

SP6 RNA Polymerase

产品描述

SP6 RNA Polymerase 是一种高度特异识别 SP6 启动子序列的 DNA 依赖的 5'→3' RNA 聚合酶。SP6 RNA 聚合酶可以催化单链或双链 DNA SP6 启动子下游 NTP 的掺入，合成与 SP6 启动子下游的模板 DNA 互补的 RNA。SP6 promoter sequence 为 ATTTAGGTGACACTATAGAA，其中最后一个 G 为转录的第一个碱基。

SP6 RNA Polymerase 合成的 RNA 可以用于杂交探针、基因组 DNA 序列分析、核糖核酸酶保护测定(RNase protection assay)、反义 RNA 合成、作为体外翻译的 RNA 模板、RNA 剪接研究的底物、RNA 二级结构和 RNA-蛋白质相互作用、核酸扩增分析、siRNA、miRNA 等小 RNA 等方面。

组分和储存条件

Components	2000 U	5000 U	10000 U
SP6 RNA Polymerase (20U/μl)	0.1 ml	0.25 ml	0.5 ml
10X SP6 Reaction Buffer	0.2 ml	0.5 ml	1 ml

Store the components at -20 °C.

使用方法

1. 参考下表在冰上操作加入反应体系：

Component	Volume
Template DNA	0.2~1 μg
10X SP6 Reaction Buffer	2 μl
NTP Mixture (10 mM each)	4 μl
Ribonuclease Inhibitor	20 U
SP6 RNA Polymerase	2 μl
DTT(optional)	5 mM final
Nuclease-free Water	to 20 μl

- 按上表设置好反应体系后，轻轻混匀（可以用移液器吹打或用 Vortex 在最低速度轻轻混匀），随后离心沉淀液体。
- 37°C 下孵育 1-2 小时。

- 加入 2 μ L 0.5 M EDTA (pH8.0)到反应体系中混匀或-20 $^{\circ}$ C冷却终止反应。
- 电泳分析转录产物，或通过其他适当方法鉴定转录的效率。

***Note:**

- 转录需在无 RNA 酶条件下进行。
- 反应体系需在室温条件下配置，4 $^{\circ}$ C有亚精胺(spermidine)存在时 DNA 可发生沉淀。
- 模板 DNA 为含有 SP6 启动子的线性化质粒 DNA，或含有 SP6 启动子的 PCR 产物，也可以为含有 SP6 启动子的基因组 DNA。
- 如果模板 DNA 的线性化不太完全，会导致转录出比预期长度更长的 RNA，同时使预期长度的转录本比例下降。
- 可根据实际情况按照比例放大或缩小上述反应体系。

产品性质

1. 酶活单位

37 $^{\circ}$ C条件下，1小时内催化 1nmol AMP 掺入到多聚核苷酸中所需的酶量定义为 1 个活性单位。

2. 储存溶液

50 mM Tris-HCl (pH 7.9 @ 25 $^{\circ}$ C), 100 mM NaCl, 20 mM β -ME, 1 mM EDTA, 50% Glycerol, 0.1% (w/v) Triton[®] X-100

3. 10X SP6 Reaction Buffer

400 mM Tris-HCl(pH 7.9 @ 25 $^{\circ}$ C), 60 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 20 mM spermidine

4. 热失活条件

加入适量 EDTA 可以使 SP6 RNA Polymerase 失活。螯合剂、浓度大于 150 mM 的钠、钾或铵盐可以显著抑制 SP6 RNA Polymerase 的活性。

质量保证

- 蛋白纯度检测：SDS-PAGE 检测纯度>95%
- 非特异性核酸酶检测：37 $^{\circ}$ C反应温度下，将 100U 酶与 Lambda DNA 共孵育 16 h，电泳谱条带不发生变化。
- 启动子特异性检测：37 $^{\circ}$ C反应温度下，将 100 U 酶与含有 1 μ g Lamb DNA 模板和 2 mM NTP 的反应体系中孵育 1 小时，与使用 SP6 DNA 作为模板的对照反应相比，转录的 RNA<1%。
- 核酸内切酶活性检测：37 $^{\circ}$ C反应温度下，将 100 U 酶与 1 μ g 超螺旋 174 DNA 共同孵育 4 h 后，使用琼脂糖凝胶电泳检测，质粒 DNA 解超螺旋<10%。
- 核酸外切酶活性检测：将 100 U 酶与 Hind III- DNA 在 37 $^{\circ}$ C共孵育 4 h，电泳谱条带不发生变化，无非特异性外切酶活性。
- RNase 检测：20 U 的酶和 200 ng 的 300 base RNA 底物在 37 $^{\circ}$ C下反应 4 小时，RNA 的电泳谱带不发生变化。