

M5 HiPer T7 In Vitro Transcription Kit

T7 体外转录试剂盒

使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 HiPer T7 In Vitro Transcription Kit	20T	MF384-01
M5 HiPer T7 In Vitro Transcription Kit	100T	MF384-05

【储存条件】

长期保存，请置于-20°C，有效期 12 个月。使用后请及时放入-20°C 保存以保证酶的活性。

【产品组分】

	MF384-01	MF384-05
2xT7 In Vitro Transcription Mix	0.2ml	1ml
Nuclease-free Water	1ml	2x1ml

【产品简介】

本试剂盒是基于 T7 RNA 聚合酶的 RNA 体外转录试剂盒，它利用含有 T7 启动子的模版 DNA，以 NTP 为底物，从 T7 启动子下游开始合成与模版 DNA 中一条链互补的 RNA，简单快速获得大量的 RNA 分子。它具有下列特点：

1. 即开即用，用户只需提供含 T7 启动子的 DNA 模板即可以进行体外转录实验不需要单独准备每一个成份。
2. 单溶液预配液，减少加样次数，避免了操作误差，增加了可重复性。
3. 模版 DNA 可以是线性化的质粒 DNA，也可以是 PCR 扩增产物。
4. 可以合成的 RNA 的最佳长度在 20nt 到 2000nt 之间。
5. 产品配方经过精心优化，每 1 μ g DNA 模版可以合成 2~6 μ g RNA。
6. 得到的 RNA 可用于 RNA 结构研究、体外翻译、RNA 蛋白质相互作用、反义技术、SELEX 和 RNA 干扰 (RNAi) 等实验。

【注意事项】

1. 由于涉及 RNA 操作，需要严格按照 RNA 操作的规范进行，避免 RNase 污染，相关试剂和耗材需要经过 DEPC 处理以去除 RNase 或者确保是 RNase free 的。
2. 如果希望合成加帽的 RNA，须自备 Cap analog，如 m7(3'-O-methyl)-G(5')ppp(5')G 等。
3. 如果希望合成生物素、地高辛、FITC、Cy3 等标记的 RNA 或带有特殊修饰的 RNA，相应的修饰 NTP 需要自备。

【自备试剂】

Tris 饱和酚、氯仿、RNase-free 75%乙醇。

【操作步骤】

一、制备 DNA 模板（本试剂盒不含所需试剂，此处信息仅供参考）

PCR 片段和质粒 DNA 都可以用作体外转录的模板，但是必须注意以下几点：

A、必须使用线性化的 DNA。如果是质粒 DNA，则必须先用适当的限制性内切酶切成线状。

B、需要转录的 DNA 序列的上游必须有 T7 启动子。如果模板是 PCR 产物，则可以在设计引物时将 T7 启动子序列 5'TAA TAC GAC TC A CTA TAG GG 3'加上。如果是将 DNA 片段克隆到载体上，则需要选择有 T7 启动子的载体，并且克隆位点必须位于 T7 启动子下游。

C、需要转录的 DNA 序列下游端最好不要是 3'突出。如果是 3'突出（比如选择 Pst I 来线性化质粒），则最好用 T4 DNA 聚合酶修平。

D、必须保证 DNA 模板中没有 RNase。由于提取质粒 DNA 的过程中一般要使用大量的 RNase A，因此质粒 DNA 一般都有严重的 RNase A 污染，所以在用作模板前，最好采取胶回收的方法纯化质粒 DNA。并且加入少量总 RNA 一起保温然后电泳检测 RNA 是否被降解，以此来判断纯化的 DNA 模板是否有残留 RNase A。如果有 RNase 污染，则必须反复酚氯仿抽提去除残留的 RNase 然后再乙醇沉淀质粒 DNA。

二、体外转录反应

1. 如果有 N 个样品，强烈建议做一个阴性对照，故共设置 N+1 个反应，这样一起并排电泳时容易判断哪个条带是模板 DNA，哪个条带是转录扩增得到的 RNA。在 N+1 个 RNase-free 的塑料离心管中，在室温下（不是在 4°C 下）按次序加入下列成分：

注意：2x T7 In Vitro Transcription Mix 容易产生结晶，沉淀一定要握在手中直到结晶彻底溶解并摇匀后方可使用。

成分	N 个样品管	阴性对照管
DNA 模板	100-500ng 左右的 PCR 片段或线状质粒	-
2xT7 In Vitro Transcription Mix	各 10 μ L	10 μ L
Nuclease-free Water	至 20 μ L	至 20 μ L

注意：此为 20 μ L 反应体系的用量，对其他反应体系，各成分的用量可以按比例增减。本产品的 2xT7 In Vitro Transcription Mix 已经含有 NTP。如果需要标记 RNA 探针或制备带帽 RNA，则需要订购 NTP 分开的试剂盒。

2. 37°C 保温 2-12 小时

注意：延长保温时间并不能大幅提高产量。

3. 加入 2 μ L 自备的 500mM 的 EDTA 溶液灭活 T7 RNA 聚合酶。

4. 取 5 μ L 电泳，此时最好加上一个 DNA 模板做电泳对照。电泳时比阴性对照多出的条带就是转录扩增得到的 RNA，由于合成的 RNA 长度不均匀，即使长度均匀，但由于自身形成发夹结构，泳动速度也不一致，所以电泳所得 RNA 条带一般都不是清晰单一条带，而是比较弥散的电泳条带。但由于 RNA 是单链，分子量比同样长度的 DNA 小一倍，因此 RNA 一般比其双链 DNA 模板电泳速度更快。

5. 定量，可以用自备的单链 RNA 定量试剂盒检测浓度。不推荐使用电泳定量。使用本试剂盒时 1 μ g 的 DNA 模板一般可以合成 2-6 μ g 的 RNA。

6. 得到的 RNA 可以放 80°C 保存。如需去除 DNA 模板，请按下面步骤操作。

三、去除 DNA 模板（所需试剂需要另购）

1. 在 20 μ L 体积的体外转录体系中加入 2 μ L 的 10 \times DNase I Buffer 和 1 μ L 自备的 RNase-free DNase I 3-5U/ μ L。

2. 37°C 保温 30 分钟。

3. 补 RNase-free 水到 100 μ L。增加体积可以减少样品的丢失。

4. 用自备的等体积 100 μ L 的 Tris 饱和酚和氯仿震荡混匀后 14000g 离心 3 分钟将上清转移到新的离心管中。此步去除 DNase 和 RNA 聚合酶。
 5. 加自备的 200 μ L 无水乙醇和 10 μ L 3M 的乙酸钠溶液 (pH5.2)，振荡后 14000rpm 离心 20 分钟，RNA 形成沉淀，弃上清。
 6. 在沉淀中加入 1mL 75%乙醇，震荡 10 秒后 14000g 离心 5 分钟，弃上清。
 7. 短暂离心数秒，用枪头吸弃上清。不要丢失沉淀。
 8. 晾干，所得沉淀即体外转录所得的 RNA。
- 去除 DNA 模板也可以用 PCR 产物纯化回收试剂盒。

【常见问题】

1. 没有 RNA 产物。

可能原因是模板有 RNase 污染，可用纯化好的 RNA 跟模板 DNA 一起保温再电泳，再检测其是否有污染。

2. RNA 产量低。

可能原因是 DNA 模板序列导致。在转录序列的第一个和第二个碱基最好都是 G，在前 14 个碱基内避免有 U 存在。

3. RNA 长度比预期的短。

可能是模板序列中有 T7 RNA 聚合酶的终止序列。

4. RNA 长度比预计的长。

T7 RNA 聚合酶跟 Taq DNA 聚合酶一样，有不依赖于模板的加尾功能，最多有一半的 RNA 可以带一个或两个碱基的尾巴。如果 RNA 长度比预计的长很多，使用的模板又是质粒 DNA，则可能是质粒线性化不彻底。

5. 5'单磷酸还是三磷酸？

如果使用 GTP，则得到的 RNA 是三磷酸，体外转录时如果保温时间太长（如 12 小时），则有 50% 的三磷酸会变成单磷酸。如果在转录体系中加入 GMP，则 T7 RNA 聚合酶将优先使用 GMP，所得 RNA 产物中 5'端是单磷酸的比例将大大增加。

6. 用体外转录试剂盒如何得到带帽 RNA？

需加入带帽 NTP 类似物即可。

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。