

T7 RNA Polymerase

使用说明书

货号/规格: E1022-A/5,000 U

浓度: 20 U/ μ L

产品简介

噬菌体 T7 RNA 聚合酶是 DNA 依赖性 RNA 聚合酶, 对相应的双链启动子具有严格特异性。它从启动子开始催化单链 DNA 或双链 DNA 下游 5'→3' RNA 合成。

产品组成

组分	E1022-A
T7 RNA Polymerase	250 μ L
5X Transcription Buffer	1.25 mL

储存条件

保存于-20°C。

来源

重组 *E. coli* 菌株, 含有编码此酶的克隆基因。

单位定义

一个单位是指在 37°C 下 60 分钟内将 1nmol 的 AMP 掺入多核苷酸组分中所需的酶量。

特点

- 可掺入经修饰的核苷酸 (如氨基烯丙基、生物素、荧光素、地高辛标记的核苷酸)

适用范围

未标记和标记 RNA 的合成, 可用于:

- 杂交、体外 RNA 翻译

- 作为 aRNA、siRNA、RNase 保护试验中的底物、基因组 DNA 测序的模板
- 在 RNA 二级结构和 RNA-蛋白相互作用研究中, RNA 剪接

抑制与失活

- 抑制剂: 金属整合剂, NaCl 或 KCl 浓度高于 150mM 时酶活性降低 50%。
- 通过在 70°C 下加热 10 分钟或加入 EDTA 灭活。

使用方法

1. 体外转录

① 用限制性内切酶线性化模板 DNA。用苯酚/氯仿提取 DNA, 然后用氯仿/异戊醇提取 DNA, 用乙醇沉淀。将 DNA 溶解在 DEPC 处理水 (#R2041) 中。

② 准备反应体系:

Component	Amount
5X Transcription Buffer	10 μ L
ATP/GTP/CTP/UTP Mix, 10 mM each	10 μ L (2 mM final concentration)
Linear template DNA	1 μ g
RNase inhibitor (#R2011)	50 U
T7 RNA Polymerase	30 U
Depc-treated Water (#R2041)	To 50 μ L

③ 在 37°C 孵育 2h。

④ 可选: 要去除模板 DNA, 加入 2U DNase I, RNase-Free (#E1018), 混合并在 37°C 下孵育 15 min。

⑤ 通过苯酚/氯仿提取灭活 DNase I。

注意:

- 转录反应应在排除 RNase 污染的条件下进行。吸头、管子和水应不含核酸酶。所有溶液都应在不含核酸酶的水中配制。建议戴手套。
- 反应混合物应在室温下制备, 因为 DNA 可能在 4°C 的亚精胺存在下沉淀。
- 在上述条件下, 每 1 μ g 模板 DNA 获得超过 10 μ g RNA。
- 如果模板 DNA 由于通读反应和可变长度的较长转录本的积累而不完全线性化, 则适当长度转录本的产量会降低。
- 反应混合物可以按比例放大或缩小。

2. 合成高比活性放射性标记 RNA 探针

① 用限制性内切酶线性化模板 DNA。用苯酚/氯仿提取 DNA, 然后用氯仿/异戊醇提取 DNA, 用乙醇沉淀。将 DNA 溶解在 DEPC 处理水 (#R2041) 中。

② 准备反应体系:

Component	Amount
5X Transcription Buffer	4 μ L
3 NTP mix, 10 mM each	1 μ L (0.5 mM final concentration)
100 μ M CTP	2.4 μ L (12 μ M final concentration)
[α - ³² P]-CTP, ~30 TBq/mmol (800 Ci/mmol)	1.85 MBq (50 μ Ci)
Linear template DNA	0.2-1.0 μ g
RNase inhibitor (#R2011)	20 U
T7 RNA Polymerase	20 U
Depc-treated Water (#R2041)	To 20 μ L

③ 在 37°C 孵育 2h。

④ 通过在 -20°C 降温终止反应。

⑤ 确定掺入 RNA 的标记百分比。

注意:

- 在上述条件下合成的 RNA 通常具有 $3-5 \times 10^8$ dpm/ μ g 的比活性。
- RNA 可以用 [³²P]、[³⁵S] 或 [³H]-核糖核苷酸进行放射性标记。使用 1.85 MBq (50 μ Ci) 的 5'-[α -³²P]-CTP、~30 TBq/mmol (800 Ci/mmol)、11.1 MBq (300 μ Ci) 的 5'-[α -³⁵S]-UTP、>37 TBq/mmol (>1000 Ci/mmol)、0.925 MBq (25 μ Ci) 的 5,6-[³H]-UTP, 1.1-2.2 TBq/mmol (30-60 Ci/mmol) 用于 20 μ L 反应混合物。
- 当标记的 NTP 的最终浓度低于 12 μ M 时, 全长转录本的产量降低。

本品仅供科学研究使用。