

T7 RNA 聚合酶说明书

本产品仅供体外研究使用，不得用于临床诊断

描述:

T7 RNA Polymerase 对 T7 噬菌体启动子(TAATACGACT CACTATAG)具有高度的特异性，并可以其作为启动子，DNA 作为模板体外合成正义链或反义链 RNA。双链线性平末端或 5' 突出末端 DNA 均可作为 T7 RNAPolymerase 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。

正义或反义 RNA 链取决于模板 DNA 序列与 T7 启动子的位置，DNA 位于 T7 启动子的下游，T7 RNA 聚合酶会转录出正义 RNA，反之则为反义 RNA 链。该酶来自重组 E.coli BL21 菌株纯化而得，无 RNA 聚合酶、DNase 和 RNase 污染。

组分

名称	5 KU	25 KU
T7 RNA Polymerase (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，37°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), 10 mM NaCl, 6mM MgCl₂, 2 mM Spermidine HCl, 10 mM DTT

酶储存液: 10 mM Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 1 mM DTT, 0.1 mM 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: 70° 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>0.4 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 (50 U/μl)</u>	<u>0.5-1 μl</u>
<u>Rnase Free H2O</u>	<u>up to 20 μl</u>

2. 37°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 150 mM 时, 其活性受到显著抑制 (~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 25~50%)。