

T7 Transkriptionskit

(Bakteriophage T7 aus *Escherichia coli*)

T7 RNA Polymerase

- modifiziert, optimiert -
(Bakteriophage T7, *E. coli*)

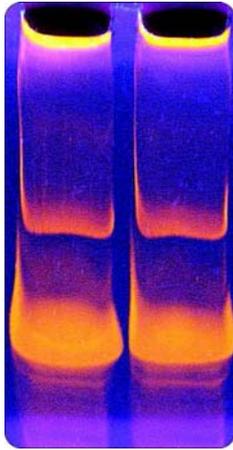
Artikel Nr.	Größe
E0901-01	25 x 25 µl Reaktionen
E0901-02	50 x 25 µl Reaktionen

Definition der Einheit:

Eine Einheit ist die Menge des Enzyms, das erforderlich ist, um 1 nmol markiertes UTP in 1 Stunde bei 37°C in die säureunlösliche Form zu überführen.

Lagerbedingungen:

Lagerung bei -20°C



T7 Transkription einer 400 nt RNA Abschrift mit dem EURx T7 Transkriptions-Kit. 3 µl transkribierter RNA wurde auf ein 7 % [w/v] Polyacrylamid-Gel mit 8 M Harnstoff aufgetragen. Obere Bande, DNA-Vorlage (Template); untere Bande, transkribiertes RNA Produkt mit 400 nt Länge.

Qualitätskontrolle:

Alle Chargen werden auf Endonuklease-, Exonuklease-, unspezifische RNase sowie einzel- und doppelsträngige DNase-Aktivitäten geprüft. Typische Präparationen sind zu mehr als 95 % rein, wie aufgrund von SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese beurteilt werden kann

Literatur:

1. Chamberlin, M. und Ring, J. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 2235-2244.
2. Tabor, S. und Richardson, C.C. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 1074-1078.
3. Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second edition*, pp. 10.27-10.37, Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour.

Das T7 Transkriptionskit enthält eine modifizierte T7 RNA Polymerase mit erhöhter Toleranz gegenüber modifizierten Nukleotiden. Für radioaktive wie nichtradioaktive Markierungen und für RNA Synthesen im präparativen Maßstab.

Beschreibung:

- T7 Transkription reagiert sehr sensibel auf die Qualität und Reinheit aller an der Reaktion beteiligten Komponenten. Eine einzige minderwertige Komponente senkt die Ausbeute im Bereich mehrerer Größenordnungen. Dieses T7 Transkriptionskit enthält alle benötigten, ausgesucht hochwertigen Reaktionskomponenten und garantiert maximale RNA-Ausbeuten ohne Kompromisse.
- DNA-abhängige RNA-Polymerase mit hoher stringenter Spezifität für die Promotorsequenz des T7-Phagen (1)
- Ultrareines rekombinantes Enzym.
- Synthetisiert in vitro mit hoher Effizienz RNA-Transkripte nahezu alle DNA-Abschnitte, die stromabwärts (in 3'-Richtung, downstream) von einem T7 Promotor liegen (2).
- Geeignet zur Präparation markierter einzelsträngiger RNA-Proben mit hoher spezifischer Aktivität (3).
- Transkripte können als Proben in Hybrisierungsreaktionen, als Vorlagen (templates) für in-vitro Translationsreaktionen, als Substrate in auf RNA wirkenden Prozessen oder zur Lokalisierung von Exons und Introns in genomischer DNA (Exon / Intron Kartierung) eingesetzt werden.

Lagerungspuffer (Storage Buffer):

20 mM Kalium-Phosphat (pH 7.7), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM Dithiothreitol und 50 % [v/v] Glycerin.

Bestandteile des Kits:

Komponente	25 Rktn.	50 Rktn.
5x Reaktionspuffer	150 µl	300 µl
NTPs Mix, je 25 mM	50 µl	100 µl
DTT [100 mM]	50 µl	100 µl
Thermostabile Pyrophosphatase 2.5 U/µl	12.5 µl	25 µl
T7 RNA Polymerase	12.5 µl	25 µl
RNase-freies Wasser	1 ml	1 ml
RNA-Ladepuffer	50 µl	100 µl

T7 in-vitro Transkription - Protokoll.

Die Reaktion sollte bei Raumtemperatur, nicht auf Eis, zusammengefügt werden. Hierdurch wird ein Ausfällen der DNA-Vorlage (DNA Template) durch Spermidin (im 5x Reaktionspuffer enthalten) vermieden.

5 µl	T7 RNA Polymerase 5 x Reaktionspuffer (reaction buffer)
1.8 µl	NTP mix, je 25 mM
1.25 µl	DTT [100 mM]
0.5 µl	Thermostabile Pyrophosphatase [2,5 U/µl] = 1,25 U
1-2 µg	DNA Vorlage (Template)*
0.5 µl	T7 RNA Polymerase**
@25 µl	RNase-freies Wasser

Gesamtes Reaktionsvolumen 25 µl

Inkubation für 2 Stunden bei 37°C.

Anschließend wird der Erfolg der Reaktion durch Auftrag des Transkriptionsproduktes auf einem geeigneten Polyacrylamidgel unter denaturierenden Bedingungen überprüft.: Auftragen von 10 µl der Reaktion mit 3 µl RNA Ladepuffer (RNA loading buffer).

* Eine wichtige Voraussetzung für eine hohe Reaktionsausbeute ist eine hohe Reinheit der DNA-Vorlage. Im Reaktionsansatz sollte keine RNase A - Kontamination (z.B. aus unzureichender Plasmid-Aufreinigung) verbleiben, um eine Leerlauf-Transkription zu vermeiden. Zwischen Kits verschiedener Hersteller zeigen sich deutliche Unterschiede hinsichtlich RNase freier Aufreinigung von Plasmid-DNA. Für eine RNase freie Plasmidaufreinigung hat sich in der Praxis unser - eigens für diese Anwendung getestetes - Plasmid-Kit bestens bewährt (Best.Nr. E3500). Wenn ein PCR-Fragment als T7 DNA-Vorlage dient, sollten verbliebene Primer vor der Reaktion vollständig entfernt werden (Empfohlene Vorgehensweise: Aufreinigung der Vorlage aus Agarose Gelen mit dem AgaroseOUT DNA Kit, Best.Nr. E3540).

**Für eine effiziente Markierung (Labelling) wird 0.2 µl T7 RNA Polymerase benötigt. Für RNA-Transkription im präparativen Maßstab werden höhere Enzymmengen benötigt.