

T7 耐热 RNA 聚合酶 2.0

Cat.No.: A3603 Size: 5 KU

描述: T7 耐热 RNA 聚合酶 2.0 是一种经基因工程改造的 DNA 依赖性 RNA 聚合酶, 对 T7 噬菌体启动子 (TAATACGACT CACTATAG) 具有高度特异性, 跟野生型噬菌体 T7 RNA 聚合酶相比, 它可在更高的温度下进行体外转录。T7 耐热 RNA 聚合酶 2.0 可在 37-52°C 条件下进行高效的体外转录, 最佳温度为 37°C, 50°C 反应条件下, 仍然保留 50% 以上的活性 (野生型在此温度下无活性)。这种高温的反应特性有益于以下几个方面的实验: (1) 提升了 GC 含量较高 RNA 的转录效率; (2) 提升了长片段 RNA 的合成能力; (3) 在使用帽类似物时, 提高了共转录的加帽效率; (4) 减少了 dsRNA 副产物的形成, 降低了合成 RNA 的免疫原性。

组分

名称	5 KU	25 KU
T7 RNA Polymerase 2.0 (50 U/μl)	100 μl	500 μl
5X T7 Transcription Buffer	1 ml	1 mlX5

活性定义: 在标准反应体系下, 50°C 1 小时内将 1 nmol 的 ATP 掺入酸不溶物所需要的酶量定义为一个活性单位。

1X T7 Transcription Buffer: 40 mM Tris (pH 7.8), 20 mM NaCl, 18mM MgCl₂, 2 mM Spermidine HCl, 10 mM DTT
酶储存液: 10 mM Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 50% Glycerol, 0.01% (w/v) Triton X-100, pH 7.5。

储存: 置于-20°C 可保存 2 年, 避免反复冻融。

热失活: 75°C, 10min。

其它体外转录辅助试剂:

名称	货号
rNTP Mixture (25mM Each)	A0304
RNase Inhibitor (40U/μl)	D1101
RNaseFree Dnasel	D3001
热稳定无机焦磷酸酶	C5007
5minRNA纯化试剂盒	B0133
Poly(A) Polymerase (E.coli)	C1601

操作方法

1. 配制反应体系

5XT7 Transcription buffer	4 μl
rNTP Mixture (25 mM each)	3.2 μl
Linearized template DNA	0.2~1 μg
RNase Inhibitor (40U/μl)	0.5 μl
T7 RNA Polymerase 2.0 (50 U/μl)	1-2 μl
Rnase Free H2O	up to 20 μl

2. 50°C 孵育 1-3h。

3. 使用 RNaseFree Dnasel 去除 DNA 模板 (可选)
在体外转录反应结束后, 向上述 20μl 反应液中加入 5μl 的 10xRD Buffer 和 2μl RNaseFree Dnasel(10U/μl), 并加入 23μl 的 Rnase Free H2O 至 50μl, 37°C 孵育 15min。

4. 转录产物的纯化

体外转录产物可选用 5minRNA 纯化试剂盒进行柱式纯化, 以去除多余的盐、蛋白等杂质。也可以采用经典的 LiCl 沉淀法 (Protocol 可致电 HaiGene 索取)。

注意事项

1. 转录DNA模板的种类: 推荐使用含T7启动子的线性化质粒和PCR产物作为模板。
2. 转录模板的纯度会显著影响体外转录反应。在质粒DNA抽提过程中残留的RnaseA会显著影响转录RNA的质量。通过酚-氯仿抽提的质粒DNA为最佳模板。
3. 该酶对高浓度 NaCl 或 KCl 不耐受, 当其浓度高于 150mM 时, 其活性受到显著抑制 (~50%)。
4. 在 20μl 反应体系中加入 0.02U 热稳定无机焦磷酸酶可显著提高转录产量 (提高 25~50%)。