

天
净
沙
系
列

CAT#:220891-50
低温运输, -20℃保存

BINGENE

T3 RNA转录标记试剂盒 (自备标记核苷酸)

T3 RNA Transcription & Labeling Kit

使用手册 V1.0

江苏天净沙基因诊断技术有限公司

网址: www.bingene.com; 电话: 400-6005850; 电邮: order@bingene.com

<p>产品及特点</p>	<p>本试剂盒是基于沙门氏噬菌体 T3 RNA 聚合酶的 RNA 转录和标记试剂盒，它利用含有 T3 启动子的模版 DNA，以 NTP 和标记的 NTP 为底物，从 T3 启动子下游开始合成与模板 DNA 中一条链互补的 RNA，简单快速获得大量的含标记的 RNA 分子。本产品具有下列特点：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 即开即用，用户只需提供含 T3 启动子的 DNA 模板即可以进行体外转录实验，不需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. 模板 DNA 可以是线性化的质粒 DNA，也可以是 PCR 扩增产物。 4. 可以合成的标记 RNA 的最佳长度在 20 nt 到 5000 nt 之间。 5. 产品配方经过精心优化，每 μg DNA 模板可以合成 2-6 μg 的标记 RNA。 6. 得到的标记 RNA 可以用于 RNA 结构研究、核解生物化学、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 次标记反应。 8. 本试剂盒只能用于科研。 																																				
<p>规格及成分</p>	<p style="text-align: center;">本产品使用十孔盒包装</p> <table border="1" data-bbox="470 1093 1433 1686"> <thead> <tr> <th>成份</th> <th>编号</th> <th>规格</th> <th>包装材料</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>10×T3 转录预配液 (不含 NTP)</td> <td>220891a</td> <td>0.5 mL</td> <td>0.5 mL 本色盖</td> </tr> <tr> <td>T3 RNA 聚合酶</td> <td>120309</td> <td>50 μL</td> <td>0.5 mL 红色盖</td> </tr> <tr> <td>ATP 溶液, 10mM</td> <td>220943</td> <td>50 μL</td> <td>0.5 mL 白色盖</td> </tr> <tr> <td>UTP 溶液, 10mM</td> <td>220944</td> <td>50 μL</td> <td>0.5 mL 黄色盖</td> </tr> <tr> <td>CTP 溶液, 10mM</td> <td>220945</td> <td>50 μL</td> <td>0.5 mL 绿色盖</td> </tr> <tr> <td>GTP 溶液, 10mM</td> <td>220946</td> <td>50 μL</td> <td>0.5 mL 蓝色盖</td> </tr> <tr> <td>RNase-free 水</td> <td>980403</td> <td>1 mL</td> <td>1.5 mL 亮黄盖</td> </tr> <tr> <td>使用手册</td> <td>220214sc</td> <td>1 份</td> <td>无</td> </tr> </tbody> </table>	成份	编号	规格	包装材料	10×T3 转录预配液 (不含 NTP)	220891a	0.5 mL	0.5 mL 本色盖	T3 RNA 聚合酶	120309	50 μL	0.5 mL 红色盖	ATP 溶液, 10mM	220943	50 μL	0.5 mL 白色盖	UTP 溶液, 10mM	220944	50 μL	0.5 mL 黄色盖	CTP 溶液, 10mM	220945	50 μL	0.5 mL 绿色盖	GTP 溶液, 10mM	220946	50 μL	0.5 mL 蓝色盖	RNase-free 水	980403	1 mL	1.5 mL 亮黄盖	使用手册	220214sc	1 份	无
成份	编号	规格	包装材料																																		
10×T3 转录预配液 (不含 NTP)	220891a	0.5 mL	0.5 mL 本色盖																																		
T3 RNA 聚合酶	120309	50 μL	0.5 mL 红色盖																																		
ATP 溶液, 10mM	220943	50 μL	0.5 mL 白色盖																																		
UTP 溶液, 10mM	220944	50 μL	0.5 mL 黄色盖																																		
CTP 溶液, 10mM	220945	50 μL	0.5 mL 绿色盖																																		
GTP 溶液, 10mM	220946	50 μL	0.5 mL 蓝色盖																																		
RNase-free 水	980403	1 mL	1.5 mL 亮黄盖																																		
使用手册	220214sc	1 份	无																																		
<p>运输及保存</p>	<p>低温运输，-20°C 保存，有效期一年。</p>																																				
<p>自备试剂</p>	<p>标记 dNTP (如 biotin-16-UTP 或 DIG-16-UTP)，如果需要对标记 RNA 进行定量，则需要单链 RNA 荧光定量试剂盒。</p>																																				
<p>使用方法</p>	<p>一、制备 DNA 模板</p> <p>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。一是必须使用线性化的 DNA。如果是质粒 DNA，则必须先用适当的</p>																																				

限制性内切酶切成线状。二是需要转录的 DNA 序列的上游必须有 T3 启动子。如果模板是 PCR 产物，则可以在设计引物时将 T3 启动子序列 (5' AATTAACCCTCACTAAAGG 3') 加上。如果是将 DNA 片段克隆到载体上，则需要选择有 T3 启动子的载体，并且克隆位点必须位于 T3 启动子下游。三是需要转录的 DNA 序列的下游端最好不要是 3' 突出。如果是 3' 突出 (如选择了 Pst I 来线性化质粒)，则最好用 T4 DNA 聚合酶修平。四是必须保证 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，最好采取胶回收得方法回收质粒 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，以此判断纯化的 DNA 模板是否有残留 RNase A。

二、转录标记反应

1. 强烈建议做一个不标记的体外转录对照，这样并排电泳时更容易判断 RNA 是否标记上。在 2 个 RNase-free 的塑料离心管中，在室温下 (不是在 4℃ 下) 按次序加入下列成分：

成分	样品管	对照管
DNA 模板	各 50 ng(PCR 片段模板) 或各 1μg (质粒模板)	50 ng(PCR 片段) 1μg (质粒 DNA)
10×T3 转录预配液 (不含 NTP)	10 μL	10 μL
ATP 溶液, 10mM	1 μL	1 μL
GTP 溶液, 10mM	1 μL	1 μL
CTP 溶液, 10mM	1 μL	1 μL
UTP 溶液+标记 UTP 溶液, 10mM	1 μL	不加
T3 RNA 聚合酶混合液	1 μL	不加
RNase-free 水	补水到 20μL	补水到 20μL

注：UTP 溶液 10mM 和标记 UTP 溶液 10mM 的比例应该在 1/10-1/3 之间，如果加入太多标记 UTP 溶液，由于标记基团的空间阻碍，合成效率反而更低。

一般的标记核苷酸商品都是标记 UTP，故此手册默认用户的标记核苷酸为 UTP 并进行编写使用流程。如果不是，则用户需要对上表各成分的用来进行调整。。

	<ol style="list-style-type: none"> 2. 37℃保温 2 小时。注意：延长保温时间并不能提高产量。 3. 70℃加热 10 分钟灭活 T3 RNA 聚合酶。 4. 取 3μL 电泳检测转录效果。样品管得到的 RNA 条带由于带有标记物，分子量更大，会比对照管得到的 RNA 条带慢。同时又由于每个 RNA 分子中掺入的标记 NTP 数量不一，其分子量不一，因此条带会更加弥散，属于正常情况。 5. 使用本试剂盒时 1μg DNA 模板一般可以合成得到 2-6μg 的标记 RNA。如果需要准确定量，可以用自备的 Qubit 单链 RNA 荧光定量试剂盒检测浓度，但由于 RNA 分子掺入了标记基团后产生空间阻碍，使得 RNA 分子跟染料分子的结合效率更低，故得到的浓度可能比实际的低。由于标记基团多具有疏水性，它使得 RNA 分子更容易进入酚相而丢失，故不建议使用酚-氯仿抽提法纯化标记的 RNA。 6. 得到的标记 RNA 可以直接用于杂交，也可以放-80℃长期保存。如果不变性成单链，溶液中的双链 DNA 模板并不会影响杂交。
<p style="text-align: center;">答客问</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1、没有 RNA 产物。最常见原因是 DNA 模板有 RNase 污染，测试方法是将纯化的有两条典型 RNA 条带的总 RNA 跟模板 DNA 一起保温，再检测 RNA 是否降解。本试剂盒缓冲液和酶混合液中有 RNase inhibitor，如果模板 RNase 污染严重，可能需要用户补加 RNase inhibitor。 2、RNA 产量低。最常见的原因是 DNA 模板序列。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 T3 RNA 聚合酶的终止序列。可以改用 SP6 或 T7 体外转录试剂盒（启动子也必须做相应的改变）。 4、RNA 长度比预计的长。T3 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 可以额外合成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 DNA 线性化不彻底。 5、如何得到带帽 RNA？在本反应体系中加入自备的带帽 NTP 类似物即可。
<p style="text-align: center;">关联产品</p>	<p>T7 RNA 转录标记试剂盒</p>