InviTrans T7 体外转录试剂盒（Low dsRNA）

InviTrans T7 In Vitro Transcription Kit（Low dsRNA）

Code No. AG51202

包装量：	50 rxns / 20 μl
保存温度：	−20 ℃

➢ 产品概述

本产品是大肠杆菌重组表达来源的噬菌体 T7 RNA 聚合酶，是对野生型 T7 进行了改造优化，突变得到的可以大幅度降低 dsRNA 含量的 T7 RNA 聚合酶。以带有 T7 启动子的线性化质粒 DNA、PCR 产物或化学合成的 DNA 片段等为模板（T7 启动子序列“TAATACGACTCACTATA”），以 NTP 为底物，T7 RNA Polymerase 从 T7 启动子序列下游开始合成 RNA。本产品每个反应体系可合成 100 ~ 200 μg 的 RNA，转录合成的 RNA 产物可用于 RNA 结构与功能、RNA 酶保护、探针杂交、RNAi、显微注射、体外翻译和 mRNA 疫苗等研究。

➢ 保存及运输

保存温度：-20℃保存

运输温度：干冰运输或-20℃冰袋运输

➢ 产品组成

10X In Vitro Transcription Buffer	100 μl
NTP Mix (25 mM each)	400 μl
T7 RNA Polymerase Mix(Low dsRNA)	100 μl
RNase free water	1 ml

➢ 注意事项

1. 请保持实验区域洁净，以避免核酸酶污染。
2. 实验所用的离心管、枪头等耗材均需 RNase-free 级别，以避免 RNase 污染。
3. T7 RNA Polymerase Mix（Low dsRNA）中甘油浓度较高，使用前短暂离心将所有的溶液收集至离心管底部，减少损失，并用移液器轻柔吸打混匀（避免起泡），然后再进行使用。
4. 10X In Vitro Transcription Buffer 使用前请充分溶解、混匀。
5. 所有反应混合液建议在冰上配制。

➢ 操作方法

A. 体外转录模板制备

含 T7 启动子的线性化质粒、PCR 扩增产物或化学合成的 DNA 片段均可作为模板：

1. 线性化质粒：向含有 T7 启动子的质粒载体中插入目的 DNA 片段，然后使用插入 DNA 片段中无识别位点的限制性内切酶对质粒进行线性化处理，线性化质粒需避免 3' 突出端。

▲注：线性化模板建议进行纯化后使用。

2. PCR 扩增产物：体外转录时需要确保模板 5' 端含有 T7 启动子序列，如果扩增用模板不含 T7 启动子序列，在设计引物时需要在上游引物的 5' 端添加 T7 启动子序列，同时为提升体外转录效率建议在 T7 启动子序列前增加保护碱基“TTC”（即保护碱基“TTC”+ T7 启动子序列“TAATACGACTCACTATA”），建议选择高保真酶扩增以确保扩增的准确性。

▲注：PCR 产物需要电泳确认条带的单一性，并建议进行纯化后使用。

3. 化学合成含有 T7 启动子序列的 DNA 片段作为体外转录的模板。

B. 体外转录

以步骤 A 制备的 DNA 片段作为模板进行体外转录反应。

1. 按照下表在冰上配制体外转录体系：

组分名称	反应终浓度	加入量
10X In Vitro Transcription Buffer	1X	2.0 μl
NTP Mix (25 mM each)	10 mM	8.0 μl
T7 RNA Polymerase Mix(Low dsRNA)	-	2.0 μl
DNA Template*1	-	1.0 μg
RNase free water	-	Up to 20 μl

*1：每个反应体系推荐加入 1 μg DNA 模板进行体外转录，可根据转录情况在 0.1 ~ 1.5 μg 范围内进行调整。

2. 体外转录反应程序：

温度	时间
37℃	2 h*2
4℃	Hold*3

*2：转录时间推荐 2 h，可根据实验需求在 1 ~ 8 h 的范围内进行调整，但转录小于 200 bp 的 RNA，建议转录时间延长至 4 h 或者更长时间。

*3：转录产物从仪器中取出后，需尽快进行后续实验操作，若无法及时进行后续的 **3.DNA 模板消化及 C.转录产物纯化及检测**，建议 -80℃ 暂存。

3. DNA 模板消化 (可选)：

转录反应完成后，如需进行 DNA 模板的去除，可加入 DNase Ⅰ以去除模板 DNA。

【推荐使用本公司的 DNase I (RNase Free) 试剂盒 (Code No. AG12001)；推荐 20 μl 的转录产物添加 2 μl DNase Ⅰ(5 U/μl)，37℃ 孵育15 min。】

C. 转录产物纯化及检测

1. 转录产物纯化：

转录产物可以采用磁珠法、柱式法、层析法、酚/氯仿纯化、氯化锂沉淀等方法进行纯化，以去除残留的蛋白。纯化后的 RNA 可进行下游实验或于 -80℃ 下暂存。

2. 转录产物检测：

转录产物浓度可能会很高，需要使用 RNase free water 稀释后再进行下述检测。

RNA 片段大小检测：电泳检测 RNA 产物的片段大小与质量。

RNA 浓度测定：使用酶标仪测定纯化后的 RNA 产物浓度，也可以使用 NanoDrop 微量分光光度计、Qubit 或其他等效仪器测定 RNA 产物浓度。

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。
For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc.