

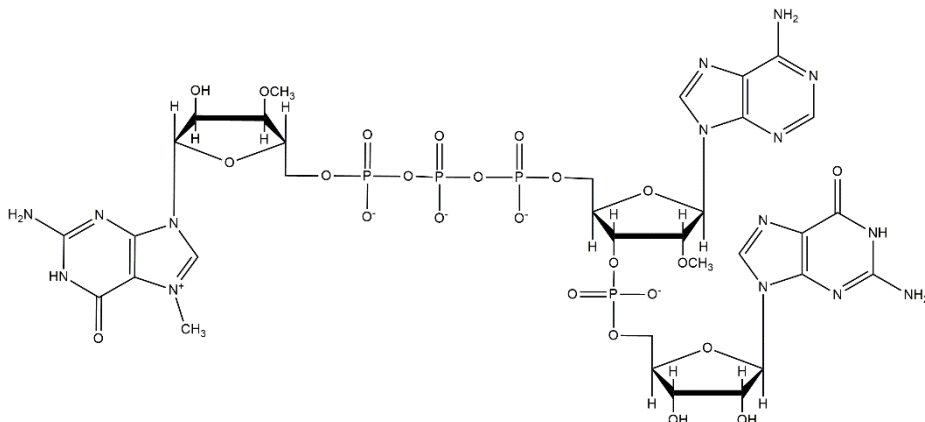
Набор для синтеза мРНК *in vitro* (с ΨТР и м5СТР с m7GmAmG)

Кат. номер AG-mRNA-YC-20

Описание:

Набор для синтеза мРНК *in vitro* (с ΨТР и м5СТР с m7GmAmG) предназначен для постановки реакции транскрипции *in vitro* для получения Cap-1 экзипированной мРНК, содержащей в структуре модифицированные нуклеотиды: псевдоурин (Ψ), 5-метилцитидин (m5C). Принцип действия набора основан на ферментативном синтезе молекул РНК на ДНК-матрице при помощи ДНК-зависимой РНК-полимеразы бактериофага T7.

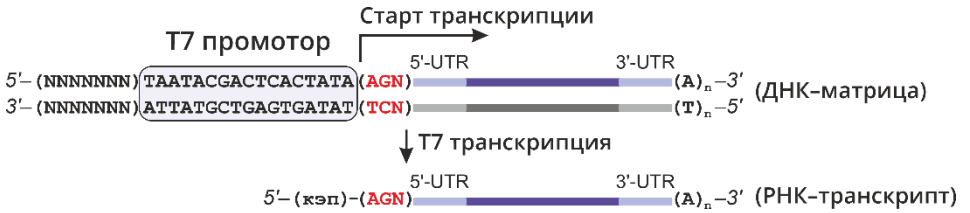
Молекулярная структура аналога кэпа m7GmAmG



Функциональные мРНК должны содержать следующие элементы: кэп на 5'-конце, 5'-UTR, правильно ориентированная кодирующая последовательность, 3'-UTR, поли(A)-хвост на 3'-конце. Благодаря тому, что включение аналога кэпа m7GmAmG в структуру мРНК возможно только в правильной ориентации, экзипированные мРНК обладают 100% трансляционной активностью. Более того, постановка реакции транскрипции с использованием тринуклеотидного аналога кэпа m7GmAmG предотвращает потерю в выходе РНК-транскрипта, характерную для протоколов с применением аналога кэпа ARCA. Наличие модифицированных нуклеотидов: псевдоуридина и 5-метилцитидина – повышает стабильность и снижает иммуногенность мРНК.

Полученная в результате транскрипции мРНК может быть использована для изучения функций мРНК, для микроинъекций, для трансфекции клеток, для трансляции *in vitro* и др.

Синтез РНК-транскрипта на ДНК-матрице с помощью Т7 РНК-полимеразы



Примечание! Минимальная последовательность промотора Т7:

5'-NNNNNNNTAATACGACTCACTATAAGN...-3'.

Первые основания, включаемые в РНК: AG.

Примечание! Использование ДНК-матрицы, кодирующей поли(А)-хвост на 3'-конце транскрипта, позволяет получить Cap-1 экпированную полиаденилированную мРНК в ходе одной 2-х часовой реакции. Альтернативный путь полиаденилирования мРНК: пост-транскрипционное добавление поли(А)-хвоста с помощью поли(А)-полимеразы.

Состав набора:

Компонент	AG-mRNA-УС-20 (20 реакций)
(x5) Буфер для синтеза мРНК	240 мкл
(x10) ДТТ	120 мкл
Т7 РНК-полимераза	70 мкл
АТФ	120 мкл
ΨТР	120 мкл
m5СТР	120 мкл
GTP	120 мкл
m7GmAmG	120 мкл
Стерильная вода	1 мл
(x5) Буфер для синтеза мРНК Буфер на основе HEPES, соли и другие компоненты	Т7 РНК-полимераза 300 е.а./мкл в буфере для хранения, 50% (v/v) глицерин
(x10) ДТТ 100 мМ ДТТ	АТФ, ΨТР, m5СТР, GTP 30 мМ каждого NTP
Стерильная вода	m7GmAmG 30 мМ m7GmAmG

Материалы и оборудование, необходимые для работы:

- Микроцентрифужные пробирки на 0,6 или 1,5 мл.
- Термостат с возможностью поддержания температуры 37°C.
- Микроцентрифуга.

Примечание! Организация рабочего пространства и использование растворов, гарантирующие отсутствие РНКаз, имеет решающее значение для успешного синтеза мРНК. Рекомендуется использовать ингибитор РНКаз на этапах синтеза и последующей работы с мРНК.

Сопутствующая продукция

- ДНКазы (термолabile) (EM-100, Биолабмикс).
- Ингибитор РНКаз (RI-0020, Биолабмикс).
- Уридин-5'-трифосфат (UTP) (N-gU0100, Биолабмикс).
- Цитидин-5'-трифосфат (CTP) (N-gC0100, Биолабмикс).
- Буфер для нанесения образцов РНК на гель «ФриК» (D-3001, Биолабмикс).
- Набор для выделения РНК на колонках (RU-10, Биолабмикс).

Протокол синтеза мРНК

1. Подготовка реакционной смеси

Поместите T7 РНК-полимеразу на лед. Разморозьте при комнатной температуре остальные компоненты набора, перемешайте и сбросьте капли коротким центрифугированием. В микроцентрифужные пробирки на 0,6 или 1,5 мл добавьте следующие компоненты:

Компонент	Концентрация	Финальная концентрация	Объем
(x5) Буфер для синтеза мРНК	(x5)	(x1)	10 мкл
(x10) ДТТ	(x10)	(x1)	5 мкл
АТР	30 мМ	3 мМ	5 мкл
ΨТР	30 мМ	3 мМ	5 мкл
m5СТР	30 мМ	3 мМ	5 мкл
GТР	30 мМ	3 мМ	5 мкл
m7GmAmG	30 мМ	2,4 мМ	4 мкл
T7 РНК-полимераза	300 е.а./мкл	18 е.а./мкл	3 мкл
ДНК-матрица	вариабельная	вариабельная	0,5–2 мкг
Стерильная вода			до 50 мкл
Общий объем реакции			50 мкл

2. Инкубация

Тщательно перемешайте реакционную смесь пипетированием. Инкубируйте реакционную смесь при 37°C в течение 2-х часов.

3. Обработка ДНКазой для удаления ДНК-матрицы

Добавьте 2 е.а. ДНКазы I на 1 мкг ДНК-матрицы к реакционной смеси, перемешайте и инкубируйте при 37°C в течение 15 минут. Обработка ДНКазой необязательна, если ДНК-матрица не мешает в последующих экспериментах.

Примечание! Протокол синтеза мРНК оптимизирован для 0,5–2 мкг ДНК-матрицы; конечной концентрации каждого NTP 3 мМ; соотношения m7GmAmG:GTP, равном 4:5; полной замены UTP и CTP на ΨТР и m5СТР, соответственно.

Примечание! Реакция объемом 50 мкл дает выход около 30–60 мкг Cap-1-эпированной мРНК с 1 мкг ДНК-матрицы после 2-х часов инкубации. Количество получаемой мРНК может варьироваться в зависимости от ДНК-матрицы (дизайн промотора, длина последовательности, формирование вторичной структуры).

Индивидуальная оптимизация протокола синтеза мРНК

В качестве матрицы для транскрипции *in vitro* можно использовать как линейаризованную плазмидную ДНК, так и ПЦР-продукт, содержащие T7 промотор со стороны 5'-конца последовательности, которая должна быть транскрибирована. В случае плазмиды, ДНК должна быть полностью линейаризована. Рекомендуется очищать ДНК-матрицу перед постановкой реакции транскрипции.

В зависимости от последовательности и конечного применения синтезируемой мРНК индивидуальная оптимизация отдельных этапов протокола может улучшить как выход реакции, так и биологическую функцию мРНК (например, изменение времени инкубации; изменение количества ДНК-матрицы; регуляция соотношения UTR:ΨTR, CTR:m5CTP).

При работе с короткими ДНК-матрицами (< 0.5 т.п.н.) рекомендуется увеличить время инкубации до 4-х часов. Безопасно инкубировать реакцию при 37°C в течение 16-и часов (ночь).

Анализ синтезированной мРНК

Целостность и длину полученной в результате транскрипции *in vitro* мРНК можно проверить с помощью гель-электрофореза в 1–2,5% агарозном геле.

Очистить мРНК из реакционной смеси можно с помощью переосаждения LiCl, фенол-хлороформной экстракции, высокоэффективной жидкостной хроматографии, а также с использованием методов, основанных на спин-колонках.

Количество очищенной мРНК можно оценить с помощью УФ-спектрометрии. Характерный максимум поглощения для РНК: при $\lambda = 260$ нм. Для оценки концентрации РНК (мкг/мл) применяется следующая формула: $A_{260} \times \text{разбавление} \times 40$ 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°C. Срок годности: 12 месяцев