



## T7 RNA 聚合酶

**【产品名称】：** T7 RNA 聚合酶

**【货号】：** ZR080S

**【包装规格】：** 100ul(50U/ul)

### 【说明】

T7 RNA Polymerase 对 T7 噬菌体启动子具有高度的特异性，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 RNA Polymerase 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。

### 【组成】

名称	数量
T7 RNA Polymerase (50 U/μl)	100ul
5X T7 Transcription Buffer	1ml

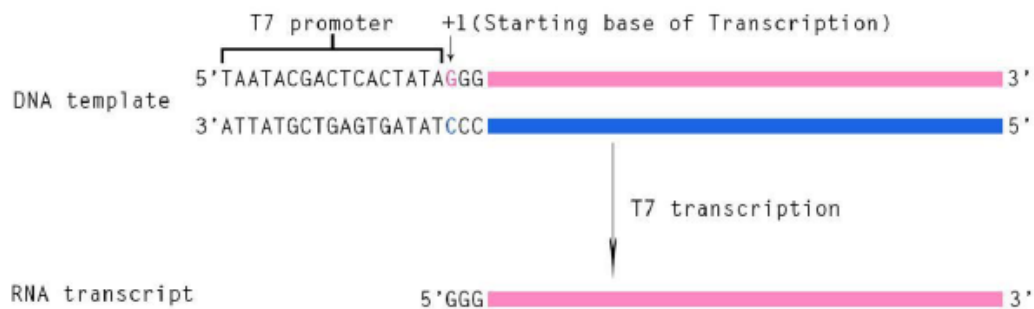
### 【储存条件及有效期】

-20℃及以下，有效期 24 个月。

### 【使用方法】

#### 1. DNA 模板准备

1.1 PCR 产物、线性化的质粒 DNA、cDNA 或寡核苷酸可以被用作体外转录的模板。许多克隆载体携带两个相反方向的 T7 噬菌体聚合酶启动子序列，它可以结合 T7 聚合酶以起始转录过程。为了获得纯化的线性化质粒，环状质粒必须被完全线性化（消化完全）或清除。



1.2. PCR 产物也可以作为体外转录的模板。带有 T7 启动子的 PCR 产物可以通过在上下游引物的 5' 端加上 T7 启动子序列而获得，由 PCR 反应产生带 T7 启动子的双链产物。如上图阐明了如何给 PCR 产物加上 T7 启动子。

1.3. 两条寡聚核苷酸也可以用来构建短的转录模板，双链的 DNA 模板可以通过两条带有 T7 噬菌体启动子的互补寡聚核苷酸退火延伸获得。实际上，只要 DNA 模板形成双链 DNA，体外转录就可以进行。例如 shRNA 的体外转录。

1.4. 最近几年，RNA 体外转录程序被逐渐应用于 RNA 放大反应：以 RNA 为起始模板，oligo(dT)-T7 promoter 引物可以用在反转录过程以获得一个转录模板，第二轮合成反应便可以获得双链的转录模板。

## 2. RNA 合成反应配制：(注：rNTP、Rnasin、DEPC 水需要另外订购)

(1) 各相应组分在冰上解冻，在室温下按以下顺序配制反应混合液。

5X T7 Transcription Buffer	4ul	
ATP(20mM)	2ul	终浓度 2mM
GTP(20mM)	2ul	终浓度 2mM
CTP(20mM)	2ul	终浓度 2mM
UTP(20mM)	2ul	终浓度 2mM
Rnasin(40U/ul)	0.5-1ul	也可以不要
含 T7 启动子的双链 DNA 模板	Y ul	小片段约 50-100ng, 大片段或线性质粒约 1ug
T7 RNA Polymerase	1-2ul	
DEPC 处理过的 ddH <sub>2</sub> O	X ul	



合计:	20ul	
-----	------	--

(2) 彻底混匀, 大片段 37°C 孵育 2h; 短片段 (<300nt) 的转录本孵育 4-6h。(注: 孵育反应长达 16h (过夜) 或者使用多达 2 μg 的模板将会有助于实现最大产量; 对于富含 GC 或有二级结构的模板, 在 42-50°C 下孵育会增加长转录本的产量。)

(3) (可选) 在反应体系中加入 1μL 的 DNase I, 37°C 孵育 15min, 消化转录的 DNA 模板。相对于产物 RNA, 模板 DNA 的含量非常低, 一般不用去除, 也可以用 DNase I 消化

(4) 继续纯化合成的 RNA 或凝胶电泳检测转录产物。

### 3. 合成 RNA 的纯化

通常, 从标准 RNA 合成中提取的未修饰 RNA 转录产物可以通过苯酚/氯仿提取及乙醇沉淀或使用离心柱为基础的方法纯化。对于非放射性标记的 RNA 或高特异性的放射性 RNA 探针, 色谱柱纯化是最合适的方法; 如果需要绝对全长的 RNA, 我们建议采用凝胶回收纯化。

### 4. 反应产物的评估

RNA 浓度在 10 ng/μL 至 3000 ng/μL 范围内可以被 NanoDrop™ 分光光度计直接读出。对于单链 RNA, 1 A260 对应的 RNA 浓度为 40 μg/mL。

RNA 浓度可按以下方式计算:

$$A260 \times \text{稀释倍数} \times 40 = \text{ } \mu\text{g/mL RNA}$$

#### 【1X T7 Transcription Buffer】

40 mM Tris (pH 7.8), 20 mM NaCl, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM Spermidine HCl, 10 mM DTT

热失活: 70°C, 10min。

#### 【活性单位定义】

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。



【其它相关试剂】

名称	货号	价格
100 mM ATP	ZR101	150.00/500ul
100 mM GTP	ZR102	150.00/500ul
100 mM CTP	ZR103	150.00/500ul
100 mM UTP	ZR104	150.00/500ul
20 mM rNTP mix	ZRM101	300.00/ml
Rnasin	ZP00801	200.00/25ul
200 X Ribogreen	RF023	600.00/100ul
焦磷酸酶	ZR030S	350.00/100ul



上海闪晶生物科技有限公司

地址：上海市松江区新桥镇民强路 289 号 6 号门 2 楼

邮编：201612

联系：市场部

电话：021-54460832 800-988-1995

