

# T7 RNA Polymerase

(Bakteriophage T7 aus *Escherichia coli*)

## T7 RNA Polymerase

(Bakteriophage T7 aus *Escherichia coli*)

Artikel Nr.	Größe
E1290-01	5 000 Einheiten
E1290-02	25 000 Einheiten

### 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

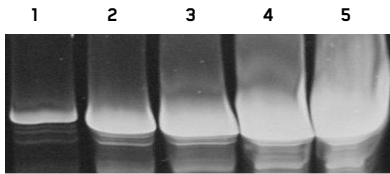


Abb. T7 RNA Transkription einer RNA von 400 nt Länge.

5 µl einer T7 Transkriptions-Reaktion wurden mit 5 µl eines 2 x RNA Auftragspuffers gemischt und auf ein 7 % Polyacrylamid / 8 M Harnstoff - Gel geladen. Das Gel wurde mittels Ethidiumbromid angefärbt.

1 - 5: T7-Transkription mit 50, 100, 200, 400 und 800 U T7 RNA Polymerase.

### 5 x Reaktions-Puffer:

0,4 M HEPES (pH 7,5), 16 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM Spermidin, 0,6 mg/ml Rinderserumalbumin.

### Lagerungspuffer (Storage Buffer):

20 mM Kalium-Phosphat (pH 7,5), 0,1 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM Dithiothreitol, 100 µg/ml Rinderserum-Albumin und 50 % [v/v] Glycerin.

**Modifizierte T7 RNA-Polymerase mit erhöhter Toleranz gegenüber modifizierten Nucleotiden. Besonders geeignet zur Erstellung einzelsträngiger RNA-Abschriften, für radioaktive und nicht-radioaktive Markierungen sowie für die präparative RNA-Synthese. Ein Primer wird nicht benötigt, da das Enzym an eine Erkennungssequenz mit hoher Spezifität bindet**

### Beschreibung:

- 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 mapping) eingesetzt werden.

### T7 In vitro Transkription, Protokoll für Beispielreaktion

Komponente	Endkonzentration /-menge	Volumen je Reaktion
5 x Reaktionspuffer	1 x	10 µl
NTP Mix [25 mM je NTP]	1.875 mM je NTP	3.75 µl*
DTT [100 mM]	2.5 mM	1.25 µl
Thermostabile Pyrophosphatase [20 U/µl] (Best. Nr. E1267)	2.4 U	0.12 µl
DNA-Template für T7 Transkription	2 µg	Variabel
T7 RNA Polymerase	50 - 800 U**	Variabel
RNase freies H <sub>2</sub> O		@ 50 µl

\* je nach Konzentration der Stammlösung.

\*\* 50 U ist ausreichend für die meisten Markierungsreaktionen (Labeling), mehr als 50 U werden lediglich für präparative Ansätze benötigt.

Inkubation bis zu zwei Stunden bei 37°C. Anschließend Transkription auf einem geeigneten denaturierenden Polyacrylamid-Gel überprüfen. 5 µl der Reaktion werden gemischt mit 5 µl eines RNA-Ladepuffers (2,6 M Harnstoff, 2 x TBE, 0,02 % [w/v] BPB, 0,2 % [w/v] XCB, 66 % [v/v] Formamid).

### Reaktionsbedingungen der Qualitätskontrolle:

40 mM Tris-HCl (pH 7,9 bei 22°C), 8,0 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM Dithiothreitol, 4 mM Spermidin-(HCl)<sub>3</sub>, 2,5 µg T7 DNA, 0,4 mM jeweils von ATP, CTP, GTP und 0,4 mM [α-<sup>32</sup>P]UTP. Inkubation bei 37°C für 10 Minuten in einem Reaktionsvolumen von 50 µl.

### 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.*