天净沙系列

CAT#:211214

低温运输，-20℃保存

T7 体外转录试剂盒

T7 in vitro Transcription Kit

使用手册 V1.01

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

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:

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 20 nt 到 2000 nt 之间。
5. 产品配方经过精心优化，每 μg DNA 模版可以合成 2-6 μg 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 20 μL 体系的体外转录实验。
8. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品使用五孔盒包装

成份	编号	规格	包装
T7 转录预配液，2×	211214a	0.5 mL	0.5 mL 绿盖管
T7 RNA 聚合酶-RI 混合液	211214b	50 μL	0.5 mL 红盖管
RNase-free 水	980403	1 mL	1.5 mL 黄盖管
使用手册	211214sc	1 份	无

运输及保存

低温运输，-20℃保存、有效期一年。

自备物品

Tris 饱和酚、氯仿、RNase-free 75%乙醇(均可从本公司另购)

相关资料

一、制备 DNA 模板（本试剂盒不含所需试剂，此处信息仅供参考）

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。

1. 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。
2. 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。

3. 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。

4. **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

5. 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 μg 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	20 μL	20 μL

注：此为 20 μL 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。

6. 37℃保温 1-2 小时。注意：延长保温时间并不能大幅提高产量。

7. 加入 2 μL 自备的 500 mM 的 EDTA 溶液灭活 T7 RNA 聚合酶。

8. 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。

9. 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 1 μg DNA 模板一般可以合成 2-6 μg 的 RNA。 10. 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。 **三、 去除 DNA 模板（所需试剂需要另购）** 11. 在 20 μL 体积的体外转录体系中加入 2 μL 的 10×DNase Buffer 和 1 μL 自备的 RNase-free DNase（3-5 U/μL）。 12. 37℃保温 30 分钟。 13. 补 RNase-free 水到 100 μL。增加体积可以减少样品的丢失。 14. 用自备的等体积（100 μL）的 Tris 饱和酚-氯仿，震荡混匀后 14000×g 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。 15. 加自备的 200 μL 无水乙醇和 10 μL 3M 的乙酸钠溶液（pH5.2），振荡后 14000×g 离心 20 分钟，RNA 形成沉淀，弃上清。 16. 在沉淀中加入 1 mL 75%乙醇，震荡 10 秒后 14000×g 离心 5 分钟，弃上清。 17. 短暂离心数秒，用枪头吸弃上清。不要丢失沉淀。 18. 晾干，所得沉淀即体外转录所得的 RNA。
关联产品	SP6 体外转录试剂盒