

Biotin RNA Labeling Kit (SP6/T7)

HX2011

产品简介

Biotin RNA Labeling Kit (SP6/T7), 即 RNA 生物素标记试剂盒 (SP6/T7), 是一种通过高效的 SP6 RNA polymerase 或 T7 RNA polymerase 进行体外转录, 从而获得生物素标记的 RNA 探针的试剂盒。可以配合质粒 pRNA-SP6-T7 (RNA 体外转录质粒) (D2314) 或其它在多克隆位点两侧有 SP6 或 T7 promoter 的质粒, 在多克隆位点插入目的基因并线性化后使用。工作原理是利用带有 SP6 Promoter (ATTTAGGTGACACTATAG) 或 T7 Promoter (TAATACGACTCACTATAGGG) 的线性化质粒、PCR 产物或合成的 DNA 片段等为模板, 利用 SP6 RNA Polymerase 或 T7 RNA Polymerase 能在相对较短的时间内进行体外 RNA 转录的特性, 以 Biotin-16-UTP 部分取代 UTP, 从而转录生成生物素标记的 RNA 探针。

Biotin-16-UTP (Biotin-16-uridine-5'-triphosphate, 即生物素-16-尿苷-5'-三磷酸) 是 UTP (Uridine-5'-triphosphate, 即尿苷-5'-三磷酸) 的生物活性类似物, 在体外转录反应中很容易被 SP6 或 T7 RNA Polymerase 作为转录反应底物整合到 RNA 中。由于使用的 RNA Polymerase 对天然核苷酸 (Nucleoside triphosphate, NTP) 和生物素标记核苷酸 (Biotin-NTP) 没有选择倾向性, 因此每个 RNA 转录产物生物素标记的程度可以通过调节转录反应中 NTP 与 Biotin-NTP 的比例来控制。本试剂盒将 Biotin-16-UTP 的比例控制在约 35%, 使反应和标记效率之间达到较好的平衡。

产品应用

使用本试剂盒获得的 RNA 探针应用范围广。转录合成的带生物素标记的 RNA 探针可用于 Northern、Southern、原位杂交、RNase 保护实验 (RNase Protection Assay) 等相关研究。标记的 RNA 探针后续兼容多种检测方法。转录合成的带有生物素标记的 RNA 探针可以使用荧光基团、酶或抗体偶联的链霉亲和素 (Streptavidin) 进行检测。

储存条件

-20°C 保存, 至少一年有效。

产品信息

组分编号	组分名称	规格	规格
		20 T	100 T
HX2011-1	NTP Labeling Mix (10X)	40 μ l	200 μ l
HX2011-2	Transcription Buffer (10X)	40 μ l	200 μ l
HX2011-3	SP6 Control Template (0.5 μ g/ μ l)	6 μ l	20 μ l
HX2011-4	T7 Control Template (0.5 μ g/ μ l)	6 μ l	20 μ l
HX2011-5	SP6 RNA Polymerase	40 μ l	200 μ l
HX2011-6	T7 RNA Polymerase	40 μ l	200 μ l
HX2011-7	RNase Inhibitor	10 μ l	50 μ l
HX2011-8	DNase I	40 μ l	200 μ l
HX2011-9	Nuclease-free Water	0.5 ml	2 ml

注意事项

1. 本试剂盒内所有试剂保存在-20°C，并尽量避免反复冻融。所有试剂使用前请进行快速离心使液体沉降至管底后再开启使用。
2. 需要自备的试剂：预冷无水乙醇、预冷 70%乙醇、RNA 纯化及其它相关的实验试剂耗材。
3. 由于涉及 RNA 操作，请严格按照 RNA 操作的规范进行，避免 RNase 污染，相关试剂和耗材需要经过 DEPC 处理以去除 RNase 或者确保是 RNase free 的。
4. 本试剂盒的反应体系通常为 20 μ l，但可根据实际需求按比例放大反应体系。建议尽量提高转录模板的质量和纯度，以保证生物素标记 RNA 的产量。
5. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明

1. DNA 模板的准备

本试剂盒体外转录的 DNA 模板需要使用带有 SP6 或 T7 Promoter 的线性化质粒 DNA、PCR 产物或合成的 DNA 片段等；正义或反义 RNA 的合成取决于插入序列的方向。将靶序列置于 Promoter 的下游，在转录时将以双链 DNA 的反义链为模板转录获得正义 RNA，即转录获得的 RNA 的序列对应于插入的 DNA 片段的正义链（图 1）。

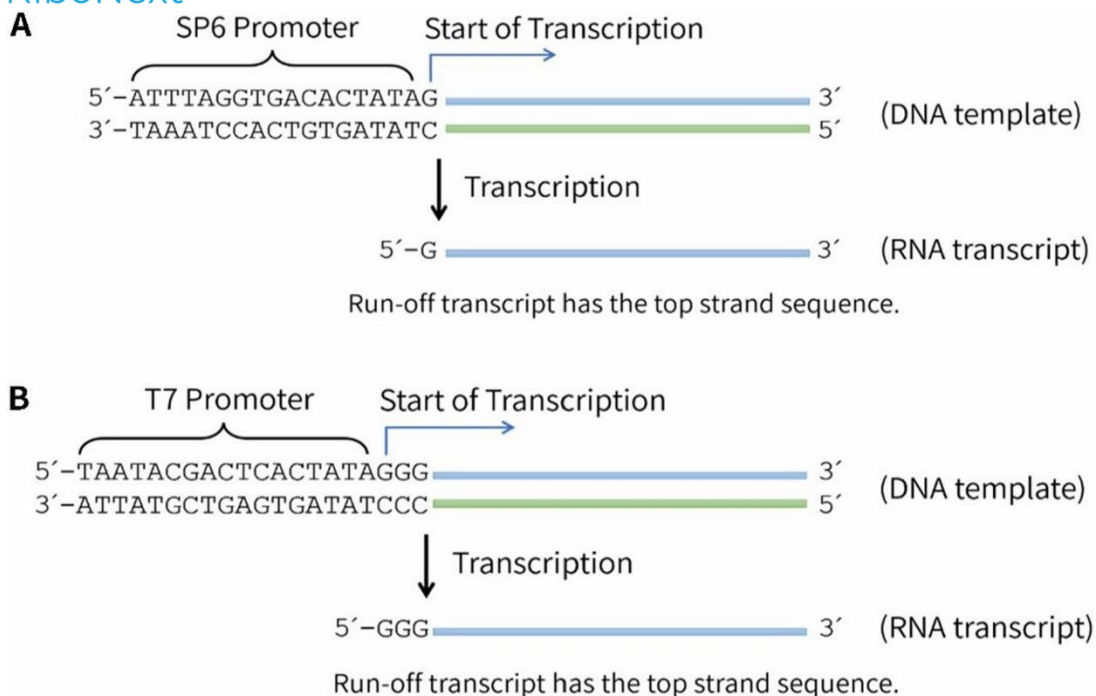


图 1. Biotin RNA Labeling Kit (SP6/T7) (HX2011) 转录反应示意图。SP6 RNA Polymerase 催化的基于 SP6 Promoter 的 RNA 转录反应 (图 A); T7 RNA Polymerase 催化的基于 T7 Promoter 的 RNA 转录反应 (图 B)。

a. 质粒 DNA 模板的准备:

携带 SP6 或 T7 Promoter 的线性化质粒可以作为转录模板。抽提获得高纯度质粒 DNA 后, 用适当的内切酶消化过夜, 然后进行 DNA 柱纯化或苯酚/氯仿抽提和乙醇沉淀。在质粒 DNA 内切酶消化过夜后进行 DNA 凝胶电泳和切胶回收线性化质粒 DNA 的效果通常是比较理想的选择。确保获得线性质粒 DNA 的更有效方式是, 在酶切位点处插入一段比较大的 DNA 片段, 后续双酶切去除该大片段, 同时确保酶切后的位点刚好在所需位点处, 这样后续通过凝胶电泳很容易回收获得高纯度的线性化质粒 DNA 模板。

b. PCR 产物模板的准备:

携带 SP6 或 T7 Promoter 的 PCR 产物也可以作为本试剂盒用于体外转录的模板。在 PCR 扩增模板时将 SP6 Promoter (ATTTAGGTGACACTATAG) 或 T7 Promoter (TAATACGACTCACTATAGGG) 加在上游引物的 5'端。转录前, 建议对 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 以评估 PCR 反应的特异性和产量; 尽管可以直接使用 PCR 产物作为模板, 但使用纯化的 PCR 产物往往可获得更高的产量; 根据 PCR 产物长度的不同, 在 20 μ l 体外转录反应中可以使用 0.1-0.5 μ g PCR 产物。

c. 合成的 DNA 模板:

合成的带有 SP6/T7 Promoter 的双链 (通常通过退火反应获得) 可以作为体外转录的模板, 或者合成的仅 SP6/T7 Promoter 为双链而其余的反义链为单链的 DNA 片段也可以作为体外转录的模板。

注:

- 1) 质粒的线性化程度和纯度都会影响 RNA 转录产物的产量以及完整性。为了产生确定长度的 RNA 转录产物, 质粒 DNA 需要通过限制性内切酶消化在待转录插入片段的下游进行线性化处理。线性化质粒 DNA 作为模板时要尽量确保是平末端或 5'端突出 (5' overhang), 尽量避免 3'端突出 (3' overhang)。如果出现 3'端突出的情况, 模板 DNA 需要用 Klenow 片段或 T4 DNA Polymerase 处理成平末端后再进行转录反应或者需要重新设计质粒线性化的酶切位点。
- 2) 由于 SP6/T7 RNA Polymerase 的高聚合力, 与线性 DNA 模板相比, 环状质粒模板会产生更长的异质化的 RNA 转录产物。因此, 重要的是要把环状质粒充分线性化或者线性化后进行凝胶电泳和胶回收以获得高纯度的线性化 DNA 模板, 从而确保转录产物长度和预期的完全一致。
- 3) 以线性化质粒 DNA 作为模板时, 每个 20 μ l 反应体系建议使用 1 μ g 的线性化质粒 DNA。质粒线性化后, 需要纯化后再作为体外转录的模板, 这样可以避免酶、蛋白、盐等的残留对转录体系的影响。

2. 生物素标记 RNA 的合成。

解冻必要的试剂盒组分, 混匀后快速离心一下, 将溶液沉淀至离心管底部。如果需进行多个反应, 除模板外可以进行预混和再分装到各个反应管内, 同时在配制预混液时需要注意把 RNA Polymerase 在其它组分混合后再最后加入。反应体系通常为 20 μ l, 但可以根据需要按比例扩大反应体系。参考下表设置反应体系, 混匀后快速离心一下, 将溶液沉淀至离心管底部, 37°C 孵育 2 h。

可选: DNase 处理去除 DNA 模板。20 μ l 反应体系中加入 2 μ l DNase I, RNase-free (1 U/ μ l), 混匀后快速离心一下, 将溶液沉淀至离心管底部。37°C 孵育 30 min, 若出现模板未消化完全的现象, 可根据情况适当延长消化时间。在转录体系中加入适量 0.5 M EDTA 溶液 (pH8.0) 以停止反应。

试剂	体积	终浓度
Nuclease-free Water	(13.5-x) μ l	-
Transcription Buffer (10X)	2 μ l	1X
NTP Labeling Mix (10X)	2 μ l	1X
NTP Labeling Mix (10X)	x μ l	1 μ g
RNase Inhibitor	0.5 μ l	1 U/ μ l
SP6/T7 RNA Polymerase	2 μ l	-
Total Volume	20 μ l	-

注:

- 1) 在标准的 RNA 聚合酶反应中, 1 μ g 线性化 DNA 模板 (约 3 kb) 能够合成 8-10 μ g 生物素标记的 RNA

(约 500 nt)。通过放大反应组分，可以获得更多的生物素标记的 RNA。

- 2) 合成的标记 RNA 的产量取决于模板 DNA 的数量、纯度和转录产物的长度。
- 3) 通常 37°C 孵育 2 h 就可以获得接近最大的产量。延长孵育时间不会显著增加标记 RNA 的产量。
- 4) 标记的探针可以立即使用或保存备用，-20°C 可以短期保存，推荐在-80°C 冻存，并须尽量避免反复冻融。
- 5) 当生物素标记的 RNA 被用于与 Northern blots 或 Southern blots 杂交时，可以不进行本操作，因为生物素标记的 RNA 转录物的数量远远超过模板 DNA。

3. RNA 产物的纯化。

通常情况下，RNA 转录产物可以通过苯酚/氯仿抽提和乙醇沉淀或使用柱纯化的方法进行纯化；对于需要精确控制转录产物长度的情况，建议使用凝胶电泳和切胶回收纯化的方法。

a. 苯酚/氯仿抽提和乙醇沉淀：

苯酚/氯仿提取和乙醇沉淀 RNA 转录产物通常是实验室常规操作去除蛋白质和大多数游离核苷酸的首选方法。

- (a) 加入 160 μ l Nuclease-free Water 将反应体积放大到 180 μ l，再加入 20 μ l 3 M 醋酸钠 (pH5.2) 或 20 μ l 5 M 醋酸铵，充分混匀。加入等体积的苯酚/氯仿混合液 (1:1) 抽提一次 (剧烈 Vortex 20-30 sec，随后 14000 $\times$ g 离心 5-10 min 取上清)，用氯仿抽提 1-2 次 (每次剧烈 Vortex 20-30 sec，随后 14000 $\times$ g 离心 5-10 min 取上清)。
- (b) 用双倍体积的无水乙醇沉淀 RNA，在-20°C 至少孵育 30 min。随后 14000 $\times$ g 4°C 离心 5-10 min 沉淀 RNA。
- (c) 弃上清，用约 500 μ l 预冷的 70%乙醇洗涤沉淀。
- (d) 用 50 μ l DEPC 水或 0.1 mM EDTA 重悬并溶解 RNA，在-80°C 储存。

b. 磁珠法纯化：

磁珠法纯化相对操作比较简单，也无需离心操作。使用本方法进行纯化时，如果之前没有使用 DNase I 进行消化，那么就需要充分变性后确保 RNA 和 DNA 不形成杂合链的情况下，才能有效去除其中的 DNA 模板。如果希望去除 DNA 模板，更推荐使用 DNase I 消化，因为变性方法很难确保磁珠法纯化时没有杂合链。

c. 柱纯化法：

柱纯化可以去除游离的核苷酸、蛋白及盐。纯化时加入 80 μ l Nuclease-free Water 将反应体系补足至 100 μ l 混匀。由于 RNA 产量较高，为了避免超过离心柱式 RNA 纯化柱的结合能力，需要对纯化柱的载量进行评估，再根据相应的产品说明书纯化 RNA。使用本方法进行纯化时，如果之前没有使用 DNase I 进行消化，那么就需要充分变性后确保 RNA 和 DNA 不形成杂合链的情况下，才能有效去除其中的 DNA 模板。

如果希望去除 DNA 模板，更推荐使用 DNase I 消化，因为变性方法很难确保本方法纯化时没有杂合链。

d. 凝胶回收纯化法：

当需要高纯度和特定长度的 RNA 转录产物时，建议凝胶电泳后切胶回收纯化。凝胶电泳可以根据转录产物的长度选择琼脂糖凝胶和聚丙烯酰胺凝胶。

4. RNA 转录产物的分析和检测。

a. 紫外吸收定量分析：

通过测定 A260 计算体外转录获得的 RNA 的量，通过 A260/280 和 A260/A230 来判断获得的 RNA 的纯度。对于单链 RNA，1OD 对应的 RNA 浓度为 40 µg/ml。

b. 转录产物的凝胶电泳分析：

为了评估转录产物的长度，完整性和产量，可以使用适当的变性琼脂糖凝胶或变性聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分析。大于 200 nt 的转录产物可以使用变性琼脂糖凝胶进行电泳分析。小于 200 nt 的转录产物可以使用变性聚丙烯酰胺凝胶 (5-15%) 进行电泳分析。凝胶电泳都应在变性条件下进行，以最大程度地减少 RNA 二级结构对电泳迁移率的影响。

c. RNA 产物的检测：

本试剂盒转录合成的带生物素标记的 RNA 探针可以使用荧光基团、酶或抗体偶联的链霉亲和素 (Streptavidin) 进行检测。