

T7 RNA Transcription Enzyme Mix(low dsRNA)

产品简介

本产品是大肠杆菌重组表达来源的噬菌体 T7 RNA 聚合酶，是对野生型 T7 进行了改造优化，突变得到的可以大幅度降低 dsRNA 含量的 T7 RNA 聚合酶组成的混合物，以含有 T7 启动子序列的双链 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	10632ES20 / 10632ES60 / 10632ES70 / 10632ES80
规格	20 μ L / 100 μ L / 200 μ L / 1 mL

组分信息

组分名称	10632ES20	10632ES60	10632ES70	10632ES80
T7 RNA Polymerase Mix(low dsRNA)	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）

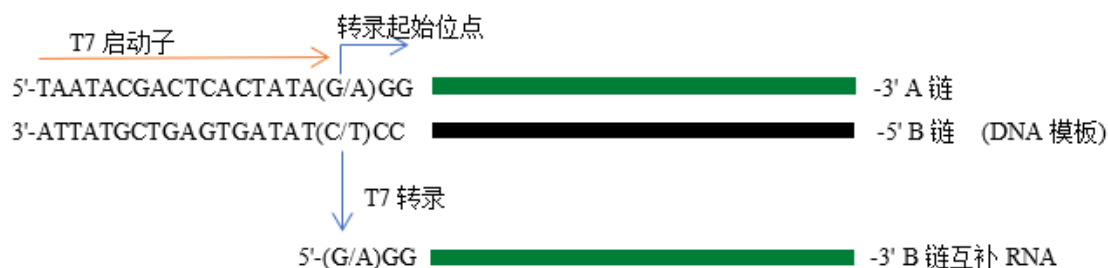


图 1: RNA 体外转录过程

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。

c. 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。

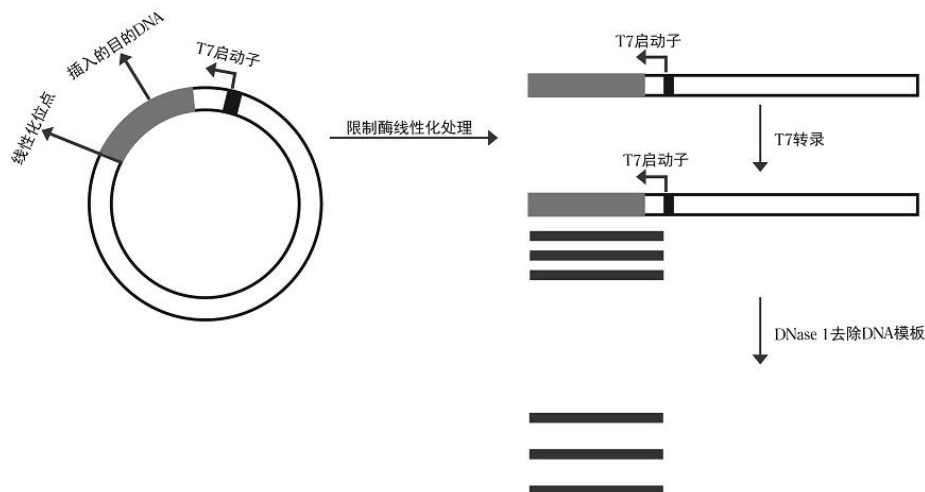


图 2：线性化质粒为模板体外转录过程

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(low dsRNA)短暂离心，置于冰上。将除 T7 RNA Polymerase Mix(low dsRNA)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(low dsRNA)	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 μ g	-
T7 RNA Polymerase Mix(low dsRNA)	2	-

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

表 3 共转录 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
Cap1 Analog (100mM)	2	10 mM
模板 DNA	1 μ g	-
T7 RNA Polymerase Mix(low dsRNA)	2	-

注：

- 反应于室温配置。由于 10 $\times$ 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 2 μ g，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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 μ L DNase I (RNase free) (货号：10611)，37 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C。

1) RNA Cleaner 磁珠纯化法

提前将 RNA clean beads 从 4 $^{\circ}$ C 取出，平衡至室温 (约 30 min)，并用 RNase free H₂O 将转录产物稀释至 50 μ L。

- 颠倒或涡旋振荡使磁珠充分混匀，吸取 2 $\times$ 磁珠 (100 μ L) 加入 RNA 样品中 (50 μ L)，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 200 μ L 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 22 μ L 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。若要保存，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。