

T7 耐热 RNA 聚合酶 2.0 说明书

本产品仅供体外研究使用，不得用于临床诊断

描述:

T7 耐热 RNA 聚合酶 2.0 是一种经基因工程改造的 DNA 依赖性 RNA 聚合酶，对 T7 噬菌体启动子 (TAATACGACT CACTATAG) 具有高度特异性，跟野生型噬菌体 T7 RNA 聚合酶相比，它可在更高的温度下进行体外转录。T7 耐热 RNA 聚合酶 2.0 可在 37-52°C 条件下进行高效的体外转录，最佳温度为 37°C，50°C 反应条件下，仍然保留 50% 以上的活性（野生型在此温度下无活性）。这种高温的反应特性有益于以下几个方面的实验：（1）提升了 GC 含量较高 RNA 的转录效率；（2）提升了长片段 RNA 的合成能力；（3）在使用帽类似物时，提高了共转录的加帽效率；（4）减少了 dsRNA 副产物的形成，降低了合成 RNA 的免疫原性。

组分

名称	5 KU	25 KU
T7 RNA Polymerase 2.0 (50 U/μl)	100 μl	500 μl
5X T7 Transcription Buffer	1 ml	1 mlX5

活性定义: 在标准反应体系下，50°C 1 小时内将 1 nmol 的 ATP 掺入酸不溶物所需要的酶量定义为一个活性单位。

1X T7 Transcription Buffer: 40 mM Tris (pH 7.8), 20 mM NaCl, 18mM MgCl₂, 2 mM Spermidine HCl, 10 mM DTT 酶储存液: 10 mM Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 1 mM DTT, 0.1mM EDTA, 50% Glycerol, 0.01% (w/v) Triton X-100, pH 7.5。

储存: 置于-20° C 可保存 2 年，避免反复冻融。

热失活: 75° C, 10min。

操作方法

1. 配制反应体系

<u>5XT7 Transcription buffer</u>	<u>4 μl</u>
<u>rNTP Mixture (25 mM each)</u>	<u>3.2 μl</u>
<u>Linearized template DNA</u>	<u>0.2~1 μg</u>
<u>RNase Inhibitor (40U/μl)</u>	<u>0.5 μl</u>
<u>T7 RNA Polymerase 2.0 (50 U/μl)</u>	<u>1-2 μl</u>
<u>Rnase Free H2O</u>	<u>up to 20 μl</u>

2. 50°C 孵育 1-3h。
3. 使用 RNaseFree DnaseI 去除 DNA 模板（可选）在体外转录反应结束后，向上述 20 μ l 反应液中加入 5 μ l 的 10 \times RD Buffer 和 2 μ l RNaseFree DnaseI(10U/ μ l)，并加入 23 μ l 的 Rnase Free H2O 至 50 μ l，37°C 孵育 15min。
4. 转录产物的纯化体外转录产物可选用 5minRNA 纯化试剂盒进行柱式纯化，以去除多余的盐、蛋白等杂质。也可以采用经典的 LiCl 沉淀法。

注意事项

1. 转录 DNA 模板的种类：推荐使用含 T7 启动子的线性化质粒和 PCR 产物作为模板。
2. 转录模板的纯度会显著影响体外转录反应。在质粒 DNA 抽提过程中残留的 RnaseA 会显著影响转录 RNA 的质量。通过酚-氯仿抽提的质粒 DNA 为最佳模板。
3. 该酶对高浓度 NaCl 或 KCl 不耐受，当其浓度高于 150mM 时，其活性受到显著抑制（ \sim 50%）。
4. 在 20 μ l 反应体系中加入 0.02U 热稳定无机焦磷酸酶可显著提高转录产量（提高 25 \sim 50%）。