

Hi T7 RNA Polymerase

Cat.No.: A3601 Size: 10kU Store at: -20°C



描述: Hi T7 RNA Polymerase 对 T7 噬菌体启动子具有高度的特异性, 并可以其作为启动子, DNA 作为模板体外合成正义链。双链线性质粒 DNA、PCR 产物均可作为该酶的底物模板。

Hi T7 RNA 聚合酶经电子重构架及库筛选, 与 Wild 型比较来看, 酶的 DNA 模板结合区域亲和力更高, 使其具有持续合成能力, 从而获得更高的产量, 并易于长片段 RNA 的合成。该酶为重组纯化制品, 无 DNase 和 RNase 污染。

组分

名 称	数 量
Hi T7 RNA Polymerase (100 U/μl)	100 μL
10XHi T7 TransBuffer	0.5 mL

活性定义: 在标准反应体系下, 37°C 1 小时内将 1 nmol 的 ATP 掺入酸不溶物所需要的酶量定义为一个活性单位。

储存: 置于-20°C 可保存 2 年, 如有白色沉淀析出, 37°C 温浴 5min 后使用, 不影响性能。

热失活: 75°C, 10min。

需自备其它辅助试剂

货 号	名 称
A0304	rNTP Mixture (25 mM each)
D1102	RNase Inhibitor
D3001	Rnase Free DNase I

操作方法

1. 配制反应体系

10XHi T7 TransBuffer	2 μl
rNTP Mixture (25 mM each)	3.2 μl
Linearized template DNA	0.5-1 μg
RNase Inhibitor (40U/μl)	0.5 μl
Hi T7 RNA Polymerase (100 U/μl)	0.5-1 μl
DEPC-treated Water	up to 20 μl

2. 37°C 孵育 2-3h (通常 3h, 即可获得 >80 μg 的总产量)。

3. 反应完毕后, 如需去除模板 DNA, 加入 Dnase I (2U) 37°C 处理 15min。

4. 终止反应: 75°C 加热 10min, 或加入 2 μl 0.5M 的 EDTA (pH8.0)。

注意事项

1. 质粒DNA的质量影响RNA的量和完整性。质粒DNA的浓度越高, 生成RNA的质量越高, 质粒模板DNA应该无 RNase 污染。

2. 该酶为高产酶, RNA 产量极高, 在反应完毕后, 通常存在肉眼可见的浑浊状态, 其为反应副产物焦磷酸镁, 此时表明反应剧烈。在下一步 RNA 纯化前, 可通过短暂离心去除沉淀物, 此过程并不丢失 RNA。

3. 通常转录后 RNA 产物浓度在 2-4 μg/μl, 因此电泳时, 仅需取 0.05-0.1 μl 即可。

4. 关于 T7 启动子序列: (G/C) 标示 G 或 C 碱基均可。

CAAAT	(TAATACGACTCACTATA)	G (G/C) GNNN..
非必须	核心识别序列	转录起始序列