

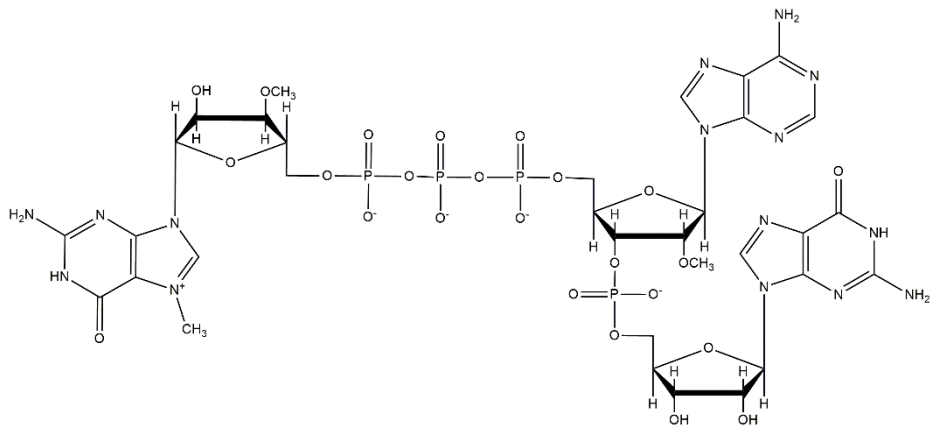
## Набор для синтеза мРНК *in vitro* (с m7GmAmG)

Кат. номер AG-mRNA-20

### Описание:

Набор для синтеза мРНК *in vitro* (с m7GmAmG) предназначен для постановки реакции транскрипции *in vitro* для получения Cap-1 кэпированной мРНК. Принцип действия набора основан на ферментативном синтезе молекул РНК на ДНК-матрице при помощи ДНК-зависимой РНК-полимеразы бактериофага T7.

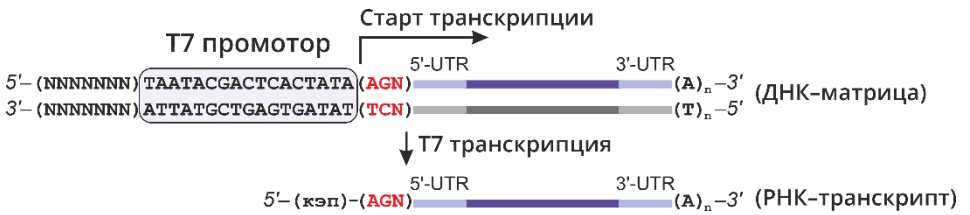
Молекулярная структура аналога кэпа m7GmAmG



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, кэпированные 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.

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-20 (20 реакций)
(×5) Буфер для синтеза мРНК	240 мкл
(×10) ДТТ	120 мкл
Т7 РНК-полимераза	70 мкл
АТФ	120 мкл
УТФ	120 мкл
СТФ	120 мкл
ГТФ	120 мкл
m7GmAmG	120 мкл
Стерильная вода	1 мл
(×5) Буфер для синтеза мРНК Буфер на основе HEPES, соли и другие компоненты	<b>Т7 РНК-полимераза</b> 300 е.а./мкл в буфере для хранения, 50% (v/v) глицерин
(×10) ДТТ 100 мМ ДТТ	<b>АТФ, УТФ, СТФ, ГТФ</b> 30 мМ каждого NTP
Стерильная вода	<b>m7GmAmG</b> 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).
- Псевдоуридин-5'-трифосфат (TPU-0050, Биолабмикс).
- 5-метилцитидин-5'-трифосфат (TMC-0050, 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
АТФ	30 мМ	3 мМ	5 мкл
УТФ	30 мМ	3 мМ	5 мкл
СТФ	30 мМ	3 мМ	5 мкл
ГТФ	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.

**Примечание!** Реакция объемом 50 мкл дает выход около 30–60 мкг Cap-1 экпированной 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 линеаризованную 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 линеаризована. 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; включение модифицированных нуклеотидов, таких как m5CTP или ΨTP).

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