

T7 High Yield Transcription Kit

使用说明书

目录号:

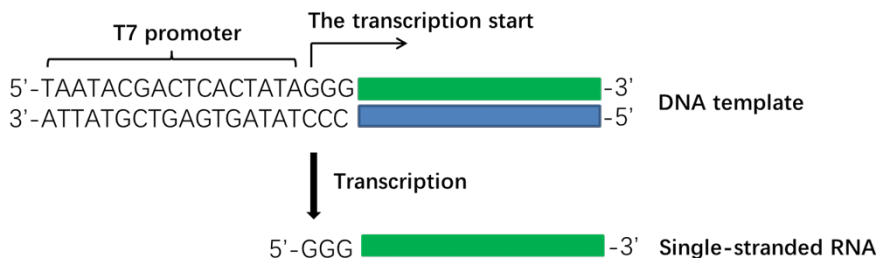
目录编号	包装单位
NS036-01	50T

Component	NS036-01(50T)
T7 RNA Transcription Enzyme Mix	200 μ L
5 \times T7 Transcription Reaction Buffer	250 μ L
25mM NTP Mix	100 μ L
DNase I	50 μ L
Nuclease Free Water	1mL
Control Template (0.5 μ g/ μ L)	10 μ L

产品储存: -20 $^{\circ}$ C运输和保存, 有效期 12 个月。

产品浓度: 浓度: 200 units/ μ L

制品说明: 本试剂盒是利用 T7 RNA Polymerase, 以含有 T7 启动子的线性化质粒 DNA、PCR 产物或合成的 DNA 为模板, 以 NTP 为底物, 在体外转录合成 RNA。本试剂盒优化了 RNA 体外转录反应体系, 可以简单快速获得大量的 RNA 分子, 如果转录时在底物中加入修饰的核苷酸, 可以制备生物素或染料标记的 RNA。本试剂盒主要用于体外翻译、RNase 保护实验、杂交探针标记、RNA 剪切等生物实验。在反应体系中 1 μ g 的模板投入量可以产生大于 100 μ g 的 RNA, 适用于制备长度 100-8000nt 的 RNA。



操作步骤:**1. 模板准备:**

- 1) 以 T7 启动子的质粒为模板: 为了得到特定长度的 RNA, 质粒模板必须完全线性化(需要纯化后作为模板), 且线性化的质粒确保双链为平末端或 5'突出端(避免出现 3'突出端), 每个反应建议模板量为 1 μ g;
- 2) 以 T7 启动子的 PCR 产物或合成的 DNA 片段为模板: PCR 扩增模板时将 T7 启动子(5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3')加到非编码链引物的 5'端。PCR 产物可以不经纯化直接作为转录模板, 但纯化后会产出更多的 RNA, 每个反应建议模板量为 0.5 μ g 左右。

2. **转录反应:** 按照表格推荐反应体系在洁净的 EP 管中加入各种试剂, 充分混匀后于 37 $^{\circ}$ C 反应 2h(如合成小于 300nt 的 RNA, 建议将反应时间延长至 4h 或更长时间)。

Component	Volume(20 μ L)
Template	0.5-1 μ g
5 \times T7 Transcription Reaction Buffer	4 μ L
25mM NTP Mix	2 μ L
T7 RNA Transcription Enzyme Mix	4 μ L
Nuclease Free Water	To 20 μ L

- 1) 反应完毕后向体系中加入 1 μ L DNase I, 37 $^{\circ}$ C 反应 15min, 消化转录的 DNA 模板。
- 2) 转录合成的 RNA 经电泳分析、纯化后, 可用于下游实验。
3. **转录产物定量、检测:** 通过紫外吸收法可以测定 RNA 浓度(游离核苷酸会影响定量的准确性, RNA 产物需要纯化); 电泳检测推荐采用 1%甲醛琼脂糖变性胶检测, 电泳液为 1 \times MOPS Buffer(10 \times MOPS Buffer: 0.4M MOPS pH 7.0、0.1M Sodium Acetate、10mM EDTA)。
4. **凝胶制备方法:** 称取 0.5g 琼脂糖加入 36mL RNase-Free Water 中, 加热溶化后, 加入 5mL 10 \times MOPS Buffer。待溶液冷却至不烫手时, 加入 9mL 甲醛溶液(37%), 混匀后倒胶。电泳检测时取适量 RNA 与 RNA Loading Buffer 混合, 70 $^{\circ}$ C 孵育 10min 后冰浴 2min, 全部点样。电泳结束后用 EB 或 GelRed 核酸染料(货号: P202)染色观察。

注意事项:

1. 人体皮肤表面含有丰富的 RNase, 实验时请带好实验手套、口罩, 实验耗材无菌无酶, 防止 RNase 污染。
2. 如需制备标记 RNA, 请替换试剂盒中的 NTP Mix。
3. 试剂盒中对照模板转录长度为 500nt。

4. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
5. 本产品仅供科研使用，严禁用于临床诊断和药物等用途。

=====

