

T7 RNA Transcription Enzyme Mix

产品简介

本产品是由大肠杆菌重组表达来源的噬菌体 T7 RNA 聚合酶组成的混合物，以含有 T7 启动子序列（5' -TAATACGACT CACTATA-3'）的双链 DNA 为模板，以 NTPs 为底物，合成与启动子下游的反向单链 DNA 互补的 RNA。双链线性平末端或 5' 突出末端 DNA 均可作为 T7 RNA 聚合酶的底物模板，因此线性质粒、PCR 产物均可用作体外合成 RNA 的模板。转录时可在底物中加入修饰的核苷酸，制备生物素或染料标记的 RNA。

产品信息

货号	10631ES20 / 10631ES60 / 10631ES70 / 10631ES80
规格	20 μ L / 100 μ L / 200 μ L / 1mL

组分信息

组分名称	10631ES20	10631ES60	10631ES70	10631ES80
T7 RNA Polymerase Mix	20 μ L	100 μ L	200 μ L	1 mL

储存条件

-25~-15°C保存，有效期 1 年。

使用说明

1. DNA 模板制备

带有双链 T7 启动子的线性化质粒或 PCR 扩增产物都可以作为体外转录模板，模板可以用 TE 缓冲液或 RNase free H₂O 溶解。

T7 启动子序列：TAATACGACTCACTATA(G/A)*GG （注：(G/A)*为 RNA 转录的第一个碱基）

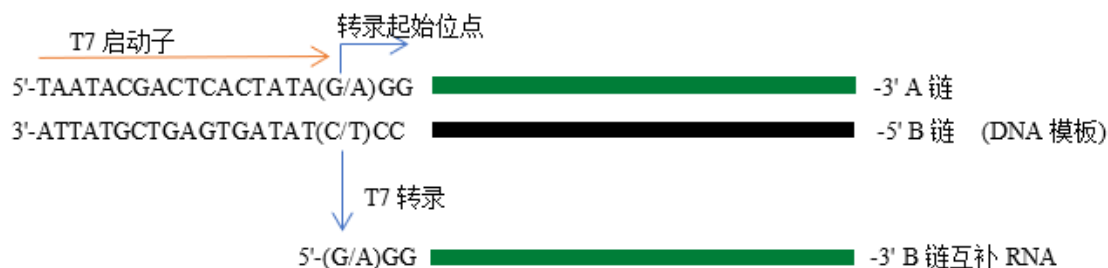


图 1: RNA 体外转录过程

1) 质粒模板

将目的 DNA 插入含有 T7 启动子的质粒载体中，然后用限制酶进行处理，待完全线性化后进行纯化。

注：

- 环状质粒由于没有有效的终止，会转录出不同长度的 RNA 产物，为了得到特定长度的 RNA，质粒必须完全线性化。
- 质粒线性化所选限制酶需要在启动子区域右侧、插入 DNA 片段的下游，且在插入 DNA 片段中无识别位点。选择的限制酶要能形成 5' 突出或者平滑末端。
- 为了避免蛋白及盐离子等对体系的影响，质粒线性化后建议纯化后再作为模板进行体外转录。

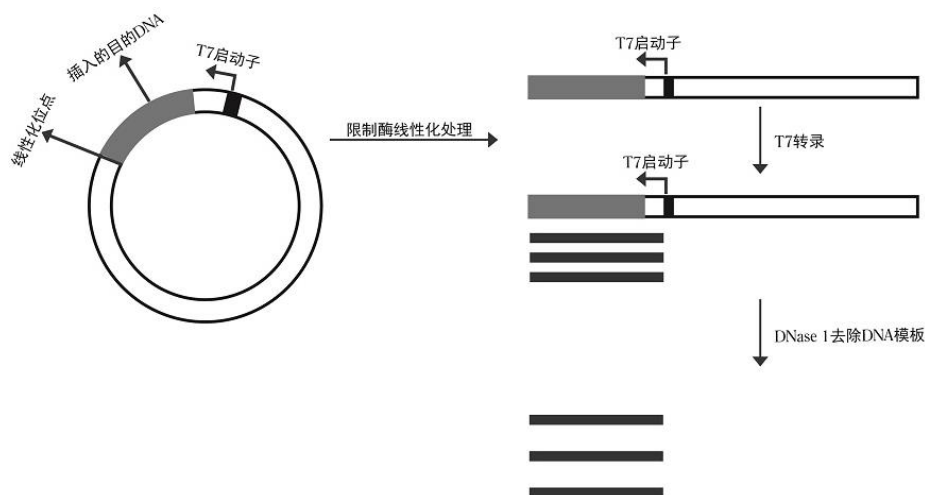


图 2：线性化质粒为模板体外转录过程

2) PCR 产物模板

带 T7 启动子的 PCR 产物可以作为体外转录模板。首先将 T7 启动子序列(TAATACGA CTCACTATA(G/A)GG)加在有义链的上游引物的 5' 端，然后在高保真酶的作用下扩增含 T7 启动子的 DNA 模板，随后进行转录。PCR 产物可以不经纯化直接作为模板，但纯化后会得到更高的 RNA 产出。

注：

- PCR 产物作为模板，必须电泳确认产物的特异性及浓度，建议 20 μ L 反应体系投入 2-5 μ L PCR 产物。
- 为了得到更多高品质的 RNA，推荐 PCR 产物胶回收之后再作为模板进行体外转录。

2. RNA 体外转录

1) 试剂解冻

将 T7 RNA Polymerase Mix 短暂离心，置于冰上。将除 T7 RNA Polymerase Mix 外的其他所需组分解冻并振荡混匀，短暂离心收集于管底，10 $\times$ Transcription Buffer 置于室温，其他组分置于冰上，备用。

注：本产品不包含 10 $\times$ Transcription Buffer（货号：10670）和核糖核苷酸（货号：10652-10655）。

2) 室温装配转录反应

表 1 非修饰 RNA 配制体系

组分	体积 (μ L)	终浓度
RNase free H ₂ O	Up to 20	-
10 $\times$ Transcription Buffer	2	1 $\times$
CTP / GTP/ ATP/ UTP (100 mM each)	2 each	10 mM each
模板 DNA	1 μ g	-
T7 RNA Polymerase Mix	2	-

表 2 修饰 RNA 配制体系

组分	体积 (μ L)	终浓度
RNase free H ₂ O	Up to 20	-
10 $\times$ Transcription Buffer	2	1 $\times$
修饰型 CTP / GTP/ ATP/ UTP (100 mM each)	2 each	10 mM each

模板 DNA	1 µg	-
T7 RNA Polymerase Mix	2	-

修饰型 NTP 如：pUTP, N¹-Me-pUTP, 5-Me-CTP, 5-OMe-UTP 等

表 3 共转录 RNA 配制体系

组分	体积 (µL)	终浓度
RNase free H ₂ O	Up to 20	-
10×Transcription Buffer	2	1×
CTP / GTP/ ATP/ UTP (100 mM each)	2 each	10 mM each
Cap1 Analog (100mM)	2	10 mM
模板 DNA	1 µg	-
T7 RNA Polymerase Mix	2	-

注：

- 反应于室温配置。由于 10×Transcription Buffer 中含有亚精胺，低温下亚精胺浓度过高会引起 DNA 模板沉淀。
- 短转录本 (<100nt)，模板可使用 2ug，转录时间增至 4-8 个小时。
- 长转录本 (>1000nt)，建议使用质粒线性化模板进行转录。
- 建议在 PCR 仪中进行反应，热盖打开，防止长时间导致反应液蒸发。
- 反应产物可能有白色沉淀。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。如想去除，添加 EDTA 即可消失。添加 EDTA 如果影响后续实验，也可以离心回收上清。
- 使用试剂、容器等无 RNase 污染。

3) 37°C 孵育 2-3 个小时

将上述反应液混合均匀，短暂离心至管底，37°C 孵育 2-3 个小时。若转录本长度小于 100nt，增加反应时间至 4-8 个小时。

4) DNase I 处理 (可选)

反应完成后，每管加入 1 µL DNase I (RNase free) (货号：10611)，37°C 孵育 15min 以去除模板 DNA。

3. 产物纯化

转录后的 RNA 可以选用 RNA Cleaner 磁珠进行纯化 (货号：12602)，也可以采用酚/氯仿纯化法，氯化锂沉淀法或柱纯化等，以去除蛋白、游离的核苷酸。纯化后的 RNA 经电泳检测后可进行下游实验或存储于 -80°C。

1) RNA Cleaner 磁珠纯化法

提前将 RNA clean beads 从 4 °C 取出，平衡至室温 (约 30 min)，并用 RNase free H₂O 将转录产物稀释至 50µL。

- 颠倒或涡旋振荡使磁珠充分混匀，吸取 2×磁珠 (100µL) 加入 RNA 样品中 (50µL)，用移液器吹打 6 次充分混匀。室温孵育 5 min，使 RNA 结合到磁珠上。
- 将样品置于磁力架上 5 min，待溶液澄清后，小心移除上清。
- 保持样品置于磁力架上，加入 200µL 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育 30 s，小心移除上清。重复此操作一次。(注：漂洗时使用的 80%乙醇需要使用 RNase free H₂O 新鲜配制，以防止引入 RNase 酶导致 RNA 降解。)
- 保持样品始终处于磁力架上，开盖空气干燥磁珠 5 min。(注：磁珠开盖晾干时要避免过分干燥，如果磁珠出现龟裂，则提示磁珠过分干燥，此时 RNA 的洗脱效率会降低)。
- 将样品从磁力架上取出，加入 22µL RNase free H₂O，用移液器吹打 6 次以充分混匀，室温静置 5 min。

- f. 将样品置于磁力架 5 min，待溶液澄清后，小心转移上清 20μL 至一个新的 RNase free PCR 管中。（注：建议转移上清时留 2-3μL 液体，以免吸到磁珠影响后续实验。得到的 RNA 极不稳定，建议尽快进入下一步。若需保存，请置于 -80°C 保存。）

2) 酚/氯仿纯化法

- 向 20μL 反应混合物中，加入 115μL RNase free H₂O 和 15μL 3M 乙酸钠（pH5.2），混合均匀。
- 用等体积的酚/氯仿（1:1）抽提一次，再用等体积的氯仿抽提 2 次，收集上清，并转移至新的 RNase free EP 管中。
- 加入 2 倍体积的无水乙醇沉淀 RNA。混合均匀后置于 -20°C 至少 30min，以最大转速，4°C 离心 15min，收集沉淀。
- 加入 500μL 冰预冷的 70%乙醇洗涤 RNA 沉淀。
- 用 20μL RNase free H₂O 溶解 RNA 沉淀。纯化后的 RNA 溶液于 -80°C 保存。

3) 氯化锂沉淀法

采用氯化锂沉淀法，RNA 长度要大于 300nt，且浓度不能低于 100ng/μL。

- 向 20μL 反应混合物中，加入 30μL RNase free H₂O 和 30μL 7.5M 氯化锂。
- 混合均匀后，置于 -20°C 至少 30min，以最大转速，4°C 离心 15min，收集沉淀。
- 加入 500μL 冰预冷的 70%乙醇洗涤 RNA 沉淀。
- 用 20μL RNase free H₂O 溶解 RNA 沉淀。纯化后的 RNA 溶液于 -80°C 保存。

4) 柱纯化法

纯化前加入 80μL RNase free H₂O 将产物稀释至 100μL，再按柱纯化说明书进行纯化。

4. RNA 定量

1) 紫外吸收法

游离核苷酸会影响定量的准确性，采用此方法前请先进行 RNA 纯化。然后通过测定产物的 A₂₆₀ 读数来确定 RNA 的产量。对于单链 RNA，1 A₂₆₀ 相当于 40μg/mL，所以 RNA 的产量可以如下计算： $A_{260} \times \text{稀释倍数} \times 40 = \mu\text{g/mL RNA}$

2) 染料法

用 RiboGreen 染料进行 RNA 定量，游离核苷酸不会影响定量，可以对纯化或未纯化的反应产物中的 RNA 进行准确定量。

5. RNA 大小及质量检测

1) 琼脂糖电泳法

为了确定 RNA 的大小，完整度以及质量，需要进行琼脂糖凝胶电泳或聚丙烯酰胺凝胶电泳进行检测。

2) Agilent Bioanalyzer 检测法

可以用来评估 RNA 完整度及质量，它仅需要少量的 RNA 进行分析，高品质的 RNA 在电图上应呈现明显且锐利的峰。

注意事项

- 本产品仅作科研用途。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并佩戴一次性手套操作。
- 反应体系中须严格注意不要混入 RNase。
- 实验器材（如：枪头、产品管等）注意严格使用 RNase Free 用品。