (100mM)	2 $\mu$ L	10mM
7	Enzyme Mix 1.0	2 $\mu$ L	/
8	DNA 模板	1 $\mu$ g	500ng/ $\mu$ L
Total reaction volume 20 $\mu$ L			

Modified UTP 如：pUTP，N1-Me-pUTP，5-OMe-UTP 等。

计算好 RNase free H<sub>2</sub>O 的量，依次加入各个组分，用移液器或振荡混匀，短暂离心 3-5S，将样品收集至管底。

1.2 37° 孵育 2 小时，建议在 PCR 仪上操作，如果无 PCR 仪器，使用温度准确的培养箱或金属浴也可。

**注：**

- 在使用高产 T7 体外转录试剂盒 HBP001505 或 HBP001506 进行 IVT 时，IVT 反应推荐首选使用 buffer10 × Transcription Buffer A，若转录产量较低，可以改用 10 × Transcription Buffer B，具体效果以小试结果为准；
- 由于 buffer 中含有亚精胺成分，请勿将模板直接加入未稀释的 buffer 体系中，否则可能导致沉淀；
- 加样时，如将模板先加入体系中，可能导致加样过程中提前启动转录，可能造成最终产物产量与纯度的下降，因此建议模板最后加入。
- 先冰上解冻，看 buffer 有无沉淀，如有先振荡混匀，如沉淀未消失，37°水浴加热，如仍未能解决，建议使用新 buffer；
- 室温快速操作，反应结束后可放置在冰浴或 2-8°C 中暂存，长时间存放请置于 -80°C；
- 所有试剂解冻后振荡 3 秒，使其充分混匀后短暂离心 3s 收集于管底；如有气泡，用手轻弹使气泡消失。
- 加入试剂后请勿反复吹打；

## 2. 模板消化 (以 20 $\mu$ L 反应为例)

在 1.2 反应后，加入 DNase I 2 $\mu$ L (5U/ $\mu$ L)，振荡混合 3s，37°C 孵育 30min，以消化转录的 DNA 模板。

### 注：

移液器枪头不要伸到管底，接触液面即可，防止倒吸。

### 3. 纯化

将 2 得到的 IVT 反应溶液进行纯化，去除 NTPs、酶、蛋白及盐离子等杂质后进行加帽；纯化方式可自行选择柱纯化、磁珠纯化、酚/氯仿纯化、氯化锂沉淀纯化或其他纯化方式。

#### 以氯化锂沉淀纯化为例（20 $\mu$ L 体系反应为例）：

- (1) 将 2 得到的 IVT 反应溶液和 5M 氯化锂溶液按 1: 1 的体积比混合；
- (2) -20 $^{\circ}$ C 静置至少 30min；
- (3) 12000rpm 离心 15min（体积小于 200 $\mu$ L 样品可选择转速可达 7000rpm 的桌面离心机），观察到底部出现白色沉淀，去上清；
- (4) 加入 100-150 $\mu$ L 倍体积冰上预冷或者 4 $^{\circ}$ C 预冷的 70%乙醇，将沉淀吹打悬浮，注意不要打散，12000rpm 离心 5min，去上清；
- (5) 重复步骤（4），再进行瞬时离心，用移液器吸除管底剩余溶液；
- (6) 在不干扰沉淀物的情况下，尽可能多地去除残留的洗涤液，开盖 37 $^{\circ}$ C 晾干 5min，待沉淀干燥后加入 50-200 $\mu$ L RNase Free Water 或其他缓冲液溶解 RNA 沉淀；溶解液加入后，建议在冰上放置 15-30min 后，用移液器进行轻柔吹打混匀至沉淀完全溶解然后进行定量及其他检测。

#### 注：

- 不要让管底沉淀过度干燥，过度干燥则不容易溶解，通常干燥时间为 3 到 5min（该时间以 20 $\mu$ L 体系为例，若体系放大则需根据沉淀大小，进行干燥时间的加长调整）。
- 如果反应体系较大，冰上溶解 30min，沉淀仍未完全溶解，可在 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜，然后再进行吹打混匀使 IVT 产物完全溶解。

#### 4. 加帽反应

本实验步骤适用于 20 $\mu$ L 反应体系中 10 $\mu$ g RNA 的加帽反应, 可根据实验需要放大。  
实验前将各组分取出解冻, 牛痘病毒加帽酶和 mRNA 2'-O-甲基转移酶置于冰上解冻, 其它试剂室温解冻。加入各试剂前震荡混匀瞬离后置于冰上备用 (牛痘病毒加帽酶和 mRNA 2'-O-甲基转移酶不能震荡直接瞬离后置于冰上备用)

##### 4.1 反应体系:

加样顺序	组分名称	体积	终浓度
1	mRNA	10 $\mu$ g	
2	RNase free Water	X $\mu$ L	
3	10 $\times$ Capping Reaction buffer	2 $\mu$ L	1 $\times$
4	S-腺苷甲硫氨酸 (4mM)	1 $\mu$ L	0.2mM
5	鸟嘌呤核苷三磷酸 (GTP) (100mM)	0.2 $\mu$ L	10mM
6	牛痘病毒加帽酶 (10U/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L	0.5U/ $\mu$ L
7	mRNA 2'-O-甲基转移酶 (50U/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L	2.5U/ $\mu$ L
8	RNase 抑制剂 (40U/ $\mu$ L)	0.5 $\mu$ L	1U/ $\mu$ L
Total reaction volume 20 $\mu$ L			

计算好 RNase free H<sub>2</sub>O 的量, 依次加入各个组分, 用移液器或振荡混匀, 短暂离心 3-5S, 将样品收集至管底。

4.2 用移液器混匀, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h, RNA 加帽完成。

##### 注:

- 加样时请勿反复吹打, 直接加在液面即可, 所有试剂加完后振荡 3 秒混匀, 离心 3s 收集



于管底，如有气泡，用手轻弹使气泡消失。

## 5. 二次纯化

同步骤 3。

## 6. RNA 定量，详细步骤请参考所用仪器说明书

- (1) 紫外吸收法：蛋白及游离核苷酸等杂质会影响定量的准确性，采用此方法前请先进行 RNA 纯化。
- (2) 染料法：用 RiboGreen 染料进行 RNA 定量，游离核苷酸不会影响定量，可以对纯化或者未纯化的反应产物中的 RNA 进行准确定量。  
按染料说明书进行 RNA 定量。
- (3) 毛细管电泳法：可以检测 mRNA 纯度以及完整性，具体参考仪器，如 Agilent5200, Qsep100 等。

## 共转录法加帽

### 1. 体外转录 (IVT)

实验前将各组分取出解冻，Enzyme Mix 酶置于冰上解冻，其它试剂室温解冻。加入各试剂前震荡混匀瞬离后置于冰上备用（Enzyme Mix 酶不能震荡直接瞬离后置于冰上备用）。

1.1 反应体系，可根据实验需要放大：

加样顺序	组分名称	体积	终浓度
1	RNase free Water	X $\mu$ L	
2	10 $\times$ Co-Capping IVT Buffer*	2 $\mu$ L	1 $\times$
3	腺嘌呤核苷三磷酸 (ATP) (100mM)	2 $\mu$ L	10mM
4	胞嘧啶核苷三磷酸 (CTP) (100mM)	2 $\mu$ L	10mM
5	鸟嘌呤核苷三磷酸 (GTP) (100mM)	2 $\mu$ L	10mM
6	尿嘧啶核苷三磷酸 (UTP) /Modified UTP (100mM)	2 $\mu$ L	10mM
7	Cap analog (100mM)	1.6 $\mu$ L	8mM
8	Enzyme Mix*	2 $\mu$ L	
9	DNA 模板	1 $\mu$ g	500 ng/ $\mu$ L
Total reaction volume 20 $\mu$ L			

Modified UTP 如：pUTP, N1-Me-pUTP, 5-OMe-UTP 等。

计算好 RNase free H<sub>2</sub>O 的量，依次加入各个组分，用移液器或振荡混匀，短暂离心 3-5S，将样品收集至管底。

1.2 用移液器混匀，37 $^{\circ}$ C 孵育 2h，建议在 PCR 仪上操作，如果无 PCR 仪器，使用温度

准确的培养箱或金属浴也可。

**注:**

- 若使用高产 T7 体外转录试剂盒 HBP001505 或 HBP001506 产品搭配帽子类似物进行共转录使用共转录共转录体系在使用 10 × Transcription Buffer A 时，若转录产量较低，可以改用 10 × Transcription Buffer B。共转录帽类似物可选用 cap1(3' OH AG) (HBP002805) ， cap1(3'OMe AG) (HBP003700) 等，底物中的 UTP 可以用等量的修饰核苷进行替换。
- 使用共转录加帽 T7 体外转录试剂盒 HBP001507、HBP001508、HBP001509、HBP001510 产品时请参照产品说明书使用 Enzyme Mix 和 buffer，具体搭配为：
- **HBP001507** 使用 pUTP 作为修饰碱基，CAP GAG (3'OMe) 作为帽子类似物，使用 Enzyme Mix 2.1 及 10×Co-Capping IVT Buffer 1.1，若转录产量较低，10×Co-Capping IVT Buffer 1.2；
- **HBP001508** 使用 pUTP 作为修饰碱基，CAP GAG 作为帽子类似物，使用 Enzyme Mix 2.2 及 10×Co-Capping IVT Buffer 2.1，若转录产量较低，10×Co-Capping IVT Buffer 2.2；
- **HBP001509** 使用 N1-Me-pUTP 作为修饰碱基，CAP GAG (3'OMe) 作为帽子类似物，使用 Enzyme Mix 2.3 及 10×Co-Capping IVT Buffer 3.1，若转录产量较低，10×Co-Capping IVT Buffer 3.2；
- **HBP0015010** 使用 N1-Me-pUTP 作为修饰碱基，CAP GAG (3'OMe) 作为帽子类似物，使用 Enzyme Mix 2.4 及 10×Co-Capping IVT Buffer 4.1，若转录产量较低，10×Co-Capping IVT Buffer 4.2；
- 由于 buffer 中含有亚精胺成分，请勿将模板直接加入未稀释的 buffer 体系中，否则可能

导致沉淀；

- 加样时，如将模板先加入体系中，可能导致加样过程中提前启动转录，造成最终加帽率的下降，因此建议模板最后加入。
- 先冰上解冻，看 buffer 有无沉淀，如有先振荡混匀，如沉淀未消失，37°水浴加热，如仍未能解决，建议使用新 buffer；
- 室温快速操作,反应结束后可放置在冰浴或 2-8°C 中暂存，长时间存放请置于-80°C；
- 所有试剂解冻后振荡 3 秒，使其充分混匀后，短暂离心 3s 收集于管底；
- 加入试剂后请勿反复吹打；

## 2. 模板消化 (以 20 $\mu$ L 体系为例)

在 1.2 反应后，加入 DNase I 2 $\mu$ L (5U/ $\mu$ L)，短暂混合，37°C 孵育 30min，以消化转录的 DNA 模板。

**注：**

移液器枪头不要伸到管底，接触液面即可，防止倒吸。

## 3. 纯化

将 2 得到的 IVT 反应溶液进行纯化，去除 NTPs、酶、蛋白及盐离子等杂质；纯化方式可自行选择柱纯化、磁珠纯化、酚/氯仿纯化、氯化锂沉淀纯化或其他纯化方式。

**以氯化锂沉淀纯化为例 (20 $\mu$ L 体系反应为例)：**

- (1) 将 2 得到的 IVT 反应溶液和 5M 氯化锂溶液按 1: 1 的体积比混合；
- (2) -20°C 静置至少 30min；

- (3) 12000rpm 离心 15min (体积小于 200 $\mu$ L 样品可选择转速可达 7000rpm 的桌面离心机) , 观察到底部出现白色沉淀, 去上清;
- (4) 加入 100-150 $\mu$ L 预冷的 70%乙醇, 将沉淀吹打悬浮, 注意不要打散, 12000rpm 离心 5min, 去上清;
- (5) 重复上一步;
- (7) 在不干扰沉淀物的情况下, 尽可能多地去除残留的洗涤液 , 开盖 37 $^{\circ}$ C 晾干 5min, 待沉淀干燥后加入 50-200 $\mu$ L RNase Free Water 或其他缓冲液溶解 RNA 沉淀; 溶解液加入后, 建议在冰上放置 15-30min 后, 用移液器进行轻柔吹打混匀至沉淀完全溶解然后进行定量及其他检测。

**注:**

- 不要让管底沉淀过度干燥, 过度干燥则不容易溶解, 通常干燥时间为 3 到 5min (该时间以 20 $\mu$ L 体系为例, 若体系放大则需根据沉淀大小, 进行干燥时间的加长调整)。
- 如果反应体系较大, 冰上溶解 30min, 沉淀仍未完全溶解, 可在 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 然后再进行吹打混匀使 IVT 产物完全溶解。

#### **4. RNA 定量, 详细步骤请参考所用仪器说明书**

- (1) 紫外吸收法: 蛋白及游离核苷酸等杂质会影响定量的准确性, 采用此方法前请先进行 RNA 纯化。
- (2) 染料法: 用 RiboGreen 染料进行 RNA 定量, 游离核苷酸不会影响定量, 可以对纯化或者未纯化的反应产物中的 RNA 进行准确定量。

按染料说明书进行 RNA 定量。

- (3) 毛细管电泳法：可以检测 mRNA 纯度以及完整性，具体参考仪器，如 Agilent5200, Qsep100 等。