

Ribo™ RNAmx-T7 生物素标记转录试剂盒使用说明

RN: R11074.2

产品介绍

Ribo™ RNAmx-T7 生物素标记转录试剂盒是人工重组改造后的 T7 RNA polymerase 和优化的反应体系组合得到的试剂盒。该试剂盒以 Biotin RNA Labeling Mix 为底物，利用含有 T7 启动子的 DNA 模板，从 T7 启动子下游起始，合成与 DNA 模板中反义链互补的 RNA，简单快速稳定地获得大量带有 Biotin 标记的 RNA 分子。合成的带标记的 RNA 可用于 pull down, Northern Blots, 原位杂交, RNA 酶保护实验等 RNA 功能实验研究。为方便客户对转录合成得到的 RNA 进行纯化，此试剂盒亦提供用于纯化的配套试剂。

运输与保存

本试剂盒产品需低温运输。收到产品后，请于-20℃冰箱低温保存，可以稳定保存半年。使用前请混合均匀。

试剂盒组分

表1 Ribo™ RNAmx-T7 生物素标记转录试剂盒组成*

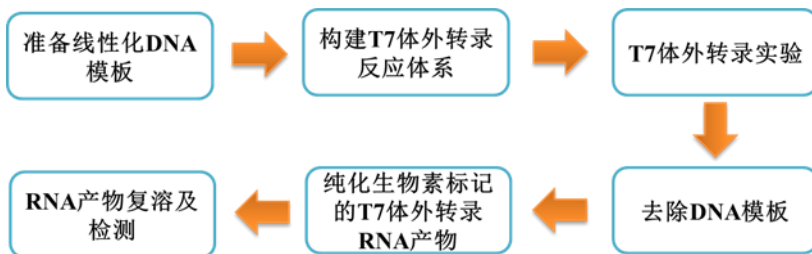
序号	试剂组成	浓度	C11002-1(20T)
1	T7 Enzyme mix		40μl
2	T7 Reaction Buffer (5X)	5X	80μl
3	DNA Control Template	100ng/μl	20μl
4	Biotin RNA Labeling Mix	10mM	120μl
5	DNase I	1U/μl	20μl
6	Purification Assistant A		200μl
7	Purification Assistant B		40μl

*本产品规格为 20 次。为方便客户使用，本产品配备 DNase I，用于 RNA 合成后去除反应体系中的 DNA 模板，以及纯化用试剂，用于 RNA 合成后的纯化回收。

客户自备试剂

客户需要自备线性化 DNA 模板、预冷无水乙醇、预冷 70%乙醇、RNase Free Water 或 1 X TE 溶液及其它相关的实验试剂耗材等。如进行 RNA pull down 实验，需另行购买磁珠。

使用流程

推荐实验条件 注：可根据具体情况进行优化

1. 线性化 DNA 模板的制备

本试剂盒以含有 T7 启动子的线性化 DNA 作为模板。DNA 模板可使用线性化后的质粒，需避免线性化处理的 DNA 模板产生粘性末端，如不可避免则需要平末端化处理。线性 DNA 模板有纯度要求，不可含有 RNase 污染，如有 RNase 污染，需去除污染并重新回收。若模板来自 PCR 产物，则需要对 PCR 产物进行纯化，去除引物、引物二聚体及非特异性 DNA 扩增产物等杂质后方可进行转录反应。

只有检验合格的线性化 DNA 模板才能与本试剂盒配套使用，质量好的线性化 DNA 模板才能转录制备出高质量的 RNA。故经纯化的线性 DNA 模板需要进行严格的质控，可使用琼脂糖凝胶电泳或聚丙烯酰胺凝胶电泳进行质控，验证 DNA 模板线性化是否完全，线性化片段大小是否正确，线性化的 DNA 模板片段条带是否单一等。

2. T7 体外转录反应体系的配置与转录实验操作

按下表配置体外转录反应体系：

表2 体外转录反应体系

序号	T7 体外转录反应体系	用量
1	线性化 DNA template (0.1-0.2μg)	< 8μl
2	T7 Enzyme mix	2μl
3	T7 Reaction Buffer (5X)	4μl
4	T7 RNA Labeling Mix	6μl
5	RNase Free H ₂ O	Add to 20μl

用移液器轻轻吸打混匀反应体系（请勿剧烈震荡混匀），瞬时离心以确保溶液全部汇集在管底，置于热循环仪上 37℃ 孵育反应 2~4h（反应时间可根据合成 RNA 长度大小进行适当调整优化），反应结束后将体系置于冰上，建议尽快进行下一步纯化，不建议将体系冻存。

3. 去除 DNA 模板的操作

向上一步的反应体系中加入 1μl DNase I (1U/μl)，并用移液器混合均匀，瞬时离心使溶液全部汇集于管底，置于热循环仪上 37℃ 孵育反应 20min，以彻底消除体系中的 DNA 模板，可根据 DNA 模板长度适当优化反应时间。

4. T7 体外转录 RNA 产物的纯化

按下表所述配制 RNA 产物的纯化体系：

表3 RNA 产物纯化体系

序号	RNA 产物的纯化体系	用量
1	去除模板后的转录产物	21μl
2	RNase Free H ₂ O	67μl
3	Purification Assistant A	10μl
4	Purification Assistant B	2μl

*建议使用灭菌后的 1.5ml 低吸附离心管进行纯化

轻轻混合均匀后加入预冷无水乙醇 300μl，轻轻混合均匀后放置于-20℃冰箱中两个小时或过夜沉淀，若放置于-80℃的冰箱中，则至少需要沉淀 1 小时以上。

沉淀后，使用低温冷冻离心机在 4℃、13000rpm 条件下离心 30min，离心后可明显看到 RNA 沉淀。弃去上清后加入 1ml 预冷 70% 乙醇，颠倒离心管洗涤沉淀。建议重复洗涤步骤一次。

最后于低温冷冻离心机在 4℃、13000rpm 条件下离心 10min，弃去上清后（尽量把剩余乙醇洗液全部去除）干燥晾干 RNA 沉淀至透明。

5. RNA 产物的复溶及质检

加入 30~50μl RNase Free Water 或 1 X TE 溶液溶解晾干后的 RNA 沉淀，室温放置 5min 直至 RNA 沉淀充分溶解。使用微量分光光度计（如 Nanodrop）或 Qubit 等对 RNA 的浓度及纯度进行检测，使用琼脂糖凝胶电泳或者 Agilent 2100、Agilent2200 等仪器检测确认 RNA 的完整性。

FAQ

1. 转录产物长度是否有限制？

答：本试剂盒的转录产物长度一般为 4kb 以内，最长可合成 14kb 的转录本，若超出 4kb，请自行优化实验条件，以得到最优结果。

2. 有什么纯化模板的方法吗？

答：可以使用质粒过柱纯化、磁珠纯化或者乙醇高盐沉淀的方法来沉淀模板，具体的得率需自行优化。

3. 本试剂盒中提到的 T7 启动子其序列是什么？

答：T7 启动子序列如下：

T7 Promoter 序列

```

5'-TAATACGACTCACTATAGGG
3'-ATTATCGTGAGTGATATCCC
    
```

5. 若我们想做 RNA pull down 实验，一般推荐购买什么磁珠？

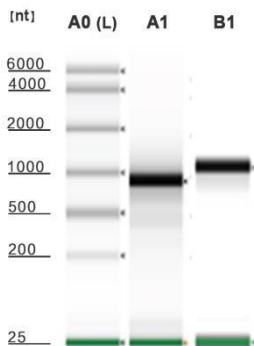
答：建议使用进口的链酶亲和素磁珠，例如 Invitrogen 的 Dynabeads® MyOne™ Streptavidin C1 磁珠（货号：65002）。

4. 说明书中提到的热循环仪可否用恒温水浴箱等恒温仪器代替？

答：建议使用 PCR 仪，因为有热盖可以防止转录过程中水分的蒸发。根据不同的 PCR 仪，反应体系最大可以做到 100μl；如果反应体系更大，也可以使用恒温水浴，但不推荐气浴，因为气浴受热不均匀。可根据条件进行合理配置。

6. DNA 对照模板的转录产物长度是多少？

答：阳性对照的长度在 1K 左右，由于电泳系统不同，结果可能有些许差异。



A1 条带：以 DNA 对照模板为转录模板，用 T7 体外转录试剂盒(C11001-1)转录合成得到的产物；

B1 条带：以 DNA 对照模板为转录模板，用 T7 生物素标记转录试剂盒(C11002-1)转录合成得到的带 Biotin 标记的产物。