T7 RNA聚合酶

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： 37ºC 60分钟内，催化1nmolAMP 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 25ºC)，30mM MgCl2，50mM DTT，50mM NaCl，10mM spermidine。

失活或抑制： 70ºC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 promotersequence如下：

- 15　- 10　-5　+1　+5

TAATACGACTCACTATAGGGAGA

包装清单：

产品编号	产品名称	包装
S10125- 1	T7 RNA Polymerase (20U/μl)	1000U
S10125-2	Transcription Buffer (5X)	0.4ml
—	说明书	1份

保存条件：

-20ºC保存。

注意事项：

1. 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-20ºC保存。

2.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。

3.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，例如源叶的DNA纯化试剂盒，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)	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. 37ºC 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-20ºC 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，4ºC 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。

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，例如源叶的DNA纯化试剂盒，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
T7 RNA Polymerase	20U
补充经DEPC处理的去离子水	至20μl

d. 37ºC 孵育 1~2 个小时。

e. -20ºC 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。

保存条件 -20℃,避免反复冻融，12个月