

T3 RNA Polymerase

产品编号	产品名称	包装
R7009S	T3 RNA Polymerase	1KU
R7009M	T3 RNA Polymerase	5KU
R7009L	T3 RNA Polymerase	25KU
R7009XL	T3 RNA Polymerase	100KU

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不仅可以进行常规的RNA合成, 还可以识别修饰的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。
- 碧云天生产的T3 RNA Polymerase以带有T3 Promoter的线性化质粒DNA为模板进行转录时的效果参见图1。

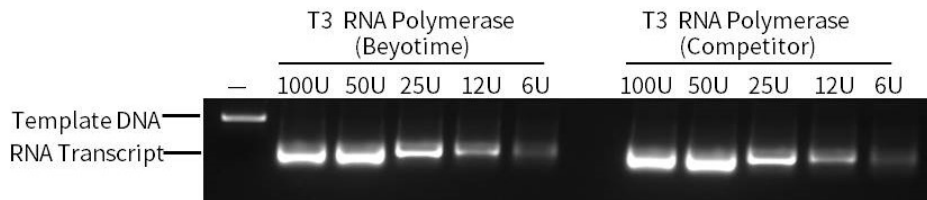


图1. 碧云天生产的 T3 RNA Polymerase 与同类产品(Competitor)以带有 T3 Promoter 的线性化质粒 DNA 为模板进行体外转录时的效果图。在 20 μ l 反应体系(40mM Tris-HCl, pH7.9, 2mM Spermidine, 6mM MgCl₂, 1mM DTT)中, 加入 0.2 μ g 线性化质粒 DNA, 以及图中指定量的本产品或 N 公司(Competitor)的 T3 RNA Polymerase, 37 $^{\circ}$ C 孵育 2h, 70 $^{\circ}$ C 孵育 10min 终止反应, 加入 2U DNase I (D7073), 37 $^{\circ}$ C 孵育 15min 消化模板 DNA, 得到的 RNA 转录产物为 221nt。取出 5 μ l 反应产物, 加入 5 μ l 2X RNA Loading Buffer, 70 $^{\circ}$ C 变性 10min, 然后进行 1%琼脂糖凝胶电泳, 用 1X TAE 作为电泳液, 170V 电泳 5min, 染色后拍照观察结果。如图所示, 本产品与 N 公司的产品相比, 具有相近或略优的转录效果。

- **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 $^{\circ}$ 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, 20 μ g/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 (pH7.9, 25 $^{\circ}$ C), 100mM NaCl, 1mM DTT, 1mM EDTA, 50% (v/v) Glycerol, 0.1% (w/v) Triton X-100。
- **Transcription Buffer (10X):** 400mM Tris-HCl (pH7.9, 25 $^{\circ}$ C), 20mM spermidine, 60mM MgCl₂, 10mM DTT。**失活或抑制:** 70 $^{\circ}$ 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 consensus promoter sequence如下, 其中的G为转录的第一个碱基。
AATTAACCCTCACTAAAGGGAGA

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
R7009S-1	T3 RNA Polymerase (50U/ μ l)	20 μ l
R7009S-2	10X T3 Transcription Buffer	25 μ l
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
R7009M-1	T3 RNA Polymerase (50U/ μ l)	100 μ l

R7009M-2	10X T3 Transcription Buffer	120μl
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
R7009L-1	T3 RNA Polymerase (50U/μl)	500μl
R7009L-2	10X T3 Transcription Buffer	600μl
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
R7009XL-1	T3 RNA Polymerase (50U/μl)	2.0ml
R7009XL-2	10X T3 Transcription Buffer	1.2ml×2
—	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浴内或冰浴上，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：

- 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：

10X T3 Transcription Buffer	2μl
NTP Mixture (10mM each)	4μl
线性DNA模板	0.2-1μg
Ribonuclease Inhibitor (40U/μl)	0.5μl
T3 RNA Polymerase (50U/μl)	0.8-2μl U
补充经DEPC处理的去离子水	至20μl

- 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：

10X T3 Transcription Buffer	2μl
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 (40U/μl)	0.5μl
T3 RNA Polymerase (50U/μl)	1μl

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 $3-5 \times 10^8$ 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。

3. 生物素标记、地高辛标记等其它用途可以参考上述用途或相关文献资料进行。

相关产品:

产品编号	产品名称	包装
R0102-2kU	RNase Inhibitor	2000U
R0102-10kU	RNase Inhibitor	10000U
R0102-50kU	RNase Inhibitor	50000U
R0107	氧钒核糖核苷复合物(RNase抑制剂)	2ml
R0108	氧钒核糖核苷复合物(RNase抑制剂)	10ml
R7070S	<i>E.coli</i> Poly(A) Polymerase	100U
R7070M	<i>E.coli</i> Poly(A) Polymerase	500U
R7070L	<i>E.coli</i> Poly(A) Polymerase	2.5KU
R7070XL	<i>E.coli</i> Poly(A) Polymerase	10KU
R7075	Poly(A) Polymerase Tailing Kit	50次
R0021	DEPC水(DNase、RNase free)	100ml
R0022	DEPC水(DNase、RNase free)	500ml
D7062	SP6 RNA Polymerase	500U
D7066	T3 RNA Polymerase	500U
D7069	T7 RNA Polymerase	1000U
D0033	PCR纯化试剂盒/DNA纯化试剂盒	50次
D0041S	BeyoMag™磁珠法PCR/DNA纯化试剂盒	50次
D0041M	BeyoMag™磁珠法PCR/DNA纯化试剂盒	200次
D7006	T4 DNA Ligase	40,000U
D7008	T4 DNA Ligase	200,000U
D7035	Klenow Fragment	100U
D7073	DNase I	200U
D7076	DNase I	1000U
D7378-250μl	ATP (100mM, Nuclease free)	250μl
D7378-1ml	ATP (100mM, Nuclease free)	1ml
D7378-5ml	ATP (100mM, Nuclease free)	5ml
D7379-250μl	CTP (100mM, Nuclease free)	250μl
D7379-1ml	CTP (100mM, Nuclease free)	1ml
D7379-5ml	CTP (100mM, Nuclease free)	5ml
D7380-250μl	GTP (100mM, Nuclease free)	250μl
D7380-1ml	GTP (100mM, Nuclease free)	1ml
D7380-5ml	GTP (100mM, Nuclease free)	5ml
D7381-250μl	UTP (100mM, Nuclease free)	250μl
D7381-1ml	UTP (100mM, Nuclease free)	1ml
D7381-5ml	UTP (100mM, Nuclease free)	5ml
D7383-1ml	NTP set (100mM each, Nuclease free)	4×250μl
D7385-500μl	NTP Mix (10mM each, Nuclease free)	500μl
D7385-2ml	NTP Mix (10mM each, Nuclease free)	2ml

D7387-250µl	NTP Mix (25mM each, Nuclease free)	250µl
D7387-1ml	NTP Mix (25mM each, Nuclease free)	1ml

Version 2021.08.18