

T7 RNA Polymerase (HC)

REF: EG25107S

储运条件

-20℃

产品组成

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

产品描述

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。

活性定义

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

质量控制

蛋白纯度

经 SDS-PAGE 凝胶电泳检测，蛋白检测纯度不低于 95%。

内切酶活性

37℃ 下，在 20 μl 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℃ 下，在 20 μl 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℃ 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：

组分	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℃ 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℃ 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：

组分	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
Cap1 Analogue (100 mM) ^c	1.6 μl	0.8~1.6 μl	4~8 mM
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。

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℃ 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℃ 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

1. 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。

2. 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。

3. 酶溶液中含有甘油，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。

4. 共转录反应速率一般为普通体外转录的 1/5~1/2。

5. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套及口罩进行实验操作。