

T7 High Efficiency Transcription Kit (N1-me-Pseudo UTP)

T7高效体外转录试剂盒 (N1-甲基-假尿苷三磷酸)

使用前请仔细阅读说明书

目录号: JT102

版本号: Version 1.0

保存: -18℃及以下保存一年。

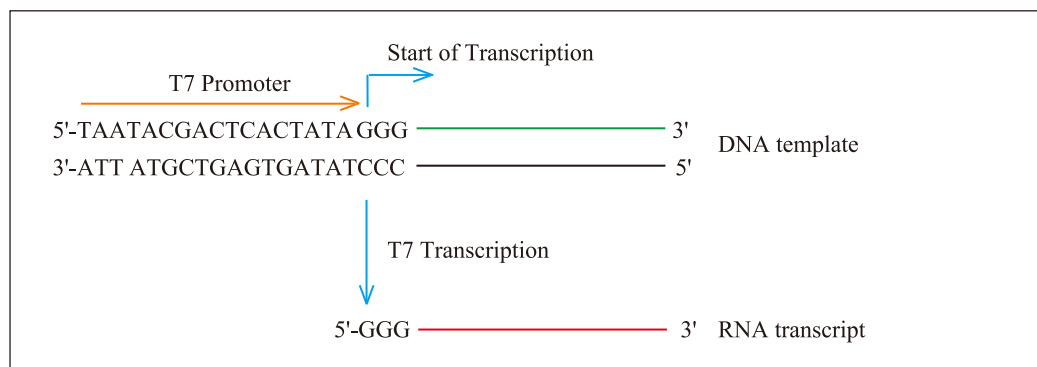
产品说明

T7 High Efficiency Transcription Kit (N1-me-Pseudo UTP)试剂盒优化了体外转录反应, 利用T7 RNA polymerase, 以及修饰核苷酸 (N1-me-Pseudo UTP), 以含有T7启动子的超螺旋质粒DNA或者线性DNA为模板, 对T7启动子下游的DNA序列进行高效转录。此试剂盒可以高效地获得N1-me-Pseudo UTP修饰的RNA产物, 可以减少宿主细胞的免疫反应。本试剂盒适用于大量制备长度100-6000 nt的RNA, 每20 μ L体系可以产生120~180 μ g的RNA。利用本产品, 也可以放大反应体系以获得毫克级的RNA。制备的RNA可用于体外翻译、RNase保护实验、RNA剪切以及杂交探针标记等。

试剂盒组成

Component	JT102-01 (25 rxns)	JT102-02 (100 rxns)
T7 Transcription Enzyme Mix	50 μ l	200 μ l
5 $\times$ T7 Transcription Reaction Buffer	100 μ l	400 μ l
ATP (100 mM)	40 μ l	160 μ l
GTP (100 mM)	40 μ l	160 μ l
CTP (100 mM)	40 μ l	160 μ l
N1-me-Pseudo UTP (100 mM)	40 μ l	160 μ l
DNase I (1 unit/ μ L)	50 μ l	200 μ l
500 mM EDTA (pH 8.0)	25 μ l	100 μ l
RNase-free Water	1 ml	4 $\times$ 1 ml
Transcription Control Template (0.5 μ g/ μ L, 产物约1 k)	10 μ l	40 μ l

T7 RNA Polymerase转录原理



模板制备

1、超螺旋质粒DNA

超螺旋质粒需要有一个T7启动子、建议可以加120 bp的poly A尾序列、以及一个有效终止转录的终止子, 常见载体的T7 terminator的终止效率不足70%, 转录反应会产生较多通过终止子的转录产物。推荐以下序列组成的转录终止子。



Transcription template

T7 Promoter

poly A tail

Terminator

T7 Promoter: 5'-TAATACGACTCACTATAG*GG-3' (*: G是RNA转录的第一个碱基)

Terminator: 5'-TTCCATCTGTTTTCTTATCTGTTCTTTTCATCTGTTCTTTTATCTGTTTGTTC 3'

2、线性DNA

一般是经限制性内切酶酶切的质粒或者PCR产物。**线性DNA**作为转录模板时要避免出现3'突出端，因而一般选择形成5'突出端或者平末端产物的限制性内切酶。如果无法避免出现3'突出端，模板DNA在转录前需要用T4 DNA Polymerase处理成平端。酶切产物或PCR产物需要纯化去掉蛋白质、盐离子等以获得高质量的DNA作为模板。

3、模板用量

本试剂盒推荐的反应体系适用于大多数模板的反应，1 μg的模板投入量可以产生150~210 μg的RNA；然而，具体产量会因不同模板的长度、纯度、序列和结构而异。对于大多数转录反应，可通过增大模板投入量及延长反应时间获得更大产量。

模板用量	RNA 产量
2 μg	180~210 μg
1 μg	150~210 μg
500 ng	100~190 μg
200 ng	30~80 μg

注意事项

- 避免RNase污染：请务必使用RNase-free的水、移液枪头和离心管，操作过程穿戴实验服和手套。
- 请在室温下配制反应：本试剂盒5×T7 Transcription Reaction Buffer在低温条件下盐浓度高导致盐析出从而影响模板DNA以及酶活性，因此配制反应体系时除了酶、NTP需放在冰上暂存，其他组分均置于室温，并在室温条件下配制反应。
- 注意加样顺序，请预先计算好体积，严格按照以下顺序加入各反应组分：水→Buffer→NTP→DNA模板→酶，模板和酶一定要最后加入。
- 对于< 500 nt的短片段转录建议使用2 μg模板，对于100 nt左右超短片段建议使用2 μg模板并延长反应时间至6小时以上，过夜16小时反应可得到最大产量。
- 若转录时间需达到6小时以上甚至更久，可使用2 μg模板并将NTP浓度提高至10 mM。

操作流程

1. 除了T7 Enzyme Mix之外，将其余组分短暂离心并收集于管底。
2. 配制转录反应：

Component	Volume
DNA Template	500 ng~2 μg
5× T7 Transcription Reaction Buffer	4 μl
ATP	1.6 μl
GTP	1.6 μl
CTP	1.6 μl
N1-me-Pseudo UTP (100 mM)	1.6 μl
T7 Transcription Enzyme Mix	2 μl
RNase-free Water	Variable
Total Volume	20 μl

*注意：提前计算好体系，按照先加水，然后严格按照以下顺序加入各反应组分：水→Buffer→NTP→DNA模板→酶。

3. 移液枪轻轻混匀各组分并短暂离心收集于管底，37℃孵育2小时。

*注意：为避免长时间转录反应导致反应液挥发，建议在PCR仪中进行反应并将热盖温度设置为65℃。模板及孵育时间可适当调整。



4. 消化DNA模板：反应结束后，加入2 μ l DNase I，37°C反应30分钟；结束后加入1 μ l 500 mM EDTA (pH 8.0)终止反应（加入EDTA后应立即进行后续纯化），或者消化完成后不加入EDTA，直接进入纯化步骤。
5. 产物纯化：请参考EasyPure® RNA Purification Kit（ER701）或MagicPure™ RNA Beads（EC501）说明书。
6. 转录产物定量、检测：
 - ① 通过紫外分光光度计测定RNA浓度，产物浓度极高，建议稀释后再测。
 - ② 100~1000 nt的RNA产物推荐使用6%丙烯酰胺、7 M尿素变性胶检测，电泳缓冲液为1×TBE Buffer。
 - 10×TBE Buffer：0.9 M Tris Base、0.9 M Boric Acid、20 mM EDTA。
 - 凝胶配制方法：每10 ml中，尿素4.2 g，RNase-free Water 4.4 ml，40%（丙烯酰胺:甲叉双丙烯酰胺=19:1）丙烯酰胺1.5 ml，10×TBE Buffer 1 ml，10% AP 100 μ l，TEMED 10 μ l。AP和TEMED在尿素完全溶解后加入。
 - ③ 500~6000 nt的RNA产物推荐用1%甲醛琼脂糖变性胶检测，电泳缓冲液为1×MOPS Buffer。
 - 10×MOPS Buffer：0.4 M MOPS (pH 7.0)、0.1 M Sodium Acetate、10 mM EDTA。
 - 凝胶配制方法：每100 ml中，称量1 g琼脂糖加入72 ml RNase-free Water中，加热溶化后，加入10 ml 10×MOPS Buffer。待溶液冷却至50~60°C时，加入18 ml甲醛（37%），混匀，倒胶。
 - ④ 电泳检测时，取0.2~1 μ g RNA，用RNase-free Water稀释至5 μ l，加入等体积的2×RNA Loading Buffer混匀，70°C孵育10分钟后冰浴2分钟，全部点样。电泳结束后用Gelstain或EB染色观察。RNA Marker与RNA样品处理方法相同（或参考供应商使用说明书）。

常见问题&解决方案

1. 转录产量低或转录失败

模板质量与RNA产量密切相关，建议设立对照组。若对照组产量低，请联系北京全式金客服，对反应体系配制进行指导；若对照组产量正常但实验组产量低，可能实验组模板本身存在质量问题，建议尝试以下解决方案：①模板可能存在抑制反应的成分，请重新纯化模板，模板DNA应为RNase-free、高纯度；②确定模板定量及其完整性；③延长转录反应时间；④加大模板投入量；⑤尝试其它的启动子和RNA聚合酶。

2. 转录产物电泳出现拖尾现象

可能由以下原因导致：①实验操作过程被RNase污染；②转录模板被RNase污染。

建议重新制备模板DNA，实验用到的耗材及试剂应为RNase-free级别，实验操作中佩戴口罩及一次性乳胶手套，注意RNase污染控制。

3. 转录产物长度大于预期

若电泳显示产物条带大于预期，可能由以下原因导致：①模板没有完全线性化；②有义链3'端为突出结构；③产物RNA存在未完全变性的二级结构。

建议以下解决方案：①检查模板是否完全线性化，需保证线性化完全；②选择合适的限制性内切酶，确保有义链5'端为突出结构或双链为平末端；③检查模板结构，用变性胶检测RNA产物。

4. 转录产物长度小于预期

若电泳显示产物条带小于预期，可能原因有：①模板序列中含有类似T7 RNA聚合酶的转录终止子序列，导致转录提前终止；②模板序列GC含量高而形成高级结构；③RNase污染。

若模板含终止子序列，建议优化RNA序列；若模板GC含量高，可尝试加入SSB蛋白以提高产量和转录长度。

5. 短片段转录产量低

转录片段太短会抑制反应，当转录长度 < 500 nt时，请延长反应时间并增加模板投入量，建议使用2 μ g模板，对100 nt超短片段的转录建议使用2 μ g模板并反应至少6小时，过夜转录16小时可获得最大产量。

6. 本试剂盒仅供科研或生产使用，不可直接使用于人体。

本产品仅供研究，不用于临床诊断。

版本号: V1.0-202601

服务电话 +86-10-57815020

服务邮箱 complaints@transgen.com

