

描述: Hi T7 RNA Polymerase 对 T7 噬菌体启动子具有高度的特异性, 并可以其作为启动子, DNA 作为模板体外合成正义链。双链线性质粒 DNA、PCR 产物均可作为该酶的底物模板。

Hi T7 RNA 聚合酶经电子重构架及库筛选, 与 Wild 型比较来看, 在以下性能方面有明显提升: (1) 酶的 DNA 模板结合区域亲和力更高, 使其具有持续合成能力, 从而获得更高的产量, 并易于长片段 RNA 的合成。(2) 酶的耐热性能大幅提升, 在 37~45°C 下均可有效的工作, 高温的转录反应减少了 dsRNA 二级结构, 便于药用核酸的制备。该酶为重组纯化制品, 无 DNase 和 RNase 污染。

组分

名称	5 KU	25 KU
Hi T7 RNA Polymerase (100 U/μl)	50 μl	250 μl
10XHi T7 RNP Buffer	0.2 ml	1 ml

(1) 活性定义: 在标准反应体系下, 37°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。

(2) 1XHi T7 RNPBuffer 含 2 mM Spermidine, 6 mM Mg²⁺

(3) 酶保存液: 20 mM Tris-HCl, pH7.5, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 0.1% Tween20, 50%Glycerol。

(4) 置于-20°C 可保存 2 年, 反复冻融 20 次, 不影响性能。

(5) 热失活: 75°C, 10min。

需自备其它辅助试剂

货号	名称
A0304	rNTP Mixture (25 mM each)
D1102	RNase Inhibitor
D3001	Rnase Free DNase I
S2003	2xRNA Loading Buffer
S2004	7.5M LiCl溶液

操作方法

1. 配制反应体系

		1x 浓度
10XHi T7 RNPBuffer	2 μl	1 x
rNTP Mixture (25 mM each)	0.8 μl	1 mM
Linearized Template DNA	0.5-1 μg (0.2~0.4 pmol)	
RNase Inhibitor (40U/μl)	0.5 μl	1 U/μl
Hi T7 RNA Polymerase (100 U/μl)	1 μl	5 U/μl
DEPC-treated Water	up to 20 μl	

注意: 关于模板摩尔量计算: 以 4kb 的酶切质粒来计算, $1\mu\text{g} \div 340 \div 2 \div 4000 = 0.37 \times 10^{-6} \mu\text{mol}$, 即 0.37 pmol。

2. 37-45°C (推荐反应温度 37°C), 孵育 1-3h, 产量通常 20 μg。

3. 反应完毕后, 如需去除模板 DNA, 加入 2U DNase I 37°C 处理 10min。

注意事项

(1) Hi-T7 RNAP, 反应温度 37~45°C, 最佳反应温度 37°C。在 45°C 反应时, 通常产量会降低 30%, 但 RNA 的二级结构会显著减少。

(2) 推荐的转录时间, 37°C 条件下, 反应 2~3h(RNA 长度 <2knt); 1.5~2h (2knt < RNA 长度 <4knt); 1~1.5h (RNA 长度 >4knt)。过长的反应时间, 随仍能少量增加产物, 但可能会产生过多的短产物和 RNA 降解风险。

(3) 转录产物的电泳: 取 0.1μl 的转录产物 (约 200ng) 加入到 6 μl 的 2xRNA Loading Buffer (货号:S2003)中, 75°C 5min 后, 加入到 1~2.5%EB 琼脂糖(0.5xTBE)即可。

(4) 转录产物的纯化: 建议采用经典的 7.5M LiCl 溶液(货号:S2003)沉淀法, 以获得最高的回收效率。