

T7 RNA 聚合酶 (高浓度) T7 RNA Polymerase (HC)

产品编号	产品名称	包装规格
NBS8251	T7 RNA Polymerase (HC) T7 RNA 聚合酶 (高浓度)	20000U (200U/ μ l)

产品简介:

本产品是大肠杆菌重组表达来源的噬菌体 T7 RNA 聚合酶，是一种依赖 DNA 的 RNA 聚合酶，对噬菌体 T7 启动子序列具有高度特异性。T7 RNA 聚合酶以含有 T7 启动子序列的双链 DNA 为模板，以 NTP 为底物，合成与启动子下游的单链 DNA 互补的 RNA。

产品组成:

组分	规格
T7 RNA Polymerase (HC) (200 U/ μ l)	100 μ l
10×T7 RNA Pol Buffer	1.25 ml

保存条件:

-20°C保存，2 年有效。

活性定义:

1 活性单位 (U) 是指在 37°C下，1 h 内使 1 nmol ATP 掺入酸不 溶物所需要的酶量。

内切酶活性:

37°C下，在 20 μ l T7 RNA Pol Buffer 反应体系中将 200 U T7 RNA Polymerase (HC) 与 200 ng 超螺旋质粒 DNA 共同温育 4 h 后，使用琼脂糖凝胶电泳检测，少于 20%的质粒 DNA 转变成缺刻或线性状态。

DNase 活性:

37°C下，在 20 μ l T7 RNA Pol Buffer 反应体系中将 200 U T7 RNA Polymerase (HC)

与 15 ng 双链 DNA 片段共同温育 16 h 后，使用琼脂糖凝胶电泳检测，双链 DNA 片段无变化。

RNase 活性：

37°C下，在 10 μl T7 RNA Pol Buffer 反应体系中将 200 U T7 RNA Polymerase (HC) 与 500 ng RNA 共同温育 1 h 后，使用琼脂糖凝胶电泳检测，不低于 90%的 RNA 仍保持完整。

宿主 DNA 残留：

采用中国药典 2020 版四部通则 3407 外源性 DNA 残留量测定法第三法定量 PCR 法，本品中大肠杆菌宿主细胞 DNA 残留量低于 10 拷贝/100 U。

使用方法：

1. 体外转录

① 在冰上配制如下反应体系：

试剂	建议加入量	调整范围	终浓度范围
10× T7 RNA Pol Buffer	2 μl	2 μl	1×
T7 RNA Polymerase (HC) (200 U/μl)	1 μl	1~2 μl	10~20 U/μl
Pyrophosphatase, Inorganic (yeast)(0.1 U/μl)	1 μl	0~1 μl	0~5 mU/μl
Murine RNase Inhibitor (40 U/μl)	1 μl	0.5~2 μl	1~4 U/μl
DNA Template	1 μg	0.5~2 μg	25~100 ng/μl
ATP/CTP/GTP/UTP (100 mM each) ^{a,b}	2 μl each	1~2 μl each	5~10 mM each
Nuclease-Free Water	up to 20 μl	up to 20 μl	-

a. 建议先加入 Nuclease-Free Water, 然后再加入 ATP/CTP/GTP/UTP.

b. 可以用同样摩尔浓度的修饰 NTP 替代相应的野生型。

② 充分混匀并瞬离后，37°C温育 2 h。若转录产物长度 < 300 nt，可延长反应时间至 3~16 h。

③ 反应结束后，向产物中加入 1~2 U DNase I-ST，37°C 孵育 15 min 以去除 DNA 模板。

④ 获得的 mRNA 经纯化，质检合格后用于后续实验或工艺。

2. 体外共转录

① 在冰上配制如下反应体系：

试剂	建议加入量	调整范围	终浓度范围
10× T7 RNA Pol Buffer	2 μ l	2 μ l	1×
T7 RNA Polymerase (HC) (200 U/ μ l)	1 μ l	1~2 μ l	10~20 U/ μ l
Pyrophosphatase, Inorganic (yeast)(0.1 U/ μ l)	1 μ l	0~1 μ l	0~5 mU/ μ l
Murine RNase Inhibitor (40 U/ μ l)	1 μ l	0.5~2 μ l	1~4 U/ μ l
DNA Template	1 μ g	0.5~2 μ g	25~100 ng/ μ l
ATP/CTP/GTP/UTP (100 mM each) ^{a,b}	2 μ l each	1~2 μ l each	5~10 mM each
Cap1 Analogue (100 mM) ^c	1.6 μ l	0.8~1.6 μ l	4~8 mM
Nuclease-Free Water	up to 20 μ l	up to 20 μ l	-

a. 建议先加入 Nuclease-Free Water, 然后再加入 ATP/CTP/GTP/UTP.

b. 可以用同样摩尔浓度的修饰 NTP 替代相应的野生型。

c. 帽子类似物与每种 NTP 的摩尔浓度之比应为 4 : 5 。

② 充分混匀并瞬离后, 37°C温育 2~3 h。若转录产物长度 < 300 nt, 可延长反应时间至 4~16 h。

③ 反应结束后, 向产物中加入 1~2 U DNase I-ST, 37°C 孵育 15 min 以去除 DNA 模板。

④ 获得的 mRNA 经纯化, 质检合格后用于后续实验或工艺。

注意事项：

- 不同模板序列的转录效率差异较大, 初次实验可先按照建议加入量进行, 然后在调整范围内摸索优化最适体系。
- 模板 DNA 可通过线性化环状质粒或 PCR 获得。模板 DNA 上游需含有 T7 启动子序列, 下游为平末端或模板链 5'末端突出。模板 DNA 的纯度对体外转录反应至关重要, 而质粒 DNA 抽提过程中引入的 RNase A 残留会显著影响转录 RNA 的质量, 建议使用 A260 /A280 为 1.8~2.0 的高纯度 RNase-free 模板。
- 酶溶液中均含有甘油, 建议体系中各种酶制品添加体积合计不应超过总反应体积的 1/5。
- 共转录反应速率一般为普通体外转录的 1/5~1/2。
- 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

体外转录相关产品：

产品编号	产品名称	包装规格
<u>NBS8250-S</u>	<u>T7 RNA Polymerase T7 RNA 聚合酶</u>	5000U(50U/ μ l)
<u>NBS8251</u>	<u>T7 RNA Polymerase (HC) T7 RNA 聚合酶 (高浓度)</u>	20000U (200U/ μ l)
<u>NBS8252-S</u>	<u>High T7 RNA Polymerase 热稳定 T7 RNA 聚合酶</u>	5000U(50U/ μ l)
<u>NBS8253</u>	<u>T7 High Yield RNA Synthesis Kit T7 高产体外转录试剂盒</u>	50rxns
<u>NBS8254-S</u>	<u>Poly(A) RNA Polymerase Poly(A) RNA 聚合酶</u>	100U(5U/ μ l)
<u>NBS8255-S</u>	<u>Pyrophosphatase, Inorganic (Yeast) 无机焦磷酸酶 (酵母)</u>	10U(0.1U/ μ l)