

SP6体外转录试剂盒

SP6 *in vitro* Transcription Kit

CAT#:BN66012

低温运输, -20℃保存

产品及特点

本试剂盒是基于SP6 RNA聚合酶的RNA体外转录试剂盒, 它利用含有SP6启动子的DNA, 以NTP为底物, 从SP6启动子下游开始合成与模版DNA中一条链互补的RNA, 单快速获得大量的RNA分子。本产品具有下列特点:

即开即用, 只需提供含SP6启动子的DNA模板即可进行体外转录实验。

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。

模版DNA可以是线性化的质粒DNA, 也可以是PCR扩增产物。

可以合成的RNA的最佳长度在20 nt到2000 nt之间。

产品配方经过精心优化, 每 μg DNA模版可以合成2-6 μg RNA。

得到的RNA可以用于RNA 结构研究、核酶生物化学、体外翻译等实验。

本产品足够50次20 μL 的体外转录实验。本产品只能用于科研。

规格及成分

成份	编号	规格
T7-SP6体外转录预配液, 2 $\times$	220135a	0.5 mL
SP6 RNA聚合酶-RI混合液	220135b	50 μL
RNase-free水	80403	1 mL

运输及保存

低温运输, -20℃保存, 保存期限为24个月。

自备试剂

如果需要去除转录产物中的DNA模板, 则需要自备RNase-free DNase、Tris饱和酚、氯仿、微量核酸沉淀剂、RNase-free 75%乙醇 (均可从本公司另购)

使用方法

一、制备DNA模板

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SP6启动子。如果模板是PCR产物, 则可以在设计引物时将SP6启动子序列 (5' ATT TAG GTG ACA CTA TAG AGN G 3') 加上, 转录其实是从3端G AGN G中的第一个

G开始。如果是将DNA片段克隆到载体上，则需要选择有SP6启动子的载体，并且克隆位点必须位于SP6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、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℃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	50 ng左右的PCR片段或1 μg左右的线状质粒DNA	不加
SP6转录预配液，2×	各10 μL	10 μL
SP6 RNA聚合酶-RI混合液	各1 μL	1 μL
RNase-free水	补水到20 μL	补水到20 μL

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。如果需要标记RNA探针，则需要单独订购NTP分开的试剂盒。如果需要得到加帽RNA，则需要另外加入自备的加帽修饰核苷酸（可以从NEB购买）。

2. 37℃保温1-2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SP6 RNA聚合酶。
4. 取1-3 μL电泳检测转录效果。此时除DNA marker外，最好再用DNA模板做电泳对照。电泳时比阴性对照多出的条带就是扩增得到的RNA（由于合成的RNA长度不均匀，即使长度均匀，但由于自生形成发夹结构，泳动速度也不一致，所以电泳所得RNA条带一般都不是清晰，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，因此转录得到的RNA一般比其双链的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，也可以肉眼比较电泳胶上RNA和DNA的强度。由于RNA是单链，跟核酸染料结合力低，因此同等亮度的RNA条带，其RNA分子数一般比DNA的分子数多一倍。使用本试剂盒时1 μ g DNA模板一般可以合成2-6 μ g的RNA

6. 得到的RNA可以放-80℃保存或立即使用。

注：若需进一步去除DNA模板，可参考下列操作步骤，但所用试剂需另行购买。

1. 在体外转录体系中加入3-5 U自备的 RNase-free DNase (CAT#:90903; 3-5 U/ μ L) 。
2. 37℃保温15-30分钟降解DNA。
3. 补水到100 μ L (体积太小不方便下步的酚氯仿抽提) 。
4. 用等体积的Tris饱和酚-氯仿抽提一次去除残留的DNase和RNA聚合酶。
5. 在上清中加200 μ L自备的微量核酸沉淀剂 (CAT#50903; 用前需要摇晃混匀) ，振荡后15000 $\times$ g离心3-5分钟，弃上清。
6. 加入1 mL 75%乙醇，震荡10秒后15000 $\times$ g离心3-5分钟，弃上清。
7. 短暂离心数秒，用枪头吸弃上清。
8. 晾干半分钟，所得沉淀即去除DNA模板后的RNA。可溶于RNase-free水中后立即使用或放-80℃长期保存。

答客问

- 1、没有RNA产物。最常见原因是模板有RNase污染，可用纯化的RNA跟模板DNA一起保温，再检测RNA是否降解。还可以增加RNase Inhibitor用量，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。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SP6 RNA聚合酶的终止序列。可以改用SP6体外转录试剂盒（启动子也必须改成SP6启动子）。
- 4、RNA长度比预计的长。SP6 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SP6 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、如何得到带帽RNA？需加入带帽NTP类似物即可，本公司提供5种供选择（产品编号130694-130698）。