植生优谷®
RNA生物农药技术专家

High Yield T7 Fluorescein RNA Transcription Kit（SJ003）

一、产品概述

高产量 T7 Fluorescein RNA 转录试剂盒是专门用于体外转录中产生随机 Fluorescein 修饰 RNA 的试剂盒，本试剂盒通过优化的反应缓冲液和 T7 RNA 聚合酶可将 Fluorescein-12-UTP 有效地结合到 RNA 中，代替其天然对应物 UTP，所得到的 Fluorescein 修饰的 RNA 可通过荧光光谱法检测。每个标准反应以 1 μg 对照模板可产生 60 ~120 μg Fluorescein 修饰的 RNA，每个试剂盒可产生高达 2.4 mg Fluorescein 修饰的 RNA。

二、产品组分

产品编号	产品名称	规格（20 rxns） SJ003
SJ003-A	T7 RNA Polymerase Mix	40 μL
SJ003-B	10 ×Transcription Buffer	40 μL
SJ003-C	NTP Labeling Mix	80 μL
SJ003-D	Fluorescein-12-UTP	20 μL
SJ003-E	Control Template	10 μL
SJ003-F	Nuclease-free Water	500 μL

注：Control Template 为 400 bp 双端含有 T7 启动子序列的 DNA 片段，浓度为 0.5 μg/μL。

三、储存条件

-30 ~ -15 ℃保存，≤ 0 ℃运输。

四、注意事项

1. 实验时佩戴一次性手套及口罩，规范操作。
2. 使用 RNase-free 的实验耗材，防止产物被 RNase 降解。
3. 转录模板需要纯化，并确保条带单一。

五、反应体系

1. 制备以下反应混合物：

组分	用量
T7 RNA Polymerase Mix	2 μL
10 × Transcription Buffer	2 μL
NTP Labeling Mix	4 μL
Fluorescein-12-UTP	1 μL
Linear template DNA	1 μg
Nuclease-free Water	To 20 μL

2. 将反应溶液轻轻混合均匀，并于避光条件下 37 ℃ 反应 2 ~ 8 小时。

   注意：若合成的是 dsRNA，37℃ 反应结束后，请于避光条件下 72 ℃ 孵育 10 min，再于室温条件下放置 20 min，以退火形成 Fluorescein 修饰的 dsRNA。

3. 在反应体系中加入 1 μL 的 DNase I（2 U/μL），37 ℃孵育 15 min，去除 DNA 模板。（可选）

   注意：相对于产物 RNA，模板 DNA 的含量非常低，一般不用去除，也可以用 DNase I 消化。

4. 合成的 Fluorescein 修饰的 RNA 经电泳分析、纯化后，可用于下游实验。

六、产物纯化

1. **磁珠纯化：植生优谷 RNA 纯化试剂盒（磁珠法）（PU002）**，能够在 30 分钟内获得高纯度 RNA。在有效去除游离核苷酸、蛋白质等杂质的同时，能减少实验过程中有机试剂的使用。
2. **苯酚/氯仿抽提及乙醇沉淀：**加入等体积苯酚/氯仿混合物抽提；再用氯仿抽提两次；用两倍体积的无水乙醇沉淀 RNA；用 70 %乙醇洗涤 RNA 沉淀两次；用 Nuclease-free Water 重悬沉淀、溶解 RNA。
3. **色谱柱法：**色谱柱可以去除非结合核苷酸、蛋白及盐分。如果产物超过柱子结合能力，则需要额外色谱柱。

七、dsRNA 定量

紫外吸收法：Fluorescein 修饰的 RNA 浓度可以通过 260 nm 处吸光度值进行测量。游离核苷酸会影响定量的准确性，采用此方法前请先进行 RNA 纯化。