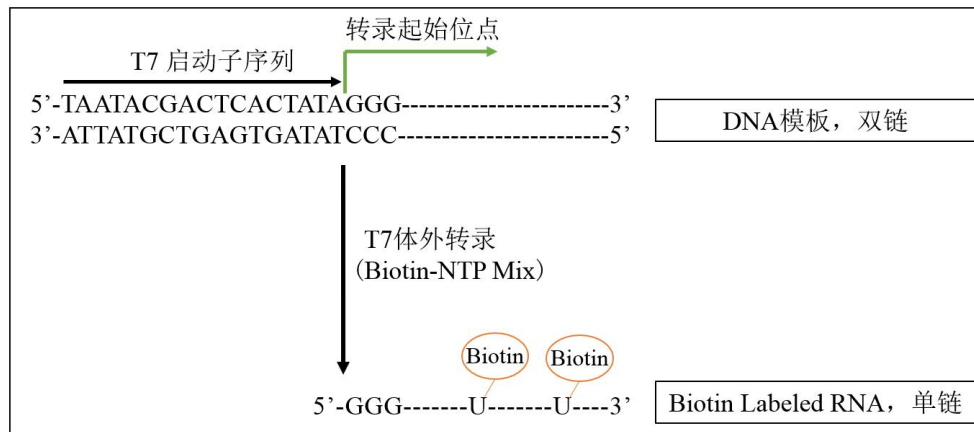




## GENESEED® T7 Biotin Labeled RNA Synthesis Kit

### 产品简介

本试剂盒利用重组 T7 RNA 聚合酶，以 Biotin-NTP Mix 为底物，在体外快速高效合成含生物素标记的 RNA。合成的生物素标记 RNA 可用于 RNA Pull-down、Northern Blot、原位杂交等实验。使用 1 μg DNA 模板时，每次反应中 RNA 生成量不低于 50 μg。



### 产品组分

组分	R0402 (3 rxns) *
T7 RNA Polymerase Mix	4.75 μL
T7 Reaction Buffer	4.75 μL
Biotin-NTP Mix **	20 μL
RNase-Free DNase I (1 U/μL)	6.3 μL
10× DNase Reaction Buffer	30 μL
RNase-Free Water	300 μL

\*: 使用 20 μL 体系时，本试剂盒可进行 3 次转录反应。

\*\*：Biotin-NTP Mix 内含 ATP, GTP, CTP, UTP 和 Biotin-16-UTP，其中 UTP 与 Biotin-16-UTP 的比例为 2:1。

### 保存条件

低温运输，-25 ~ -18°C 保存，保质期 12 个月。

### 自备材料

1. RNA 纯化回收：TRIzol LS Reagent、磁珠或过柱纯化试剂盒。
2. RNA 检测：微量分光光度计、Qubit 荧光计、琼脂糖凝胶电泳设备或 Agilent 2100 等。
3. 其他试剂与耗材：RNase-Free 或 DEPC 处理的 PCR 管和吸头等。



## 操作流程

### 1. DNA 模板制备

使用含有 T7 启动子序列的线性化质粒、PCR 产物或合成的寡核苷酸为模板，模板应保证高纯度高质量，避免 RNase、蛋白质、RNA 或盐类污染。

以线性化质粒为模板的，应使质粒线性化形成平末端或 5' 突出末端，线性化后应进行琼脂糖凝胶电泳检测，确保线性化切割完全，并纯化回收。在 20  $\mu$ L 反应体系中，线性化质粒模板可使用 0.5~1  $\mu$ g。

以 PCR 产物为模板的，可在引物上加入 T7 启动子序列进行 PCR 扩增，确保 T7 启动子序列的方向正确。PCR 产物应进行琼脂糖凝胶电泳检测，确保条带单一且大小正确，并纯化回收。在 20  $\mu$ L 反应体系中，PCR 产物模板可使用 0.2~0.75  $\mu$ g。

### 2. RNA 转录合成

- 1) 从试剂盒中取出各组分试剂，冰上融化颠倒混匀，短暂离心后置于冰盒上备用。
- 2) 按照下表依次添加试剂，配制反应体系。

表 1 RNA 转录合成的反应体系

组分	用量
RNase-Free Water	Up to 20 $\mu$ L
T7 Reaction Buffer	1.5 $\mu$ L
Biotin-NTP Mix	6.5 $\mu$ L
DNA 模板	X $\mu$ L (线性化质粒 0.5~1 $\mu$ g, PCR 产物 0.2~0.75 $\mu$ g)
T7 RNA Polymerase Mix	1.5 $\mu$ L

- 3) 颠倒混匀并短暂离心，置于 PCR 仪上 37°C 孵育 2 h。合成小于 300 nt 的短链 RNA 时应 37°C 孵育 4~16 h。

### 3. DNA 模板去除

向反应液中依次添加 68  $\mu$ L RNase-Free Water，10  $\mu$ L 10 $\times$  DNase Reaction Buffer，和 2  $\mu$ L RNase-Free DNase I (1 U/ $\mu$ L)，置于 PCR 仪上 37°C 孵育 15 min。

### 4. 纯化回收

使用 TRIzol LS Reagent、磁珠或 RNA 柱纯化试剂盒，纯化回收生物素标记的 RNA。

### 5. RNA 检测

#### 1) 定量检测

使用微量分光光度计（如 Nanodrop）或 Qubit 荧光计检测 RNA 的浓度和纯度。

#### 2) 电泳检测

使用琼脂糖凝胶电泳或 Agilent 2100 检测 RNA 的大小和完整性，生物素标记的 RNA 分子量增大，条带大小可能比预期偏大。使用非变性琼脂糖凝胶电泳时，可以先将 RNA 置于 65°C 孵育 10 min，再上样检测。