

CAT#:GZ021001

---



# T7 转录试剂盒

T7 In Vitro Transcription

**使用手册 V2.1**

北生京泽（启东）生物科技有限公司  
江苏省南通市启东市启东经济开发区林洋路 500 号  
网址：[www.bsgeneze.com](http://www.bsgeneze.com)；电话：40001-59600

## 产品及特点

本试剂盒是基于 T7 RNA 聚合酶的 RNA 体外转录试剂盒,它利用含有 T7 启动子的模版 DNA,以 NTP 为底物,从 T7 启动子下游开始合成与模版 DNA 中一条链互补的 RNA,简单快速获得大量的 RNA 分子。它具有下列特点:

1. 即开即用,用户只需提供含 T7 启动子的 DNA 模板即可以进行体外转录实验不需要单独准备每一个成份。
2. 单溶液预配液,减少加样次数,避免了操作误差,增加了可重复性。
3. 模版 DNA 可以是线性化的质粒 DNA,也可以是 PCR 扩增产物。
4. 可以合成的 RNA 的最佳长度在 20nt 到 2000nt 之间。
5. 产品配方经过精心优化,每 1 $\mu$ g DNA 模版可以合成 2~6 $\mu$ g RNA。
6. 得到的 RNA 可以用于 RNA 结构研究、核酶生物化学、体外翻译、RNA 蛋白质相互作用、反义技术、SELEX 技术和 RNA 干扰 (RNAi) 等实验。
7. 本试剂盒足够 50 次 20 $\mu$ L 体系的体外转录实验并且只能用于科研。

## 成分规格

组成名称	规格
T7 转录预配液 2 $\times$	0.5mL
RNase-free 水	1mL

## 保存条件

-20 $^{\circ}$ C 保存,有效期为 12 个月。

## 使用方法

### 自备试剂

Tris 饱和酚、氯仿、RNase-free 75%乙醇。

### 一、制备 DNA 模板 (本试剂盒不含所需试剂,此处信息仅供参考)

PCR 片段和质粒 DNA 都可以用作体外转录的模板,但是必须注意以下几点。

- a) 必须使用线性化的 DNA。如果是质粒 DNA,则必须先用适当的限制性内切酶切

成线状。

- b) 需要转录的 DNA 序列的上游必须有 T7 启动子。如果模板是 PCR 产物，则可以在设计引物时将 T7 启动子序列 5' TAA TAC GAC TC A CTA TAG GG 3' 加上。如果是将 DNA 片段克隆到载体上，则需要选择有 T7 启动子的载体，并且克隆位点必须位于 T7 启动子下游。
- c) 需要转录的 DNA 序列的下游端最好不要是 3' 突出。如果是 3' 突出（比如选择了 Pst I 来线性化质粒），则最好用 T4 DNA 聚合酶修平。
- d) 必须保证 DNA 模板中没有 RNase。由于提取质粒 DNA 的过程中一般要使用大量的 RNase A，因此质粒 DNA 一般都有严重的 RNase A 污染，所以在用作模板前，最好采取胶回收的方法纯化质粒 DNA。并且加入少量总 RNA 一起保温然后电泳检测 RNA 是否被降解，以此来判断纯化的 DNA 模板是否有残留 RNase A。如果有 RNase 污染，则必须反复酚氯仿抽提去除残留的 RNase 然后再乙醇沉淀质粒 DNA。

## 二、体外转录反应

1. 如果有 N 个样品，强烈建议做一个阴性对照，故共设置 N+1 个反应，这样一起并排电泳时容易判断哪个条带是模板 DNA，哪个条带是转录扩增得到的 RNA。在 N+1 个 RNase-free 的塑料离心管中，在室温下（不是在 4°C 下）按次序加入下列成分，T7 转录预配液容易产生结晶，沉淀一定要握在手中直到结晶彻底溶解并摇匀后方可使用。

成分	N 个样品管	阴性对照管
DNA 模板	100-500ng 左右的 PCR 片段或线状质粒	-
2×T7 转录预配液	各 10μL	10μL
RNase-free 水	至 20μL	至 20μL

(注：此为 20 μL 反应体系的用量，对其他反应体系，各成分的用量可以按比例增减。本产品的 2× T7 转录预配液已经含有 NTP。如果需要标记 RNA 探针或制备带帽 RNA，则需要订购 NTP 分开的试剂盒。)

2. 37°C 保温 1-2 小时

(注意：延长保温时间并不能大幅提高产量。)

3. 加入 2 μL 自备的 500mM 的 EDTA 溶液灭活 T7 RNA 聚合酶。
4. 取 5 μL 电泳，此时最好加上一个 DNA 模板做电泳对照。电泳时比阴性对照多出

的条带就是转录扩增得到的 RNA，由于合成的 RNA 长度不均匀，即使长度均匀，但由于自身形成发夹结构，泳动速度也不一致，所以电泳所得 RNA 条带一般都不是清晰单一条带，而是比较弥散的电泳条带。但由于 RNA 是单链，分子量比同样长度的 DNA 小一倍，因此 RNA 一般比其双链 DNA 模板电泳速度更快。

5. 定量，可以用自备的单链 RNA 定量试剂盒检测浓度。不推荐使用电泳定量。使用本试剂盒时  $1\ \mu\text{g}$  的 DNA 模板一般可以合成  $2\sim 6\ \mu\text{g}$  的 RNA。
6. 得到的 RNA 可以放  $80^\circ\text{C}$  保存。如需去除 DNA 模板，请按下面步骤操作。

### 三、去除 DNA 模板（所需试剂需要另购）

1. 在  $20\ \mu\text{L}$  体积的体外转录体系中加入  $2\ \mu\text{L}$  的  $10\times\text{DNase Buffer}$  和  $1\ \mu\text{L}$  自备的 RNase-free DNase  $3\sim 5\text{U}/\mu\text{L}$ 。
2.  $37^\circ\text{C}$  保温 30 分钟。
3. 补 RNase-free 水到  $100\ \mu\text{L}$ 。增加体积可以减少样品的丢失。
4. 用自备的等体积  $100\ \mu\text{L}$  的 Tris 饱和酚和氯仿震荡混匀后  $14000\text{g}$  离心 3 分钟将上清转移到新的离心管中。此步去除 DNase 和 RNA 聚合酶。
5. 加自备的  $200\ \mu\text{L}$  无水乙醇和  $10\ \mu\text{L}$   $3\text{M}$  的乙酸钠溶液 ( $\text{pH}5.2$ )，振荡后  $14000\text{rpm}$  离心 20 分钟，RNA 形成沉淀，弃上清。
6. 在沉淀中加入  $1\text{mL}$   $75\%$  乙醇，震荡 10 秒后  $14000\text{g}$  离心 5 分钟，弃上清。
7. 短暂离心数秒，用枪头吸弃上清。不要丢失沉淀。
8. 晾干，所得沉淀即体外转录所得的 RNA。

去除 DNA 模板也可以用 PCR 产物纯化回收试剂盒。

### 问题解答

1. 没有 RNA 产物。

最常见原因是模板有 RNase 污染，可用纯化好的 RNA 跟模板 DNA 一起保温再电泳，再检测其是否有污染。

2. RNA 产量低。

最常见的原因是 DNA 模板。在转录序列的第一个和第二个碱基最好都是 G，在前 14 个碱基内避免有 U 存在。

3. RNA 长度比预期的短。

可能是模板序列中有 T7 RNA 聚合酶的终止序列。

#### 4. RNA长度比预计的长。

T7 RNA聚合酶跟Taq DNA聚合酶一样，有不依赖于模板的加尾功能，最多有一半的RNA可以带一个或两个碱基的尾巴。如果RNA长度比预计的长很多，使用的模板又是质粒DNA，则可能是质粒线性化不彻底。

#### 5. 5'单磷酸还是三磷酸？

如果使用GTP，则得到的RNA是三磷酸，体外转录时如果保温时间太长（如12小时），则有50%的三磷酸会变成单磷酸。如果在转录体系中加入GMP，则T7 RNA聚合酶将优先使用GMP，所得RNA产物中5'端是单磷酸的比例将大大增加。

#### 6. 用体外转录试剂盒如何得到带帽RNA？

需加入带帽NTP类似物即可。

## 关联产品

产品编号	产品名称
GZ070505-1	一步法 RT-PCR 扩增试剂盒
GZ020205-500	一步法 RT-PCR 扩增试剂盒（去除基因组）
GZ070101-500	GeneRed 核酸染料
GZ070102-500	Geneblue 核酸染料
GZ070104	6×Loading Buffer
GZ070105	50×TAE
GZ070106	10×TBE



关注京泽微信公众号  
了解更多产品资讯