

High Yield T7 Biotin16 RNA Labeling Kit

产品描述

High Yield T7 Biotin16 RNA Labeling Kit是专门用于体外转录中产生随机Biotin修饰的RNA探针的试剂盒。这种探针非常适合原位杂交和Northern Blot杂交实验。标记的原理类似于Biotin RNA标签混合物的基本标记原理；使用优化的反应缓冲液和T7 RNA聚合酶混合物，Biotin-16-UTP可有效地结合到RNA中，代替其天然对应物UTP。35%的Biotin-16-UTP替代通常可在反应和标记效率之间达到最佳平衡。由此产生的Biotin修饰的RNA探针可以通过荧光光谱检测。

试剂

1. 产品组分及储存条件

组分	25 rxns
T7 RNA Polymerase Mix	50 μ L
10 \times Reaction Buffer	50 μ L
ATP (20 mM)	50 μ L
GTP (20 mM)	50 μ L
UTP (20 mM)	37.5 μ L
CTP (20 mM)	50 μ L
Biotin16-UTP (10mM)	25 μ L
Control Template (0.5 μ g/ μ L)	5 μ L
RNase-free H ₂ O	1 mL

试剂盒储存于-20°C。

2. 自备材料及试剂

(1) DNA 模板:

DNA 模板可以是质粒 DNA、寡核苷酸、PCR 产物或 cDNA 等。DNA 模板必须是线性的，且包含一个决定靶序列转录起始位点的 T7 RNA 聚合酶启动子序列。

(2) (可选) 其他 RNA 体外合成试剂:

我们公司提供 Biotin-NTP、Fluorescein-NTP、Digoxigenin-NTP、Aminoallyl-NTP、ARCA(B8175)、Pseudo-UTP(B7972)、5mCTP(B7967)、mCAP (B8174)以及 5-Methoxy-UTP (B8061)等常用 RNA 合成试剂。更多关于 RNA 体外合成的试剂，请查询公司官网 <http://www.apexbio.cn/>。

■ 操作流程

1. DNA模板准备

PCR产物、线性化的质粒DNA、cDNA或寡核苷酸可以被用作体外转录的模板。许多克隆载体携带两个相反方向的T7噬菌体聚合酶启动子序列，它可以结合T7聚合酶以起始转录过程。为了获得纯化的线性化质粒，环状质粒必须被完全线性化（消化完全）或清除。

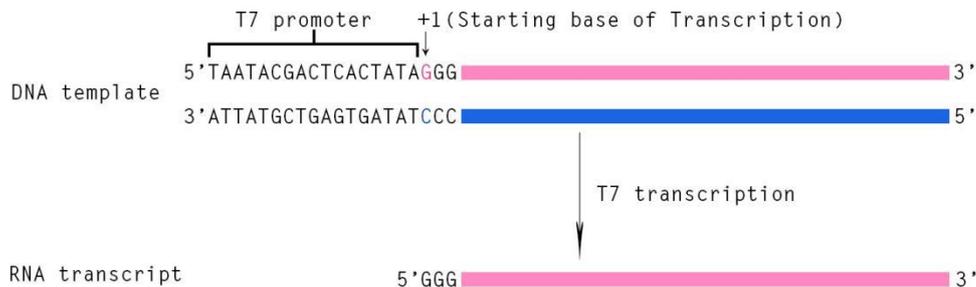


图1 阐明了T7聚合酶如何结合T7启动子并转录产生RNA。

1.1 DNA模板准备质粒模板

许多克隆载体有两个方向不同的噬菌体聚合酶启动子，分别位于多克隆位点的两侧，能驱动插入多克隆位点内序列的转录。这种双反向启动子载体包括pDP载体(Ambion公司)，pGEM载体(Promega公司)，pBluescript载体(Stratagene公司)，pCRII载体(Invitrogen公司)等。用作转录模板的质粒必须是被限制性内切酶线性化过的。由于转录反应一直持续到DNA模板的末端，线性化能确保获得的确切长度和序列的RNA转录本。限制性位点不一定要特定的，只要保证启动子邻近转录模板就可以，质粒本身可以被反复消化。限制性酶切后必须进行纯化，因为消化反应中的残留物可能会抑制转录反应。

在线性化后，我们建议用酚/氯仿提取法纯化DNA模板：

- (1) 用等体积的酚/氯仿(1:1)混合液抽提DNA，必要时重复。
- (2) 用等体积氯仿萃取两次，除去残留苯酚。
- (3) 加入1/10体积的3M醋酸钠(pH5.2)和两倍体积的无水乙醇沉淀DNA；在-20°C孵育至少30min。
- (4) 最高速度离心15min，小心移除上清液。
- (5) 以500μL 70%乙醇冲洗DNA沉淀，最高速度离心15min，小心移除上清液。
- (6) 晾干，用RNase-free H₂O重悬溶解，使其终浓度为0.5~1μg/μL。

1.2 PCR产物

PCR产物也可以作为体外转录的模板。带有T7启动子的PCR产物可以通过在上下游引物的5'端加上T7启动子序列而

获得，由PCR反应产生带T7启动子的双链产物。图2阐明了如何给PCR产物加上T7启动子。

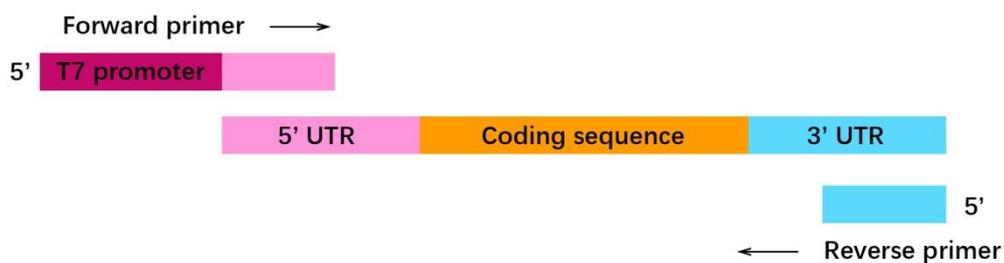


图2 T7 RNA聚合酶模板引物设计

1.3 合成的寡聚核苷酸

两条寡聚核苷酸也可以用来构建短的转录模板，双链的DNA模板可以通过两条带有T7噬菌体启动子的互补寡聚核苷酸退火延伸获得。实际上，只要DNA模板形成双链DNA，体外转录就可以进行。

1.4 cDNA

最近几年，RNA体外转录程序被逐渐应用于RNA放大反应：以RNA为起始模板，oligo(dT)-T7 promoter引物可以在反转录过程以获得一个转录模板，第二轮合成反应便可以获得双链的转录模板。

2. RNA合成

以Biotin-16-UTP为原料合成RNA

(1) Biotin-16-UTP与标准UTP的推荐摩尔比例为1:3或1:2。

(2) 各相应组分在冰上解冻，在室温下按以下顺序配制反应混合液。

Nuclease-free water	X μ L	
10xReaction Buffer	2 μ L	
ATP (20 mM)	2 μ L	2 mM final
GTP (20 mM)	2 μ L	2 mM final
CTP (20 mM)	2 μ L	2 mM final
UTP (20 mM)	1.5 μ L	1.5 mM final
Biotin16-UTP (10 mM)	1 μ L	0.5 mM final
Template DNA	X μ L	1 μ g
T7 RNA Polymerase Mix	2 μ L	
Total Reaction Volume	20 μ L	

(3) 彻底混匀，37°C孵育2h；短片段 (<300nt) 的转录本孵育4h；

(4) 继续纯化合成的RNA或凝胶电泳检测转录产物。

3. 合成RNA的纯化

通常，从标准RNA合成中提取的未修饰RNA转录产物可以通过苯酚/氯仿提取及乙醇沉淀或使用离心柱为基础的方法纯化。对于非放射性标记的RNA或高特异性的放射性RNA探针，色谱柱纯化是最合适的方法；如果需要绝对全长的RNA，我们建议采用凝胶回收纯化。

3.1 苯酚/氯仿提取及乙醇沉淀

苯酚/氯仿提取和乙醇沉淀RNA转录本是去除蛋白质和大多数游离核苷酸的首选方法。

- (1) 加入160μL nuclease-free water将反应体积调整为180μL，加入20μL 3M醋酸钠（pH5.2）或20μL 5M醋酸铵，充分混合。
- (2) 加入等体积的苯酚/氯仿混合液（1:1）抽提，再用氯仿抽提两次。每次都取上层水相至新管。
- (3) 用两倍体积的无水乙醇沉淀RNA，在-20°C至少孵育30min；离心后收集RNA沉淀。
- (4) 弃上清，用500μL预冷的70%乙醇洗涤沉淀。
- (5) 用50μL 0.1 mM EDTA重悬并溶解RNA，于-80°C储存。

3.2 色谱柱法

色谱柱可以去除非结合核苷酸、蛋白及盐分。加入80μL nuclease-free water将反应体系稀释至100μL，彻底混匀。由于每个反应可以产生180μg的RNA，可能超过了柱子的结合能力，而需要额外的柱子。根据制造商的说明书纯化RNA。

3.3 凝胶纯化

当需要高纯度的RNA转录本，如RNA酶保护实验和印记实验标记的RNA探针，我们建议用凝胶回收纯化方法。

4 反应产物的评估

紫外吸收定量：

测量260nm处的紫外吸收值可以很容易地获得RNA浓度，但混合物中的任何未结合的核苷酸和模板DNA都会影响读数。转录反应中游离的核苷酸必须在定量RNA浓度之前去除，纯化的RNA样品稀释200倍，吸光度读数应在分光光度计线性范围内给出；用NanoDrop™分光光度计可能不需要稀释RNA。

RNA浓度在10ng/μL至3000ng/μL范围内可以被NanoDrop™分光光度计直接读出。对于单链RNA，1 A₂₆₀对应的RNA浓度为40μg/mL。

RNA浓度可按以下方式计算：

$$A_{260} \times \text{稀释倍数} \times 40 = \text{__} \mu\text{g/mL RNA}$$

5 荧光基团的掺入率

通过计算结合的荧光团与碱数（染料/碱基）的比值，可以估计RNA标记的效率。

注意：需要用探针缓冲溶液进行Blanc校正。

(1) 核酸—染料共轭吸光度的测量：

测量标记RNA片段在260nm (A_{260}) 和染料 (A_{dye}) 最大激发值(λ_{exc})处的吸光度。

(2) 校正 A_{260} 读数：

为了获得准确的核酸吸光度，需要纠正染料在260nm处的值。使用下列方程式：

$$A_{base} = A_{260} - (A_{dye} \times CF_{260})$$

荧光素的校正因子： $CF_{260} = 0.32$

(3) 兰伯特-比尔定律计算染料与碱基的比例($A=c \times \epsilon \times d$):

$$dye / base \text{ ratio} = (A_{dye} \times \epsilon_{base}) / (A_{base} \times \epsilon_{dye})$$

消光系数：

$$Cy5: \epsilon_{dye} = 83,000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$$

$$ssRNA: \epsilon_{base} = 12,030 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1} \text{ (average, 50\% GC)}$$

(4) 标签化程度(DOL)的计算

标记程度(DOL)表示每100碱染料的数量。 $DOL=100 \times$ （染料/碱基）。

示例：染料/碱基比为0.02，即对应于每100碱基2个染料，其DOL为2。

■ 注意事项

1 低产量全长RNA

如果转录模板是产生全长的RNA，其产量可能明显低于预期；DNA模板里包含的污染物可能会抑制RNA聚合酶的活性，或者可能由于DNA的浓度不正确。或者说，DNA模板可能需要额外的纯化。建议用酚氯仿抽提法（见DNA模板准备部分）。

2 低产量短转录本

短转录本(<0.3 kb)的高产量可以通过增加孵育时间和增加模板的量来获得。孵育反应长达16h（过夜）或者使用多达2 μ g的模板将会有助于实现最大产量。

3 RNA转录本在变性胶中污染

如果RNA开始出现在变性的聚丙烯酰胺胶或琼脂糖凝胶上（例如污染），这意味着RNA酶污染了DNA模板。污染有RNA酶的DNA模板会影响合成转录本的长度（比预期的的转录本短）。在用我们的T7 High Yield RNA Synthesis Kit

处理质粒DNA模板之前，我们建议用RNase contamination assay kit来评估质粒模板的质量。如果质粒模板污染了RNA酶，有必要用酚氯仿方法抽提一遍，再沉淀DNA，用nuclease-free water溶解（见DNA模板准备部分）。

4 比预期更长的RNA转录本

如果在变性胶中出现比预期更长的RNA转录本，质粒DNA模板可能未被完全消化；即使是很小量的未被消化的环状质粒，都能产生大量的长转录本。检查模板是否被消化，如果未被完全消化，应重复酶切消化反应。当RNA转录本由于存在较强的二级结构而不完全变性时，也可以观察到较大的条带。

5 比预期更短的RNA转录本

如果在变性胶中显示比预期更短的RNA转录本，很大可能是由于转录酶过早终止。一些类似于T7RNA聚合酶终止信号的序列会导致RNA转录反应的提前终止。在更低的转录温度下（如30°C）可能会增加长转录本的比例，但总产量会降低；对于富含GC或有二级结构的模板，在42°C下孵育会增加长转录本的产量。

如果在合成高特异性放射性RNA探针过程中，转录反应过早终止，应该增加“限制性NTP”的浓度。可以在反应中额外加入冷的NTPs，以增加长转录本的比例。然而，增加全长产物的产率将损害探针的特定活性。

APEX BIO Technology

www.apexbt.com

7505 Fannin street, Suite 410, Houston, TX 77054.

Tel: +1-832-696-8203 | Fax: +1-832-641-3177 | Email: info@apexbt.com