天净沙系列

CAT#:220214

低温运输，-20℃保存

天净沙

T3体外转录试剂盒

T3 *in vitro* Transcription Kit

使用手册 V1.0

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

本试剂盒是基于沙门氏噬菌体 T3 RNA 聚合酶的 RNA 体外转录试剂盒，它利用含有 T3 启动子的模版 DNA，以 NTP 为底物，从 T3 启动子下游开始合成与模板 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 T3 启动子的 DNA 模板即可以进行体外转录实验，不需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. 模板 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 5000 nt 之间。
5. 产品配方经过精心优化，每μg DNA 模板可以合成 2-6 μg RNA。
6. 得到的 RNA 可以用于 RNA 结构研究、核解生物化学、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。

规格及成分

本产品使用五孔盒包装

成份	编号	规格	包装
2× T3 转录预配液	220214a	0.5 mL	0.5 mL 本色管
T3 RNA 聚合酶混合液	120309	50 μL	0.5 mL 红盖管
RNase-free 水	980403	1 mL	1.5 mL 黄盖管
使用手册	220214sc	1 份	无

运输及保存

低温运输，-20℃保存，有效期一年。

自备试剂

如果需要去除转录产物中的 DNA 模板，则需要 RNase-free DNase 、Tris 饱和酚、氯仿、微量核酸沉淀剂、RNase-free 75%乙醇（均可从本公司另购）

使用方法

一、制备 DNA 模板

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。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。二是需要转录的 DNA 序列的上游必须有 T3 启动子。如果模板是 PCR 产物，则可以在设计引物时将 T3 启动子序列（5’AATTAACCCTCACTAAAGG 3’）加上。如果是将 DNA 片段克隆到载体上，则需要选择有 T3 启动子的载体，并且克隆位点必须位于 T3 启动子下游。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（如选择了 Pst I 来线性化质粒），则最好用 T4 DNA 聚合酶修平。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，以此判断纯化的 DNA 模板是否有残留 RNase A。

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：

成分	N 个样品管	阴性对照
DNA 模板	各 50 ng(PCR 片段模板) 或各 1 μg（质粒模板）	50 ng（PCR 片段） 1 μg（质粒 DNA）
2×T3 转录预配液	10 μL	10 μL
T3 RNA 聚合酶混合液	1 μL	不加
RNase-free 水	补水到 20 μL	补水到 20 μL

注：此为 20 μL 反应体系的用量，对其他体积的反应体系，各成分的用量可以按比例增减。如果需要标记 RNA 探针，则需要另购 NTP 与 2×T3 转录预配液分开提供的试剂盒。如果需要得到加帽 RNA，则需要加入自备的加帽修饰核苷酸（NEB 提供各种加帽修饰核苷酸）。

2. 37℃保温 1-2 小时。注意：延长保温时间并不能提高产量。
3. 70℃加热 10 分钟灭活 T3 RNA 聚合酶。
4. 取 1-3 μL 电泳检测转录效果。比阴性对照多出的条带就是扩增得到的 RNA（由于检测时的电泳不需要碱变性胶，并且合成的 RNA 长度不一定均匀，即使长度均匀，但由于自生形成发夹结构，因此不一定呈现清晰的电泳条带。但由于 RNA 是单链，分子量比同样长度的 DNA 小一倍，因此转录得到的 RNA 一般比其模板电泳速度更快。
5. 定量，可以用自备的单链 RNA 定量试剂盒检测浓度，也可以肉眼比较电泳胶上 RNA 和 DNA 的强度。由于 RNA 是单链，跟核酸染料结合力低，因此同等亮度的 RNA 条带，其 RNA 分子数一般比 DNA 的分子数多一倍。使用本试剂盒时 1μg DNA 模板一般可以合成 2-6 μg 的 RNA。
6. 得到的 RNA 可以放-80℃保存（溶液中有 DNA 模板和未使用的 NTP）。

注：若需进一步去除 T3 转录反应体系中的 DNA 模板，可参考下列操作步骤，但所用试剂需另行购买，本试剂盒不提供。

1. 在体外转录结束后，在反应体系中加入 3-5 U 自备的 RNase-free DNase。
2. 37℃保温 15-30 分钟。

	3. 补水到 100 μL， 4. 用自备的等体积(100 μL)的 Tris 饱和酚-氯仿抽提一次去除残留的 DNase 和 RNA 聚合酶。 5. 在上清中加 200 μL 自备的微量核酸沉淀剂（CAT#50903；用前需要摇晃混匀），振荡后 15000 rpm 离心 3-5 分钟，弃上清。 6. 加入 1 mL 75%乙醇，震荡 10 秒后 15000 rpm 离心 3-5 分钟，弃上清。 7. 短暂离心数秒，用枪头吸弃上清。 8. 晾干半分钟，所得沉淀即去除 DNA 模板后的 RNA。可溶于 RNase-free 水中后立即使用或放-80℃长期保存。
答客问	1、没有 RNA 产物。最常见原因是 DNA 模板有 RNase 污染，测试方法是将纯化的有两条典型 RNA 条带的总 RNA 跟模板 DNA 一起保温，再检测 RNA 是否降解。本试剂盒缓冲液和酶混合液中有 RNase inhibitor，如果模板 RNase 污染严重，可能需要用户补加 RNase inhibitor。 2、RNA 产量低。最常见的原因是 DNA 模板序列。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。 3、RNA 长度比预期的短。可能是模板序列中有 T3 RNA 聚合酶的终止序列。可以改用 SP6 或 T7 体外转录试剂盒（启动子也必须做相应的改变）。 4、RNA 长度比预计的长。T3 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 DNA 线性化不彻底。 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 T3 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。 6、如何得到带帽 RNA？需加入带帽 NTP 类似物即可，NEB 提供 5 种供选择。
关联产品	T7 体外转录试剂盒、SP6 体外转录试剂盒