

天
净
沙
系
列

CAT#:91106-50
低温运输, -20℃保存

TIANDZ

T7 体外转录试剂盒

T7 in vitro Transcription Kit

使用手册 V1.6

北京天恩泽基因科技有限公司

北京市海淀区上地信息路 26 号北京市留学人员海淀创业园中关村创业大厦 506

网址: www.tiandz.com; 电话: 400-6765278; 电邮: order@tiandz.com

<p>产品及特点</p>	<p>本试剂盒是基于 T7 RNA 聚合酶的 RNA 体外转录试剂盒，它利用含有 T7 启动子的模版 DNA，以 NTP 为底物，从 T7 启动子下游开始合成与模版 DNA 中一条链互补的 RNA，简单快速获得大量的 RNA 分子。本产品具有下列特点：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 即开即用，用户只需提供含 T7 启动子的 DNA 模板即可以进行体外转录实验，不需要单独准备每一个成份。 2. 单溶液预配液，减少加样次数，避免了操作误差，增加了可重复性。 3. 模版 DNA 可以是线性化的质粒 DNA，也可以是 PCR 扩增产物。 4. 可以合成的 RNA 的最佳长度在 20nt 到 2000 nt 之间。 5. 产品配方经过精心优化，每 ug DNA 模版可以合成 2-6 ug RNA。 6. 得到的 RNA 可以用于 RNA 结构研究、核酶生物化学、体外翻译、RNA-蛋白质相互作用、反义技术、SELEX 技术和 RNA 干扰 (RNAi) 等实验。 7. 本试剂盒足够 50 次 20μL 体系的体外转录实验，并且只能用于科研。 																	
<p>规格及成分</p>	<table border="1" data-bbox="475 943 1358 1261"> <thead> <tr> <th>成份</th> <th>编号</th> <th>十孔盒包装</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>T7 转录预配液，2\times</td> <td>91106a</td> <td>0.5 mL (绿色盖)</td> </tr> <tr> <td>T7 RNA 聚合酶-RI 混合液</td> <td>91106c</td> <td>50 μL (黄色盖)</td> </tr> <tr> <td>RNase-free 水</td> <td>80403</td> <td>1 mL (亮黄盖)</td> </tr> <tr> <td>使用手册</td> <td>91106sc</td> <td>1 份</td> </tr> </tbody> </table>			成份	编号	十孔盒包装	T7 转录预配液，2 \times	91106a	0.5 mL (绿色盖)	T7 RNA 聚合酶-RI 混合液	91106c	50 μ L (黄色盖)	RNase-free 水	80403	1 mL (亮黄盖)	使用手册	91106sc	1 份
成份	编号	十孔盒包装																
T7 转录预配液，2 \times	91106a	0.5 mL (绿色盖)																
T7 RNA 聚合酶-RI 混合液	91106c	50 μ L (黄色盖)																
RNase-free 水	80403	1 mL (亮黄盖)																
使用手册	91106sc	1 份																
<p>运输及保存</p>	<p>低温运输，-20$^{\circ}$C 保存、有效期一年。</p>																	
<p>自备试剂</p>	<p>Tris 饱和酚、氯仿、RNase-free 75%乙醇(均可从本公司另购)</p>																	
<p>相关资料</p>	<p>一、制备 DNA 模板 (本试剂盒不含所需试剂，此处信息仅供参考)</p> <p>PCR 片段和质粒 DNA 都可以用作体外转录的模板，但是必须注意以下几点。</p> <p>一是必须使用线性化的 DNA。如果是质粒 DNA，则必须先用适当的限制性内切酶切成线状。</p> <p>二是需要转录的 DNA 序列的上游必须有 T7 启动子。如果模板是 PCR 产物，则可以在设计引物时将 T7 启动子序列 (5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG 3') 加上。如果是将 DNA 片段克隆到载体上，则需要选择有 T7 启动子的载体，并且克隆位点必须位于 T7 启动子下游。</p> <p>三是需要转录的 DNA 序列的下游端最好不要是 3' 突出。如果是 3' 突出 (比如选择了 Pst I 来线性化质粒)，则最好用 T4 DNA 聚合酶修平。</p>																	

四是必须保证 DNA 模板中没有 RNase。由于提取质粒 DNA 的过程中一般要使用大量的 RNase A，因此质粒 DNA 一般都有严重的 RNase A 污染，所以在用作模板前，最好采取胶回收得方法回收质粒 DNA。并且加入少量总 RNA 一起保温，然后电泳检测 RNA 是否被降解，以此来判断纯化的 DNA 模板是否有残留 RNase A。如果有 RNase 污染，则必须反复酚-氯仿抽提去除残留的 RNase，然后再乙醇沉淀质粒 DNA。

二、体外转录反应

1. 如果有 N 个样品，强烈建议做一个阴性对照，故共设置 N+1 个反应，这样一起并排电泳时容易判断哪个条带是模板 DNA，哪个条带是扩增得到的 RNA。在 N+1 个 RNase-free 的塑料离心管中，在室温下（不是在 4℃ 下）按次序加入下列成分（T7 转录预配液容易产生结晶沉淀，一定要握在手中直到结晶彻底溶解并摇匀后方可使用）：

成分	N 个样品管	阴性对照管
DNA 模板	50 ng 左右的 PCR 片段 或 1 ug 左右的线状质粒	不加
T7 转录预配液，2×	各 10 μL	10 μL
T7 RNA 聚合酶-RI 混合液	各 1 μL	1 μL
补 RNase-free 水到	20μL	20μL

注：此为 20μL 反应体系的用量，对其他反应体系，各成分的用量可以按比例增减。本产品的 T7 转录预配液已经含有 NTP。如果需要标记 RNA 探针或制备带帽 RNA，则需要订购 NTP 分开的试剂盒。

2. 37℃ 保温 1-2 小时。注意：延长保温时间并不能大幅提高产量。
3. 加入 2μL 自备的 500mM 的 EDTA 溶液灭活 T7 RNA 聚合酶。
4. 取 1-3 μL 电泳，此时最好用 DNA 模板做电泳对照。电泳时比阴性对照多出的条带就是扩增得到的 RNA（由于合成的 RNA 长度不均匀，即使长度均匀，但由于自生形成发夹结构，泳动速度也不一致，所以电泳所得 RNA 条带一般都不是清晰，而是比较弥散的电泳条带。但由于 RNA 是单链，分子量比同样长度的 DNA 小一倍，因此 RNA 一般比其双链 DNA 模板电泳速度更快。
5. 定量，可以用自备的单链 RNA 定量试剂盒检测浓度。不推荐使用电泳定量。使用本试剂盒时 1μg DNA 模板一般可以合成 2-6μg 的 RNA。
6. 得到的 RNA 可以放 -80℃ 保存。如需去除 DNA 模板，请按下面步骤操作。

	<p>三、去除 DNA 模板 (所需试剂需要另购)</p> <p>7. 在 20μL 体积的体外转录体系中加入 2μL 的 10\timesDNase Buffer 和 1 μL 自备的 RNase-free DNase (3-5 U/μL)。</p> <p>8. 37$^{\circ}$C 保温 30 分钟。</p> <p>9. 补 RNase-free 水到 100 μL。增加体积可以减少样品的丢失。</p> <p>10. 用自备的等体积 (100 μL) 的 Tris 饱和酚-氯仿, 震荡混匀后 14000g 离心 3 分钟, 将上清转移到新的离心管中。此步去除 DNase 和 RNA 聚合酶。</p> <p>11. 加自备的 200 μL 无水乙醇和 10μL 3M 的乙酸钠溶液 (pH5.2), 振荡后 14000 rpm 离心 20 分钟, RNA 形成沉淀, 弃上清。</p> <p>12. 在沉淀中加入 1 mL 75%乙醇, 震荡 10 秒后 14000g 离心 5 分钟, 弃上清。</p> <p>13. 短暂离心数秒, 用枪头吸弃上清。不要丢失沉淀。</p> <p>14. 晾干, 所得沉淀即体外转录所得的 RNA。</p>
<p>疑难解答</p>	<p>1、没有 RNA 产物。最常见原因是模板有 RNase 污染, 可用纯化好的 RNA 跟模板 DNA 一起保温再电泳, 再检测其是否有污染。</p> <p>2、RNA 产量低。最常见的原因是 DNA 模板。在转录序列的第一个和第二个碱基最好都是 G, 在前 14 个碱基内避免有 U 存在。</p> <p>3、RNA 长度比预期的短。可能是模板序列中有 T7 RNA 聚合酶的终止序列。可以改用 SP6 体外转录试剂盒 (启动子也必须改成 SP6 启动子)。</p> <p>4、RNA 长度比预计的长。T7 RNA 聚合酶跟 Taq DNA 聚合酶一样, 有不依赖于模板的加尾功能, 最多有一半的 RNA 可以带一个或两个碱基的尾巴。如果 RNA 长度比预计的长很多, 使用的模板又是质粒 DNA, 则可能是质粒线性化不彻底。</p> <p>5、5' 单磷酸还是三磷酸。如果使用 GTP, 则得到的 RNA 是三磷酸, 体外转录时如果保温时间太长 (如 12 小时), 则有 50% 的三磷酸会变成单磷酸。如果在转录体系中加入 GMP, 则 T7 RNA 聚合酶将优先使用 GMP, 所得 RNA 产物中 5' 端是单磷酸的比例将大大增加。</p> <p>6、用体外转录试剂盒如何得到带帽 RNA? 需加入带帽 NTP 类似物即可。</p>
<p>关联产品</p>	<p>SP6 体外转录试剂盒 (CAT#:91106-50)</p>