



T7 Transcription Kit 说明书

【产品说明】

本试剂盒进行了体外转录体系的优化，利用 T7 RNA Polymerase，以含有 T7 启动子的超螺旋质粒 DNA 或线性 DNA 为模板，对 T7 启动子下游的 DNA 序列进行高效转录。本产品适用于制备长度超过 6000 nt 的高浓度 RNA，使用 1 μ g DNA 模板可在 20 μ l 体系生成 150~280 μ g 的 RNA(如果想获得毫克级的 RNA 产物，可平行放大反应体系)。制备的 RNA 可用于体外翻译、RNase 保护实验、RNA 剪切以及杂交探针标记等。

【保存条件】

-20 $^{\circ}$ C，保存一年

【试剂盒组成】

Component	EDN-T701(25rxns)	EDN-T702(100 rxns)
T7 Transcription Enzyme Mix	50 μ l	200 μ l
5 \times T7Transcription Reaction Buffer	100 μ l	400 μ l
ATP(100mM)	50 μ l	200 μ l
GTP(100mM)	50 μ l	200 μ l
CTP(100mM)	50 μ l	200 μ l
UTP(100mM)	50 μ l	200 μ l
DNaseI(1 unit/ μ l)	50 μ l	200 μ l
500mM EDTA(pH 8.0)	25 μ l	100 μ l
RNase-free Water	1ml	5ml
Transcription Control Template(0.5 μ g/ μ l)	10 μ l	40 μ l

【模板参考】

T7 Promoter: 5'-TAATACGACTCACTATAGG \overline{G} [#]-3' #:G/A

Terminator: 5'TTCCATCTGTTTTCTTATCTGTTCTTTCATCTGTTCTTTTATCTGTTTGTTT 3'

模板用量	RNA产量
2 μ g	170~320 μ g
1 μ g	150~280 μ g
500 ng	100~180 μ g
200 ng	40~80 μ g
100 ng	15~40 μ g
50ng	10~20 μ g
10ng	4~8 μ g
1ng	2~6 μ g

【操作流程】

- 1、除了 T7 Enzyme Mix 之外，将其余组分短暂离心并收集于管底。
- 2、配制转录反应：



Component	Volume	终浓度
Template	1ng~2 μ g	NA
5 \times T7 Transcription Reaction Buffer	4 μ l	1 \times
A/G/C/UTP	1.6 μ l each	8mM each
T7 Transcription Enzyme Mix	2 μ l	NA
RNase-free Water	Variable	NA
Total Volume	20 μ l	20 μ l

*注意：提前计算好体系，然后严格按照以下顺序加入各反应组分：水→Buffer→NTP→DNA 模板→酶。

3. 移液枪轻轻混匀各组分并短暂离心收集于管底，37 $^{\circ}$ C 孵育 2 小时。

*注意：为避免长时间转录导致反应液挥发，建议在 PCR 仪中进行反应并将热盖温度设置为 65 $^{\circ}$ C。模板量及孵育时间可适当调整。

4. 消化 DNA 模板：反应结束后，加入 2 μ l DNase I，37 $^{\circ}$ C 反应 30 分钟；结束后加入 1 μ l 500 mM EDTA (pH 8.0) 终止反应(加入 EDTA 后应立即进行后续纯化)，或者消化完成后不加入 EDTA，直接进入纯化步骤。

5. 产物纯化

6. 转录产物定量、检测：

(1) 通过紫外分光光度计测定 RNA 浓度，产物浓度极高，建议稀释后再测。

(2) 100~1000 nt 的 RNA 产物推荐使用 6% 丙烯酰胺、7M 尿素变性胶检测，电泳缓冲液为 1 \times TBE Buffer。

- 10 \times TBE Buffer: 0.9 M Tris Base、0.9 M Boric Acid、20mM EDTA。

- 凝胶配制方法：每 10ml 中，尿素 4.2g、RNase-free Water 4.4ml，40% (丙烯酰胺:甲叉双丙烯酰胺=19:1) 丙烯酰胺 1.5ml，10 \times TBE Buffer 1ml、10% AP 100 μ l，TEMED 10 μ l。AP 和 TEMED 在尿素完全溶解后加入。

(3) 500~6000 nt 的 RNA 产物推荐用 1% 甲醛琼脂糖变性胶检测，电泳缓冲液为 1 \times MOPS Buffer。

- 10 \times MOPS Buffer: 0.4 M MOPS (pH 7.0)、0.1 M Sodium Acetate、10mM EDTA。

- 凝胶配制方法：每 100ml 中，称量 1g 琼脂糖加入 72ml RNase-free Water 中，加热溶化后，加入 10ml 10 \times MOPS Buffer。待溶液冷却至 50~60 $^{\circ}$ C 时，加入 18ml 甲醛(37%)，混匀，倒胶。

(4) 电泳检测时，取 0.2~1 μ g RNA，用 RNase-free Water 稀释至 5 μ l，加入等体积的 2 \times RNA Loading Buffer 混匀，70 $^{\circ}$ C 孵育 10 分钟后冰浴 2 分钟，全部点样。电泳结束后用 Gelstain 或 EB 染色观察，RNA Marker 与 RNA 样品处理方法相同(或参考供应商使用说明书)。

【数据参考】

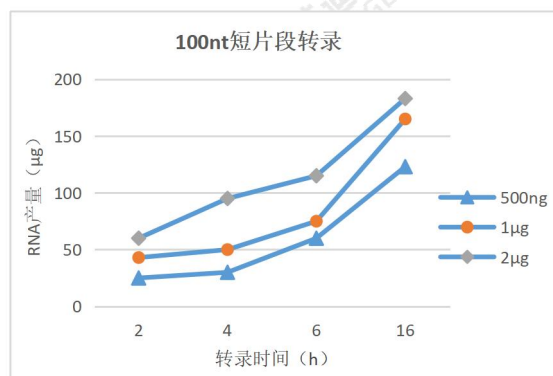


图 1 20 μ l 体系下，长度小于 300nt 的 RNA 转录产量与模板投入量、转录时间的关系图

