

T7 High Yield RNA Transcription kit (N1-Me-Pseudo UTP)

产品信息

产品名称	产品编号	产品规格
T7 High Yield RNA Transcription kit	T7E10201	50 rxns
(N1-Me-Pseudo UTP)	T7E10202	100 rxns

产品说明

●T7 High Yield RNA Transcription Kit (N1-Me-Pseudo UTP) 进行了转录反应体系的优化, 通过体外转录反应简单高效地获得大量N1-Me-Pseudo UTP 修饰的RNA产物。修饰核苷酸N1-Me-Pseudo UTP的添加可以减少宿主细胞的免疫反应。本试剂盒使用T7 RNA聚合酶, 以含有T7启动子序列的线性双链DNA为模板, NTPs为底物对启动子下游DNA序列进行转录, 获得单链RNA, 操作简便快捷。本试剂盒也能够以不同修饰核苷酸为底物产生染料、生物素或者放射性标记的RNA。

●本试剂盒一个反应能够获得150 - 200 μg RNA产物, 并可放大用于产生毫克级别RNA。转录合成的RNA可用于如RNA结构与功能研究、RNA酶保护、探针杂交、RNAi等应用, 也可用于体外翻译、转染、显微注射或其他下游应用。

产品组分

组分	T7E10201(50rxns)	T7E10202(100rxns)
T7 RNA Polymerase(50U/ μl)	100 μl	200 μl
10 \times Transcription Buffer	100 μl	200 μl
N1-Me-Pseudo UTP Solution (100 mM)	100 μl	200 μl
ATP Solution (100 mM)	100 μl	200 μl
CTP Solution (100 mM)	100 μl	200 μl
GTP Solution (100 mM)	100 μl	200 μl
Murine RNase Inhibitor(40 U/ μl)	50 μl	100 μl
Pyrophosphatase, Inorganic (0.1U/ μl)	50 μl	100 μl
DNase I (1 U/ μl)	100 μl	200 μl
Control template (100ng/ μl)	10 μl	20 μl
RNase-free Water	1ml	2ml

产品应用

体外合成单链RNA。

保存方法

-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 避免反复冻融。

注意事项

1. 以1 μg 的模板投入量可以产生150-200 μg 的RNA, 为了避免蛋白及盐离子等对体系的影响, 质粒线性化后建议纯化后再作为模板进行体外转录, 不同模板的产量会因模板的序列、结构、长度、纯度以及特定RNA聚合酶启动子的序列和长度而有所不同。影响转录产量的污染物包括核糖核酸酶或污染物, 如苯酚、微量金属和SDS。
2. 推荐的反应条件(2小时)可适用于大多数模板的体外转录, 但是对于某些模板可以通过延长反应时间(3~8小时), 或者增加模板量提高RNA产率。
3. 本产品对RNase高度敏感, 反应体系须严格使用无RNase管和移液枪等实验器材, 须严格注意不要混入RNase。
4. 产品组分10 \times Transcription Buffer中含有亚精胺成分, 在低温时会沉淀模板DNA, 建议常温下配制反应液, 计算体系并调整好组分加样顺序, 先加水、Buffer和NTP, 最后加模板和酶。



体外转录反应体系

1. 在室温下配置反应体系

分组	体积 (ul)
10 × Transcription Buffer	2
N1-Me-Pseudo UTP Solution (100 mM)	2
ATP Solution (100 mM)	2
CTP Solution (100 mM)	2
GTP Solution (100 mM)	2
T7 RNA Polymerase (50U/μl)	2
Murine RNase Inhibitor (40 U/μl)	1
Pyrophosphatase, Inorganic (0.1U/μl)	1
Template DNA	x(1μg)
RNase-free Water	To 20

2. 用移液器轻轻混匀各组分, 并短暂离心收集, 37°C反应2小时, 如合成小于0.1 kb RNA, 可将反应延长至3小时或更长。

3. 反应结束后, 使用2 U DNase I 消化 DNA 模板, 37°C 反应 15 min。

产物纯化

1. 柱纯化

(1) 纯化前加入80 μl RNase-free Water将产物稀释至100 μl, 再按照柱纯化试剂盒说明书进行纯化。柱纯化可以去除蛋白和游离核苷酸。由RNA产量较高, 为避免超出结合柱的承载能力, 请对所需柱子数量进行预估。

2. 氯化锂纯化

(1) 向20μl转录产物中分别加入30μl RNase-free Water和30μl 氯化锂沉淀液(7.5 M氯化锂, 50 mM EDTA), 当RNA小于300nt或浓度小于100ng/μl时, 不能通过此方法得到有效沉淀; 当RNA浓度大于400ng/μl时沉淀效果最好。当转录产物浓度偏低, 在100~400ng/μl时, 不需要加水稀释, 直接使用30μl 氯化锂沉淀液沉淀即可。

(2) 混匀后放入-20°C放置至少30min。

(3) 12000rpm离心15min, 去上清, 收集沉淀。

(4) 去上清, 加入500μl预冷的70%乙醇洗涤RNA沉淀, 15000 rpm离心, 弃上清。重复三次。

(5) 开盖干燥至少2min, 确保无酒精残留, RNase-free Water溶解RNA沉淀。

3. 酚/氯仿纯化法

(1) 加入160μl RNase-free Water将产物稀释至180 μl。

(2) 加入20μl 3M的醋酸钠 (pH 5.2) 到稀释后的产物中, 充分混匀。

(3) 加入200μl的酚/氯仿混合液(1:1)进行抽提, 室温12000 rpm离心5 min, 将上层水相转移至新的离心管中。

(4) 加入与水相等体积的氯仿抽提2次, 收集上层水相。

(5) 加入2倍体积的无水乙醇并混匀, -20°C放置至少30 min, 12000 rpm离心15 min。

(6) 去上清, 加入500μl预冷的70%乙醇洗涤RNA沉淀, 15000 rpm离心, 弃上清。重复三次。

(7) 开盖干燥至少2 min, 确保无酒精残留, 加入20~50μl RNase-free Water溶解RNA沉淀。

