



T7 RNA polymerase(50 U/μl)

T7 RNA 聚合酶 (50 U/μl)

版本号: V230201

货号: R101

保存: -20°C

运输: 低温

货号	规格
R101-01	5,000 U
R101-05	25,000 U

【产品概述】

本产品是大肠杆菌重组表达来源的噬菌体 T7 RNA 聚合酶, 是一种高度特异性识别 T7 噬菌体启动子序列的 DNA 依赖的 5'→3' RNA 聚合酶。该酶以含有 T7 启动子序列 (5'-TAATACGACTCACTATAG-3') 的单链或双链 DNA 为模板, NTP 为底物, 合成与启动子下游的单链 DNA 或双链 DNA 模板链互补的 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。

转录合成的 RNA 可应用于多方面的下游实验, 如体外翻译、RNA 疫苗、RNA 结构和功能研究、核酶生物化学、RNA 酶蛋白实验和基于探针的杂交印迹等。

【产品应用】

1. 利用帽子类似物合成加帽的 mRNA。
2. 合成单链 RNA, 包括 mRNA、lncRNA、siRNA、gRNA 等各类 RNA 的前体, 及标记或未标记 RNA 探针。
3. 合成 RT-qPCR 的 RNA 标准模板。

【产品组分】

组分货号	组分名称	R101-01	R101-05
ZR101-101	T7 RNA Polymerase(50U/μl)	100 μl	100 μl×5
ZR101-102	10×Reaction Buffer	400 μl	400 μl×5

【保存条件】

-20°C 保存, 保质期 12 个月。避免反复冻融。

【酶活定义】

37°C, pH 8.0 条件下, 1 h 内使 1 nmol [³H] ATP 掺入酸不溶性沉淀物所需要的酶量定义为 1 个活性单位。

【实验步骤】

一、模板制备

带有双链 T7 启动子的线性化质粒、PCR 产物或者合成的 DNA 片段都可以作为 T7 RNA Polymerase 体外转录模板, 模板可用 TE 缓冲液或 Nuclease-free Water 溶解。

1. 质粒模板 (建议每个反应加 1 μg 线性化质粒作为模板)

带 T7 启动子的质粒可以作为转录模板, 质粒的线性化和纯度会影响转录的产量及 RNA 的完整性。

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, 线性化的质粒请确保双链为平末端或编码链 5'端为突出结构。质粒 DNA 抽提过程中引入的 RNase A 残留会显著影响转录 RNA 的质量, 建议使用 OD260/280 为 1.8-2.0 的高纯度 RNase-free 质粒。

2. PCR 产物模板 (建议每个反应加 0.1-1 μg 作为模板)

带 T7 启动子的 PCR 产物可以作为体外转录模板。PCR 扩增模板时将 T7 启动子加在正义链的上游引物的 5'端。PCR 产物经纯化后作为模板。

3. 合成的 DNA 模板 (建议每个反应加 0.1-0.5 μg 作为模板)

合成的带有 T7 启动子的 DNA 片段也可以作为体外转录的模板。



二、体外转录反应

1. 将各组分融化后分别混匀，短暂离心收集于管底，10×Reaction Buffer 和 DEPC 水建议平衡到室温后在使用，其余组分于冰上储存备用。
2. 在室温下，配制反应体系

注：配置反应体系时，建议最后加酶和模板。因为 10×Reaction Buffer 含有亚精胺，亚精胺浓度过高会引起 DNA 模板沉淀，此外 10×Reaction Buffer 高盐环境会导致聚合酶失活。

组分	体积	终浓度
10×Reaction Buffer ^a	2 μl	1×
CTP / GTP/ ATP/ UTP (100 mM each) ^b	Each 0.4 μl	Each 2 mM
T7 RNA Polymerase (50U/μl)	1-2 μl	2.5-5 U/μl
RNase inhibitor (40U/μl)(可选) ^c	1 μl	1-2 U/μl
Template DNA ^d	0.1-1 μg	5-50 ng/μl
Nuclease-free Water (DEPC-treated) ^a	Up to 20 μl	-

^a 10×Reaction Buffer 和 DEPC 水建议放置到室温后在使用。在室温下配制反应体系，以防低温引起亚精胺沉淀高浓度 DNA 模板。

^b CTP / GTP/ ATP/ UTP 的终浓度可在 Each 2-7.5 mM 之间进行优化。

^c 反应体系中可添加 RNase Inhibitor (GenStar Cat#A218)，防止 RNase 污染。

^d 若转录长度 < 100 nt，模板可增加至 2 μg。

3. 用移液器轻轻混匀各组分，并短暂离心收集，37°C 孵育 1-2 h。
注：为避免蒸发对反应体系的影响，建议在 PCR 仪中进行反应。可根据产物片段大小适当的调整反应时间，如合成小于 0.3 kb 的 RNA，可将反应延长至 4 h 或更长时间，16 h 过夜反应不会影响产物的质量。
4. 可选：反应结束后，使用 2U DNase I (RNase-free, GenStar Cat#A216) 37°C 15 min 去除 DNA 模板。
5. 合成的 RNA 经电泳分析、纯化后，可用于下游实验。

【补充说明】

1. 实验过程中请注意避免 RNase 污染，使用无 RNase 管和移液枪；
2. 不同模板的产量会因模板的序列、结构、长度、纯度以及特定 RNA 聚合酶启动子的序列和长度而有所不同，同时一些污染物如核糖核酸酶、苯酚、微量金属、SDS 等也会影响转录产量。
3. 推荐的反应条件可适用于大多数模板的体外转录，但是对于某些模板，可以通过延长反应时间（4 h 或过夜反应），增加模板的用量来提高产率。
4. 如后续使用紫外吸收法进行 RNA 定量，请先进行 RNA 纯化，游离核苷酸会影响定量的准确性。如使用 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。

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。在所有情况下，本公司对此产品所承担的责任，仅限于此产品的价值本身。