

Информация о продукте

Набор для высокоэффективного синтеза РНК *in vitro* (T7-tr-20, T7-tr-100)

Описание продукта

Набор T7-transcription (T7-tr20, T7-tr100) предназначен для постановки реакции транскрипции *in vitro*. Принцип действия набора основан на ферментативном синтезе молекул РНК на ДНК-матрице при помощи ДНК-зависимой РНК-полимеразы бактериофага T7 (Рисунок 1). В состав набора входят все необходимые реагенты для получения высокого выхода РНК-транскриптов за минимальное время реакции.

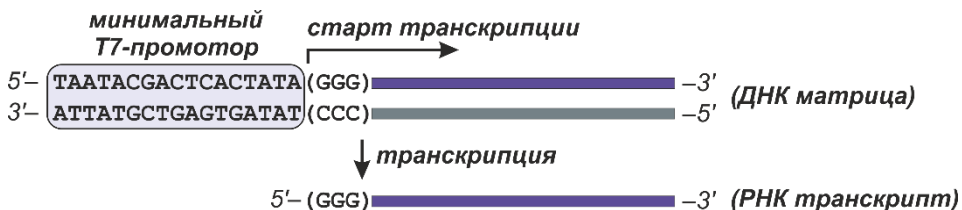


Рис.1. Схема строения матрицы для транскрипции с помощью T7 РНК-полимеразы (включая минимальный T7-промотор) и синтезируемого РНК-транскрипта.

Примечание: добавление вставки 5'-(GGG)-3' со стороны 5'-конца последовательности, которая должна быть транскрибирована, уменьшает вероятность abortивной транскрипции.

Полученная в результате транскрипции РНК может быть использована для изучения структуры и функций РНК, для исследования механизмов РНК-интерференции, для систем геномного редактирования в качестве направляющей РНК, для трансфекции клеток в присутствии трансфицирующих агентов, для трансляции *in vitro* и др.

Примечание: помимо стандартной РНК набор позволяет синтезировать РНК с кэп-структурой на 5'-конце и РНК с природными (псевдоурдин, 5-метилцитидин, N6-метиладенозин) и химически модифицированными нуклеотидами (биотин-, флюоресцеин-, аминоксил-НТФ).

Состав набора

	T7-tr-20 (20 реакций)	T7-tr-100 (100 реакций)
T7 РНК-полимераза	25 мкл	125 мкл
Смесь рНТФ	45 мкл	230 мкл
(×5) Буфер для T7-транскрипции	240 мкл	1,2 мл
(×25) ДТТ	50 мкл	250 мкл
Стерильная вода	1 мл	5 мл

T7 РНК-полимераза*

150 е.а./мкл в 40 мМ Трис-НСl (рН 7,4), 10 мМ NaCl, 15 мМ MgCl₂, 2 мМ спермидин 10 мМ ДТТ, 50% глицерин

смесь рНТФ

25 мМ каждого рНТФ (рАТФ, рЦТФ, рГТФ и рУТФ)

(×5) Буфер для T7-транскрипции

200 мМ Трис-НСl (рН 7,9), 30 мМ MgCl₂, 50 мМ NaCl, 10 мМ спермидин

(×25) ДТТ

250 мМ ДТТ

Стерильная вода

***Определение единицы активности:** за единицу активности принимается количество фермента, катализирующее включение 1 нмоль рНТФ в кислотонерастворимую фракцию за 1 час при 37 °С.

Материалы и оборудование необходимые для работы

Термостат способный достигать температуры 37 °С.

Полипропиленовые микроцентрифужные пробирки на 0,6-1,5 мл.

Рекомендуемый протокол

1. Подготовка реакционной смеси

Добавить в микроцентрифужную пробирку и перемешать следующие компоненты:

Компонент	Исходная конц.	Финальная конц.	$\sum V_{\text{смеси}} = 50$ мкл
(×5) Буфер для T7-транскрипции	(×5)	(×1)	10 мкл
(×25) ДТТ	(×25)	(×1)	2 мкл
Смесь рНТФ	25 мМ каждого рНТФ	1 мМ каждого рНТФ	2 мкл
ДНК-матрица с T7-промотором			10 – 1000 нг
T7 РНК-полимераза	150 е.а./мкл	3 е.а./мкл	1 мкл
Стерильная вода			довести $V_{\text{смеси}}$ до 50 мкл

Примечание: в качестве матрицы для *in vitro* транскрипции может быть использована фактически любая ДНК (линеаризованная плазмидная ДНК, ПЦР-продукт), содержащая двуцепочечный промотор бактериофага T7 со стороны 5'-конца последовательности, которая должна быть транскрибирована.

Примечание: рекомендуется добавить 50 е.а. ингибитора РНКаз на 50 мкл реакционной смеси (может быть существенно при работе с низким количеством ДНК-матрицы (<100 нг)).

2. Инкубация

Инкубировать реакционную смесь при 37 °С в течении 2-х часов.

Примечание: при работе с низким количеством ДНК-матрицы (<100 нг) для увеличения выхода реакции транскрипции рекомендуется проводить длительную инкубацию реакционной смеси (в течении ночи).

3. Дополнительная обработка ДНКазой

Для удаления ДНК-матрицы к продуктам реакции транскрипции *in vitro* добавить 2 е.а. ДНКазы на 1 мкг ДНК-матрицы и инкубировать при 37 °С в течении 15 минут.

Анализ синтезированной РНК.

Целостность и протяженность полученной в результате транскрипции *in vitro* РНК можно проверить с помощью гель-электрофореза в 1-2,5% агарозном или 8-10% денатурирующем (7 М мочевина) полиакриламидном геле.

Для очистки РНК из реакционной смеси можно использовать гель-фильтрацию, высокоэффективную жидкостную хроматографию, фенол-хлороформную экстракцию.

Последовательность очищенной из реакционной смеси РНК можно проанализировать методом секвенирования кДНК по Сэнгеру.

Количество очищенной РНК можно оценить с помощью УФ-спектрометрии. Характерный максимум поглощения для РНК: при $\lambda = 260 \text{ нм}$. Для оценки концентрации РНК (мкг/мл) применяется следующая формула: $A_{260} \times \text{разбавление} \times 40 \text{ мкг/мл}$. Характерные соотношения оптической плотности достаточно чистой РНК: $A_{260}/A_{280} \geq 1.8-2.0$, $A_{260}/230 \geq 1.9$.

Условия хранения

Хранить при температуре -20°С. Срок годности: 12 месяцев.