



08-03

*ScriptMAX*TM
Thermo T7 Transcription Kit
(Code No.:TSK-101)

使用说明书

科研用

TOYOBO CO., LTD. Life Science Department
OSAKA JAPAN

目 录

【1】 前言	1
【2】 试剂盒内容	2
【3】 试剂盒以外所需物品	2
【4】 模板DNA的准备	3
【5】 RNA的合成	3
【6】 RNA的纯化	5
【7】 RNA的纯度分析	6
【8】 常见问题	8
【9】 相关产品	8

【 注意 】

本试剂盒中所含的试剂均为科研用试剂。请勿作为诊断、临床试剂用。在使用时，请严格遵守实验室的一般注意事项，适当使用保护用品，安全操作。

【1】 前言

ScriptMAX™ Thermo T7 Transcription Kit是以Thermo T7 RNA聚合酶为基础开发的转录试剂盒，具有很高的RNA合成能力。ScriptMAX™含有RNA合成反应所必需的所有试剂，包括RNA聚合酶和反应缓冲液、Accelerator solution、rNTPs混合液、RNase抑制剂等。由本试剂盒合成得到的RNA可作为无细胞蛋白质合成试剂[PROTEIOS™ wheat germ cell-free protein synthesis kit]所用的mRNA，也可用于其他各种实验。另外本试剂盒含有RNA转录所必需的最基本组分，可以配合其他试剂盒一起使用。

◆ 试剂盒的特征

1. 可根据用途合成相应的 RNA

分别针对线型和环状 DNA 模板制定了最合适的实验步骤。另外通过添加 Accelerator solution，可以制备以往浓度 2-4 倍的高浓度 RNA。

2. 最适合用于无细胞蛋白合成试剂盒[PROTEIOS™]用mRNA的合成

用本试剂盒制备的 RNA，最适合用于无细胞体外蛋白合成试剂盒 [PROTEIOS™]用mRNA的合成。为了将凝胶过滤纯化时mRNA的损失最小化，本试剂盒对反应液的组成进行了改良（以环状DNA作为模板合成mRNA时，无需添加Accelerator solution）。

3. 含有反应所需的各种成分

除含有聚合酶以外，本试剂盒还添附了缓冲液、rNTPs、RNase Inhibitor、Nuclease-free water 等试剂，以方便使用。

【2】 试剂盒内容

◆ 本试剂盒(20 μ l反应 \times 60 次用)中包含以下的试剂¹⁾。

试剂名	容量	支数
Thermo T7 RNA polymerase(50U/ μ l)	60 μ l	1
10 \times Basal reaction buffer ²⁾³⁾	400 μ l	1
5 \times Accelerator solution	400 μ l	1
25mM rNTPs mixture	280 μ l	1
RNase Inhibitor(40U/ μ l)	30 μ l	1
Nuclease-free water (未经 DEPC 处理)	1ml	1

- 1) 所有的试剂请于-20 $^{\circ}$ C保存。
- 2) 可能产生的白色沉淀物并非品质问题。可于 37 $^{\circ}$ C放置 5 分钟左右，用力搅拌使之完全溶解，不会影响使用效果。
- 3) 在本试剂盒中添附的 10 \times Basal reaction buffer 和本公司生产的 Thermo T7 RNA polymerase (TRL-201) 中添附的缓冲液组分不同。

【3】 试剂盒以外所需物品

◆ 使用本试剂盒时，请另外准备如下试剂和样品：

- **模板 DNA（环状或线型）：**需要注意的是，模板 DNA 必须具有 T7 启动子位点。同时，模板 DNA 应为 RNase-free 级。
- **Nuclease-free water：**本试剂盒添附。如因稀释样品需大量使用时请另行准备。（通常可以使用灭菌蒸馏水）。
- **RI 核酸标记：**如欲对合成的RNA通过 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ 等方法进行标记，请另行准备。本试剂盒中添附的rNTP是预先混合的，请另外准备未经混合的rATP, rCTP, rGTP, rUTP（参见【9】相关产品）。
- **RNase-free DNase 1：**转录反应液中所含有的模板 DNA 相对于反应生成的 RNA 而言，浓度非常低。多数情况下，不必除去残留的模板 DNA。请根据具体需要进行准备。

【4】 模板 DNA 的准备

- ◆ 模板 DNA 必须要求 RNase-free 级。尤其是使用质粒作为模板时，从菌体抽提质粒的过程中如使用了 RNase，必须通过苯酚·氯仿处理等方法除去 RNase。

【5】 RNA 的合成

◆ 方法 A

适用于以下用途：

- 以线型DNA为模板，[PROTEIOS™] 用mRNA的合成¹⁾；
- 大量合成 tRNA，rRNA，ribozyme，anti-sense RNA 等；
- RNAi 用双链 RNA 的合成。

1. 根据以下组成配制反应液，轻轻混匀²⁾。

10× Basal reaction buffer	2 μl
5× Accelerator solution	4 μl
25mM rNTPs mixture	4.5 μl
RNase Inhibitor	0.5 μl
Template DNA	100ng-1 μg
Thermo T7 RNA polymerase	1μl
Nuclease-free water	up to 20μl
<hr/>	
Total volume	20 μl

2. 在 37-42℃ 下放置 2 小时³⁾。

- 1) 以环状质粒为模板制备无细胞蛋白合成试剂盒 [PROTEIOS™] 用 mRNA 时，请参考方法 B。如根据方法 A 来制备，会降低蛋白质合成的量。
- 2) 反应液的配制须在室温下进行。如在低温下配制，缓冲液中的亚精胺和 DNA 容易形成沉淀，会降低反应效率。
- 3) 本试剂盒中添附的 RNA 聚合酶是耐热性酶“Thermo T7 RNA Polymerase《TT7》”。和野生型酶相比较，在高温下的稳定性得到了改良，可适用于更宽的温度区间。（请参见下页图）

方法 B

适用于以下用途：

- 以环状DNA为模板，[PROTEIOS™] 用mRNA的合成¹⁾；
- 探针标记等高特异性少量 RNA 的合成。

1. 根据以下组成配制反应液，轻轻混匀²⁾。

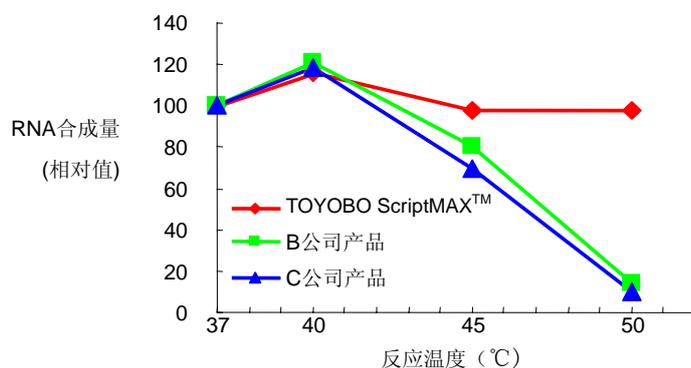
10× Basal reaction buffer	2 μl
25mM rNTPs mixture	2 μl
RNase Inhibitor	0.5 μl
Template DNA	1-2 μg
Thermo T7 RNA polymerase	1 μl
Nuclease-free water	up to 20 μl
Total volume	20 μl

2. 在 37-42℃ 下放置 2-4 小时³⁾。

1) 以环状质粒为模板制备无细胞蛋白合成试剂盒用[PROTEIOS™] mRNA时，请参考方法 B。如根据方法A来制备，会降低蛋白质合成的量。

2) 反应液的配制须在室温下进行。如在低温下配制，缓冲液中的亚精胺和 DNA 容易形成沉淀，会降低反应效率。

3) 本试剂盒中添附的 RNA 聚合酶是耐热性酶“Thermo T7 RNA Polymerase 《TT7》”。和野生型酶相比较，在高温下的稳定性得到了改良，可适用于更宽的温度区间。（请参见下图）



图：反应温度和 RNA 合成量的比较

根据方法A，在不同温度进行 2 小时的反应。和其他公司使用野生型酶制成的试剂盒相比较，ScriptMAX™ 在高温段的 RNA 合成量比较稳定。

【6】 RNA 的纯化

- ◆ 合成后的RNA，请根据用途采用相应的方法进行纯化。这里介绍 [PROTEIOS™] 用mRNA的标准纯化法。本法可能也适用于其它用途的RNA的纯化。

(1) 凝胶过滤法

1. 参照相应说明书将凝胶混合均匀¹⁾后注入G-25 离心柱（如Amersham Biosciences 公司生产的MicroSpin™ G-25 Columns等），装入 1.5ml微量离心管，3,000rpm离心 1 分钟，去除保存液。
2. 在离心柱中加入 200μl缓冲液²⁾，3,000rpm离心 2 分钟，去除溶出液。
3. 重复第 2 步一次。
4. 将转录后的反应液在 12,000rpm 离心 2 分钟。
5. 将 4 的上清上样到离心柱（换用新的离心管）。
6. 3,000rpm 离心 2 分钟，溶出 RNA。

1) 如果 RNA 合成的反应液不足 50μl，混合 G-25 凝胶之后，可适量的吸掉一部分，或在反应液中用水补足 50μl。进行纯化时，如果溶液太少，会降低回收率。

2) 如采用PROTEIOS™的batch法进行蛋白质合成，应加入 20mM HEPES-KOH (pH7.6)；如采用PROTEIOS™ 的重层法进行蛋白质合成，应加入PROTEIOS中添附的Buffer Mix；其他用途，请根据具体情况选用相应缓冲液或水。

(2) 乙醇沉淀法

1. 根据需要在转录后的反应液中加入灭菌水（或 Nuclease-Free water）至 100μl。
2. 加入 100μl的TE饱和苯酚（pH 8.0）¹⁾，在室温下混合 5 分钟。
3. 4℃，12,000rpm 离心 5 分钟。
4. 小心将上清液转移到另一个微量离心管，注意不要吸到中间的变性蛋白质层。
5. 在上清液中添加 100μl 的氯仿，进行混合。
6. 4℃，12,000rpm 离心 5 分钟。
7. 将上清液转移到另一个微量离心管。

8. 加入 250 μ l 灭菌水和 55 μ l 7.5M 醋酸铵。
9. 加入 875 μ l 的酒精，充分混匀
10. 在室温下静置 2-3 分钟。
11. 4 $^{\circ}$ C，12,000rpm 离心 5 分钟
12. 弃上清液。
13. 加入 70-80%的乙醇（室温）1ml，轻轻倒转 2-3 次进行混匀。
14. 4 $^{\circ}$ C，12,000rpm 离心 5 分钟
15. 弃上清液。
16. 离心沉淀 RNA，用移液器完全吸掉乙醇溶液。
17. 加入适量的缓冲液²⁾，用移液器上下吹打使沉淀溶解。

1) 当制备用于 PROTEIOSTM 的 mRNA 时，推荐使用弱盐基性的 DNA 用苯酚（pH8.0）；使用 RNA 用的弱酸性苯酚时，有时也可以得到高效的蛋白合成。其他用途，请根据具体情况选择相应的 pH 条件。

2) 如采用 PROTEIOSTM 的 batch 法进行蛋白质合成时，应加入 20mM HEPES-KOH (pH7.6)；如采用 PROTEIOSTM 的重层法进行蛋白质合成，应加入 PROTEIOS 中添附的 Buffer Mix；其他用途，请根据具体情况选用相应缓冲液或水。

【7】 RNA 的纯度分析

◆ 纯化后的 RNA，进行后续实验前一般须进行必要的定量和分析。

● 通过琼脂糖电泳分析

如想要确认合成 RNA 的链长和产物的量，可在使 RNA 变性的条件下进行电泳¹⁾。以下为 RNA 的简易变性法。

1. 配制 RNA 变性缓冲液。请按照以下配方配制（配制好的缓冲液请冷藏保存）。

64%	甲醛
26mM	MOPS, pH7.0
6.45mM	醋酸钠
0.6mM	EDTA, pH8.0

2. 将 RNA 反应液 2 μ l, RNA 变性缓冲液 20 μ l, 电泳用 Dye 5 μ l 混匀后, 65 $^{\circ}$ C 加热 15 分钟, 然后置于冰上急速冷却。
3. 用 1%TAE琼脂糖凝胶²⁾进行电泳。

- 1) 对PROTEIOSTM用的mRNA进行分析时, 可以使用非变性条件下的 1%TAE琼脂糖凝胶电泳的简易方法。RNA合成正常时, 电泳图谱应为smear状(如转录模板DNA含有终止序列, 也可能产生条带)。如果RNA合成不正常, 电泳图谱将呈条带状, 在低分子量区域则为一团。
- 2) 在强变性条件下进行电泳时, 请使用 MOPS 进行凝胶电泳。

● 通过吸光度测定进行浓度分析

可使用吸光度计等测定被合成的RNA量。纯化后的RNA 溶液中会有少量DNA模板残留, 但是相对于RNA量来说非常少, 不会影响RNA的定量。RNA的浓度可通过吸光度来计算。对RNA溶液适当稀释(通常 50-100 倍)后, 测定A₂₆₀值, RNA浓度(μ g/ml)为 260nm的吸光度值乘以稀释倍数再乘以系数 40

$$\text{RNA浓度}(\mu\text{g/ml}) = (\text{A}_{260} - \text{空白值}) \times \text{稀释倍率} \times 40$$

空白值为溶解RNA的相应缓冲液的A₂₆₀值。

【8】常见问题

◆ RNA 不能合成，或合成效率低。

原 因	对 策
混入了 RNase	被合成的 RNA 可能被分解。用苯酚·氯仿对模板 DNA 样品进行处理，除去 RNase。
模板中不包含启动子，或是启动子的种类不同	在试剂盒中提供的 RNA 聚合酶对启动序列识别非常严格，基本上无法识别其他的序列。请使用含有正确的启动序列的模板 DNA 。
模板 DNA 中混入了盐之类的杂质	请对模板进行两次以上的苯酚抽提·乙醇沉淀进行纯化。
基因结构产生的问题	通过氯化铯梯度离心纯化 DNA 可以缓和。
扩增质粒时大肠杆菌的培养有问题	有些培养基培养的细菌，抽提的质粒有可能不适合合成 RNA。推荐使用 LB 培养基进行培养细菌。

【9】相关产品

品名及内容	规格	Code No.	保存
Themo T7 RNA Polymerase	7,500U	TRL-201	-20 ⁰ C
rNTPs mixture (各 25mM)	0.5 μ moles	NTP-211(2)	-20 ⁰ C
rNTPs set (各 100mM)	0.5 μ moles	NTP-111(10)	-20 ⁰ C
rATP(100mM)	10 μ moles	ATP-111(5)	-20 ⁰ C
rGTP(100mM)	10 μ moles	GTP-111(5)	-20 ⁰ C
rCTP(100mM)	10 μ moles	CTP-111(5)	-20 ⁰ C
rUTP(100mM)	10 μ moles	UTP-111(5)	-20 ⁰ C
RNase Inhibitor	2,500U	SIN-201	-20 ⁰ C
PROTEIOS TM Wheat germ cell-free Protein synthesis kit*	5 次用 20 次用 60 次用	CPS-601M CPS-601 CPS-603	-80 ⁰ C
PROTEIOS TM buffer set*	1set	CPS-201	-20 ⁰ C

*来自本公司的PROTEIOSTM wheat germ cell-free protein synthesis kit 以及PROTEIOSTM buffer set 的销售对象仅限于非赢利组织。

[制造 · 销售商]

东洋纺（上海）生物科技有限公司

上海市浦东新区张杨路 188 号汤臣商务中心 C 座 310 室

邮编：200122

交货期限 · 订货相关咨询

Tel:021-5879-4900 Fax:021-5879-4901

E-Mail:sales@bio-toyobo.cn

产品内容 · 技术相关咨询

Tel:021-5879-4142 Fax:021-5879-5259

E-Mail:tech@bio-toyobo.cn

<http://www.bio-toyobo.cn>

代理商资料：