

S6 HiPer T7 In Vitro Transcription Kit

T7 体外转录试剂盒使用说明书

产品名称	单位	货号
S6 HiPer T7 In Vitro Transcription Kit	20T	S6384-01
S6 HiPer T7 In Vitro Transcription Kit	100T	S6384-05

【储存条件】

长期保存，请置于-20℃，有效期12个月。使用后请及时放入-20℃保存以保证酶的活性。

【产品简介】

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。

【产品特色】

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20nt到2000nt之间。
5. 产品配方经过精心优化，每1 μg DNA模版可以合成2~6 μg RNA。
6. 得到的RNA可用于RNA结构研究、体外翻译、RNA蛋白质相互作用、反义技术、SELEX和RNA干扰（RNAi）等实验。。

【产品组份】

试剂盒成分	20 T	100 T
2xT7 In Vitro Transcription Mix	0.2 ml	1ml
Nuclease-free Water	1 ml	2 × 1 ml

【注意事项】

1. 由于涉及RNA操作，需要严格按照RNA操作的规范进行，避免RNase污染，相关试剂和耗材需要经过DEPC处理以去除RNase或者确保是RNase free的。
2. 如果希望合成加帽的RNA，须自备Cap analog，如m7(3' -O-methyl)-G(5')ppp(5')G等。
3. 如果希望合成生物素、地高辛、FITC、Cy3等标记的RNA或带有特殊修饰的RNA，相应的修饰NTP需要自备。

【自备试剂】

Tris饱和酚、氯仿、RNase-free 75%乙醇。

【操作步骤】

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：

A、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。

B、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 TC A 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。

C、需要转录的DNA序列下游端最好不要是3' 突出。如果是3' 突出（比如选择Pst I来线性化质粒），则最好用T4 DNA聚合酶修平。

D、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，最好采取胶回收的方法纯化质粒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

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，哪个条带是转录扩增得到的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：

注意：2x T7 In Vitro Transcription Mix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	100-500ng左右的PCR片段或线状质粒	--
2xT7 In Vitro Transcription Mix	各10 μ L	10 μ L
Nuclease-free Water	至20 μ L	至20 μ L

注意：此为20 μ L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2xT7 In Vitro Transcription Mix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。

2. 37℃保温2-12小时

注意：延长保温时间并不能大幅提高产量。

3. 加入2 μ L自备的500mM的EDTA溶液灭活T7 RNA聚合酶。

4. 取5 μ L电泳，此时最好加上一个DNA模板做电泳对照。电泳时比阴性对照多出的条带就是转录扩增得到的RNA，由于合成的RNA长度不均匀，即使长度均匀，但由于自身形成发夹结构，泳动速度也不一致，所以电泳所得RNA条带一般都不是清晰单一条带，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。

5. 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 μ g的DNA模板一般可以合成2-6 μ g的RNA。

6. 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）

1. 在20 μ L体积的体外转录体系中加入2 μ L的10 $\times$ DNase I Buffer和1 μ L自备的RNase-free DNase I 3-5U/ μ L。

2. 37℃保温30分钟。

3. 补RNase-free水到100 μ L。增加体积可以减少样品的丢失。

4. 用自备的等体积100 μ L的Tris饱和酚和氯仿震荡混匀后14000g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。

5. 加自备的200 μ L无水乙醇和10 μ L 3M的乙酸钠溶液（pH5.2），振荡后14000rpm离心20分钟，RNA形成沉淀，弃上清。

6. 在沉淀中加入1mL 75%乙醇，震荡10秒后14000g离心5分钟，弃上清。

7. 短暂离心数秒，用枪头吸弃上清。不要丢失沉淀。

8. 晾干，所得沉淀即体外转录所得的RNA。

去除DNA模板也可以用PCR产物纯化回收试剂盒。

【常见问题】

1. 没有RNA产物。

可能原因是模板有RNase污染，可用纯化好的RNA跟模板DNA一起保温再电泳，再检测其是否有污染。

2. RNA产量低。

可能原因是DNA模板序列导致。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T7 RNA聚合酶的终止序列。

4. RNA长度比预计的长。

T7 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T7 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. 用体外转录试剂盒如何得到带帽RNA？

需加入带帽NTP类似物即可。

Science Tool

【备注】本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。