



碧云天生物技术/Beyotime Biotechnology
 订货热线: 400-1683301 或 800-8283301
 订货 e-mail: order@beyotime.com
 技术咨询: info@beyotime.com
 网址: http://www.beyotime.com

T3 RNA Polymerase

产品编号	产品名称	包装
D7066	T3 RNA Polymerase	500U

产品简介:

- T3 RNA Polymerase, 即T3 RNA聚合酶, 是一种高度特异识别T3启动子序列的DNA依赖的5'→3' RNA聚合酶。T3 RNA Polymerase可以催化单链或双链DNA T3 启动子下游NTP的掺入, 合成与T3启动子下游的模板DNA互补的RNA。
- **特点:** T3 RNA Polymerase可以识别修饰的NTP, 例如生物素标记、地高辛标记、荧光素标记的NTP, 可以用于各种标记RNA的合成。同时对于T3启动子有高度的特异性。
- **用途:** 用于RNA合成, 合成的RNA可以用于或用作: 杂交探针, 基因组DNA序列分析, 核糖核酸酶保护测定(RNase protection assay), 反义RNA合成, 作为体外翻译的RNA模板, RNA剪接研究的底物, RNA二级结构和RNA-蛋白质相互作用, 核酸扩增分析, siRNA、miRNA等小RNA。
- **来源:** 由大肠杆菌表达, 表达基因为嗜菌体T3 RNA Polymerase基因。
- **活性定义:** 37°C 60分钟内, 催化1 nmol AMP 掺入到多聚核苷酸中所需的酶量定义为1个活性单位。
- **活性检测条件:** 40mM Tris-HCl (pH8.0), 6mM MgCl₂, 10mM DTT, 2mM spermidine, 0.5mM NTP, 0.6MBq/ml [³H]-ATP, 20μg/ml plasmid DNA containing the specific T3 RNA Polymerase promoter sequence。
- **纯度:** 不含DNA内切酶和外切酶, 不含RNA酶。
- **酶储存溶液:** 50mM Tris-HCl (pH8.0), 150mM NaCl, 5mM DTT, 0.1mg/ml BSA, 0.5mM Elugent, 50% glycerol。
- **Transcription Buffer (5X):** 200mM Tris-HCl (pH7.9 at 25°C), 30mM MgCl₂, 50mM DTT, 50mM NaCl, 10mM spermidine。
- **失活或抑制:** 70°C加热10分钟可使T3 RNA Polymerase失活。加入适量EDTA 也可以使T3 RNA Polymerase失活。螯合剂、浓度大于150mM的钠、钾或铵盐可以显著抑制T3 RNA Polymerase的活性。
- **T3的consensus promoter sequence如下:**
 -15 -10 -5 +1 +5
 AATTAACCCTCACTAAAGGGAGA

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
D7066-1	T3 RNA Polymerase (20U/μl)	500U
D7066-2	Transcription Buffer (5X)	0.2ml
—	说明书	1份

保存条件:

-20°C保存。

注意事项:

- 酶使用时宜存放在冰盒内或冰浴上, 使用完毕后宜立即放置于-20°C保存。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明:

RNA合成:

- DNA模板经限制性核酸内切酶酶切线性化。
- 酚/氯仿抽提DNA, 用乙醇沉淀后, 溶于适量的无菌去离子水中。本步骤也可以使用适当的DNA纯化试剂盒, 例如碧云天的DNA纯化试剂盒(D0033), 直接进行纯化, 从而免去了酚氯仿抽提和乙醇沉淀这些步骤。
- 参考如下表格设置反应体系:

Transcription Buffer (5X)	10μl
NTP Mixture (10mM each)	10μl
线性DNA模板	1μg
Ribonuclease Inhibitor	50U
T3 RNA Polymerase	30U

补充经DEPC处理的去离子水	至50μl
----------------	-------

- d. 按上表设置好反应体系后，轻轻混匀(可以用移液器吹打混匀或用 Vortex 在最低速度轻轻混匀)，随后离心沉淀液体。
- e. 37°C 孵育 1~2 个小时。
- f. 加入 2μl 0.5M EDTA (pH 8.0)到反应体系中混匀或-20°C 冷却终止反应。
- g. 电泳分析转录产物，或通过其他适当方法鉴定转录的效率。

注意：

- a) 转录需在无 RNA 酶条件下进行。
- b) 反应体系需在室温条件下配置，4°C 有亚精胺(spermidine)存在时 DNA 可发生沉淀。
- c) 按以上反应条件，每 1μg 模板 DNA 可合成超过 10μg 的 RNA。
- d) 如果模板 DNA 的线形化不太完全，会导致转录出比预期长度更长的 RNA，同时使预期长度的转录本比例下降。
- e) 可根据实际情况按照比例放大或缩小上述反应体系。

放射标记RNA的合成：

- a. DNA模板经限制性核酸内切酶酶切线性化。
- b. 酚/氯仿抽提DNA，用乙醇沉淀后，溶于适量的无菌去离子水中。本步骤也可以使用适当的DNA纯化试剂盒，例如碧云天的DNA纯化试剂盒(D0033)，直接进行纯化，从而免去了酚氯仿抽提和乙醇沉淀这些步骤。
- c. 参考如下表格设置反应体系：

Transcription Buffer (5X)	4μl
3 NTP Mixture (10mM each , without CTP)	1μl
100μM CTP	2.4μl
[α- ³² P]-CTP, ~30TBq/mmol(800Ci/mmol)	1.85MBq(50μCi)
线性DNA模板	0.2~1μg
Ribonuclease Inhibitor	20U
T3 RNA Polymerase	20U
补充经DEPC处理的去离子水	至20μl

- d. 37°C 孵育 1~2 个小时。
- e. -20°C 冷却终止反应。
- f. 分析和检测 RNA 的标记效率。

注意：

- a) 按以上方法合成的 RNA 活性一般为 3-5 x10⁸ dpm/μg。
- b) 上述标记反应中也可以使用 [³²P]、[³⁵S]或 [³H]标记的其他 NTP。使用其他放射性标记的 NTP 时，其他的 NTP 需作相应调整。20μl 反应体系各成分推荐使用剂量分别为：1.85MBq (50μCi) 5'-[α-³²P]-CTP, ~30TBq/mmol(800Ci/mmol); 11.1MBq (300μCi) 5'-[α-³⁵S]-UTP, >37TBq/mmol (>1000Ci/mmol); 0.925MBq (25μCi) 5,6-[³H]-UTP, 1.1-2.2TBq/mmol (30-60Ci/mmol)。
- c) 放射性标记NTP浓度低于12μM时，全长转录本合成效率也会下降。

其它用途可以参考上述用途或相关文献资料进行。

使用本产品的文献：

1. Lv Y, Ren L, Fu Y, Huang K, Bi J.Role of β -1,3-galactosyltransferase 2 in trigeminal neuronal sensitization induced by peripheral inflammation.Neuroscience . 2017 May 4;349:17-26.

Version 2021.09.01