



碧云天生物技术/Beyotime Biotechnology
 订货热线: 400-168-3301或800-8283301
 订货e-mail: order@beyotime.com
 技术咨询: info@beyotime.com
 网址: http://www.beyotime.com

T7 RNA Polymerase

产品编号	产品名称	包装
D7069	T7 RNA Polymerase	1000U

产品简介:

- T7 RNA Polymerase, 即T7 RNA聚合酶, 是一种高度特异识别T7启动子序列的DNA依赖的5'→3' RNA聚合酶。T7 RNA Polymerase可以催化单链或双链DNA T7 启动子下游NTP的掺入, 合成与T7启动子下游的模板DNA互补的RNA。
- **特点:** T7 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T7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T7 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 T7 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T7 RNA Polymerase失活。加入适量EDTA 也可以使T7 RNA Polymerase失活。螯合剂、浓度大于150mM的钠、钾或铵盐可以显著抑制T7 RNA Polymerase的活性。
- **T7的consensus promoter sequence如下:**
 -15 -10 -5 +1 +5
 TAATACGACTCACTATAGGGAGA

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
D7069-1	T7 RNA Polymerase (20U/μl)	1000U
D7069-2	Transcription Buffer (5X)	0.4ml
—	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:

1. 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
T7 RNA Polymerase	30U

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

- 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 2 μ l 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 1 μ g 模板 DNA 可合成超过 10 μ g 的 RNA。
- d) 如果模板 DNA 的线性化不太完全，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。

2. 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)	4 μ l
3 NTP Mixture (10mM each , without CTP)	1 μ l
100 μ M CTP	2.4 μ l
[α - ³² P]-CTP, ~30TBq/mmol(800Ci/mmol)	1.85MBq(50 μ Ci)
线性DNA模板	0.2~1 μ g
Ribonuclease Inhibitor	20U
T7 RNA Polymerase	20U
补充经DEPC处理的去离子水	至20 μ l

- 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/ μ g。
- 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。20 μ l 反应体系各成分推荐使用剂量分别为：1.85MBq (50 μ Ci) 5'-[α -³²P]-CTP, ~30TBq/mmol(800Ci/mmol); 11.1MBq (300 μ Ci) 5'-[α -³⁵S]-UTP, >37TBq/mmol (>1000Ci/mmol); 0.925MBq (25 μ Ci) 5,6-[³H]-UTP, 1.1-2.2TBq/mmol (30-60Ci/mmol) 。
- c) 放射性标记NTP浓度低于12 μ M时，全长转录本合成效率也会下降。

3. 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. Zhang ZY, Lu YX, Zhang ZY, Chang YY, Zheng L, Yuan L, Zhang F, Hu YH, Zhang WJ, Li XN1. Loss of TINCR expression promotes proliferation, metastasis through activating EpCAM cleavage incolorectal cancer. Oncotarget. 2016 Apr 19;7(16):22639-49.

Version 2016.11.01