

T7 High Efficiency Transcription Kit

使用前请仔细阅读说明书

目录号: JT101

保存: -20°C保存一年。

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 μg DNA模板可在20 μl体系生成150~280 μg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。

试剂盒组成

Component	JT101-01 (25 rxns)	JT101-02 (100 rxns)
T7 Transcription Enzyme Mix	50 μl	200 μl
5×T7 Transcription Reaction Buffer	100 μl	400 μl
ATP (100 mM)	50 μl	200 μl
GTP (100 mM)	50 μl	200 μl
CTP (100 mM)	50 μl	200 μl
UTP (100 mM)	50 μl	200 μl
DNase I (1 unit/μl)	50 μl	200 μl
500 mM EDTA (pH 8.0)	25 μl	100 μl
RNase-free Water	1 ml	5 ml
Transcription Control Template (0.5 μg/μl)	10 μl	40 μl

RNA合成

T7 RNA Polymerase转录原理

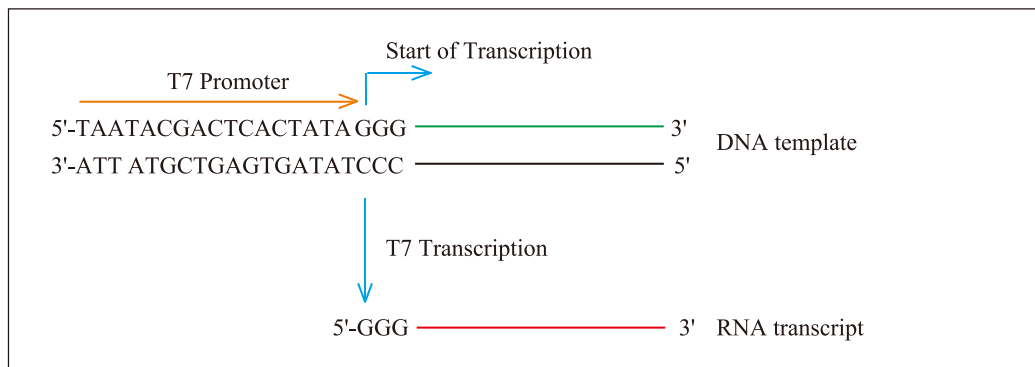


图1. T7 RNA Polymerase转录原理图

模板制备

1、超螺旋质粒DNA

超螺旋质粒需要有一个T7启动子以及一个有效终止转录的终止子, 常见载体的T7 terminator的终止效率不足70%, 转录反应会产生较多通过终止子的转录产物。推荐使用以下序列组成的转录终止子, 或者利用限制性内切酶在转录末端制造线性DNA来终止转录 (详见条目2)。

Transcription template

T7 Promoter ————— Terminator

T7 Promoter: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG[#]-3' #: G/A

Terminator: 5' TTCCATCTGTTTCTTATCTGTTCTTTCATCTGTTCTTTTATCTGTTTGTTT 3'



2、线性DNA

一般是经限制性内切酶酶切的质粒或者PCR产物。**线性DNA作为转录模板时要避免出现3'突出端，因而一般选择形成5'突出端或者平末端产物的限制性内切酶。**酶切产物或PCR产物需要纯化去掉蛋白质、盐离子等以获得高量的DNA作为模板。

3、模板用量

本试剂盒推荐的反应体系适用于大多数模板的反应，1 μg的模板投入量反应2小时可以产生150~280 μg的RNA，下表总结了本产品模板用量与产量的关系：

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

然而，具体产量会因不同模板的长度、纯度、序列和结构而异。大多数转录反应，可通过增大模板投入量及延长反应时间获得更大产量。***注意：本表格适用于大多数转录反应，但对于 < 500 nt 短片段的转录建议参考下述数据参考1~3。**

注意事项

- 避免RNase污染：请务必使用RNase-free的水、移液枪头(含滤芯)和离心管，操作过程穿戴实验服和手套。
- 请在室温配制反应：**本试剂盒5×T7 Transcription Reaction Buffer在低温条件下盐浓度高导致盐析出从而影响模板DNA以及酶活性，因此配制反应体系时除了酶和NTP需放在冰上暂存，其他组分置于室温，并在室温条件下配制体系。**
- 注意加样顺序，请预先计算好体积，**严格按照以下顺序加入各反应组分：水→Buffer→NTP→DNA模板→酶，模板和酶一定要最后加入。**
- 对于 < 500 nt 的短片段转录建议使用2 μg模板，对于100 nt左右超短片段建议使用2 μg模板并延长反应时间至6小时以上，过夜16小时反应可得到最大产量。
- 若转录时间需达到6小时以上甚至更久，可使用2 μg模板并将NTP终浓度提高至10 mM。

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	1 ng~2 μg	NA
5×T7 Transcription Reaction Buffer	4 μl	1×
A/G/C/UTP	1.6 μl each	8 mM each
T7 Transcription Enzyme Mix	2 μl	NA
RNase-free Water	Variable	NA
Total Volume	20 μl	20 μl

***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°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°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 μl DNase I，37°C反应30分钟；结束后加入1 μl 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：请参考EasyPure® RNA Purification Kit (ER701) 或MagicPure® RNA Beads (EC501) 说明书。

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、7 M尿素变性胶检测，电泳缓冲液为1×TBE Buffer。

• 10×TBE Buffer: 0.9 M Tris Base、0.9 M Boric Acid、20 mM EDTA。

• 凝胶配制方法：每10 ml中，尿素4.2 g，RNase-free Water 4.4 ml，40% (丙烯酰胺:甲叉双丙烯酰胺=19:1) 丙烯酰胺 1.5 ml，10×TBE Buffer 1 ml，10% AP 100 μl，TEMED 10 μl。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×MOPS Buffer。

• 10×MOPS Buffer: 0.4 M MOPS (pH 7.0)、0.1 M Sodium Acetate、10 mM EDTA。

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

(4) 电泳检测时，取0.2~1 μg RNA，用RNase-free Water稀释至5 μl，加入等体积的2×RNA Loading Buffer (GH201) 混匀，70°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)。

数据参考

1、转录时间与产量的关系：以20 μl反应体系加入1 μg模板为例，结果如下：

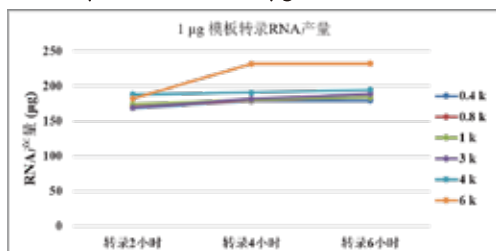


图2. 转录不同长度RNA的产量与时间的关系图 (400 nt短片为2 μg模板转录结果)

2、模板投入量与产量的关系：以20 μl反应体系转录2小时为例，结果如下：

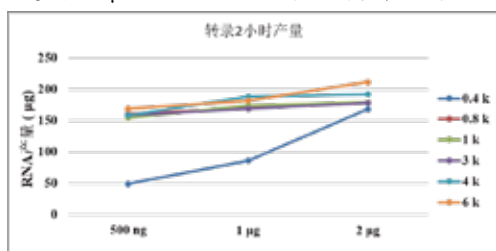


图3. 转录不同长度RNA的产量与模板投入量的关系图

3、长度小于300 nt的短片段模板投入量、转录时间与产量的关系，以20 μl反应体系为例，结果如下：

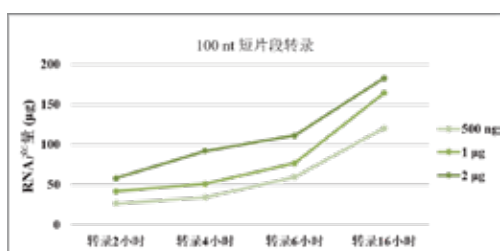


图4. 长度小于300 nt的RNA转录产量与模板投入量、转录时间的关系图



常见问题&解决方案

1、转录产量低或转录失败

模板质量与RNA产量密切相关，建议设立对照组。若对照组产量低，请联系北京全式金客服，对反应体系配制进行指导；若对照组产量正常但实验组产量低，可能实验组模板本身存在质量问题，建议尝试以下解决方案：①模板可能存在抑制反应的成分，请重新纯化模板，模板DNA应为RNase-free、高纯度；②确定模板定量及其完整性；③延长转录反应时间；④加大模板投入量；⑤尝试其它的启动子和RNA聚合酶。

2、转录产物电泳出现拖尾现象

可能由以下原因导致：①电泳实验操作过程被RNase污染；②转录模板被RNase污染。

建议重新制备模板DNA，实验用到的耗材及试剂应为RNase-free级别，实验操作中佩戴口罩及一次性乳胶手套，注意RNase污染控制。

3、转录产物长度大于预期

若电泳显示产物条带大于预期，可能由以下原因导致：①终止子效率低未终止转录或者模板没有完全线性化；②有义链3'端为突出结构；③产物RNA存在未完全变性的二级结构。

建议以下解决方案：①检查模板是否完全线性化，需保证线性化完全；②选择合适的限制性内切酶，确保有义链5'端为突出结构或双链为平末端；③检查模板结构，用变性胶检测RNA产物。

4、转录产物长度小于预期

若电泳显示产物条带小于预期，可能原因有：①模板序列中含有类似T7 RNA聚合酶的转录终止子序列，导致转录提前终止；②模板序列GC含量高而形成高级结构；③RNase污染。

若模板含终止子序列，建议更换RNA聚合酶；若模板GC含量高，可尝试加入SSB蛋白以提高产量和转录长度。

5、短片段转录产量低

转录片段太短会抑制反应，当转录长度 < 500 nt时，请延长反应时间并增加模板投入量，建议使用2 μg模板，对100 nt超短片段的转录建议使用2 μg模板并反应至少6小时，过夜转录16小时可获得最大产量。

质量控制

项目	标准	方法
产品外观	透明澄清	目视检查
纯度	≥95%	SDS-PAGE或SEC-HPLC
核酸内切酶残留	未检出	4 μl Enzyme/20 μl Buffer与1 μg pUC19质粒在37°C孵育16小时
核酸外切酶残留	未检出	4 μl Enzyme /20 μl Buffer与1 μg Hela gDNA在37°C孵育16小时
非特异性核酸酶活性	未检出	4 μl Enzyme/20 μl Buffer与1 μg的1 kb DNA Ladder在37°C孵育16小时
RNase残留	未检出	4 μl Enzyme/20 μl Buffer与1 μg Hela RNA/体外转录RNA在37°C孵育4小时
细菌残留	未检出	涂板于LB培养基于37°C培养2天无菌落形成，或于SOC液体培养基过夜培养检测OD ₆₀₀ 无明显变化
细菌内毒素含量	< 10 EU/mg	中国药典2020版第四部凝胶限度实验 (通则1143)
宿主DNA残留	≤1拷贝/U	荧光定量PCR法
支原体检测	阴性	支原体检测试剂盒

本产品仅供研究，不用于临床诊断。

版本号: V3-202202

服务电话 +86-10-57815020

服务邮箱 complaints@transgen.com

