



Биолабмикс®

Набор для высокопроизводительного синтеза мРНК *in vitro* (с Ψ TP и m5CTP, с m7GmAmG)

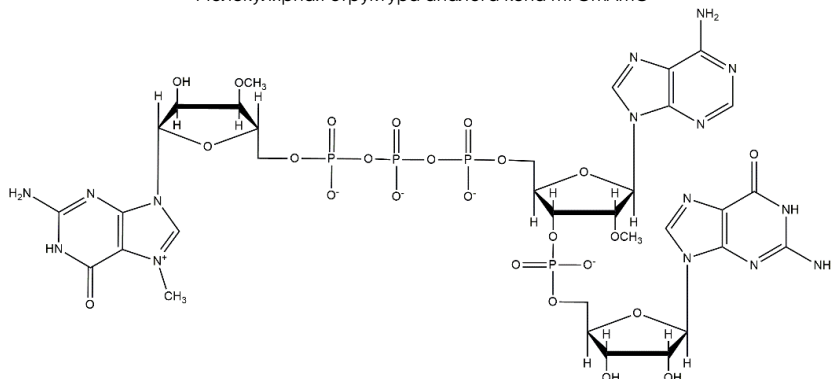
Кат. номер AG-High-mRNA-YC-20

Описание:

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

Набор рассчитан на 20 реакций объёмом по 50 мкл. Одна стандартная реакция обеспечивает синтез до 300 мкг РНК с 2 мкг контрольной ДНК-матрицы. Общий выход РНК с одного набора – до 6 мг.

Молекулярная структура аналога кэпа m7GmAmG



Функциональные мРНК должны содержать следующие элементы: кэп на 5'-конце, 5'-UTR, правильно ориентированная кодирующая последовательность, 3'-UTR, поли(А)-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. Наличие модифицированных нуклеотидов: псевдоуридина и 5-метилцитидина – повышает стабильность и снижает иммуногенность мРНК.

Синтез РНК-транскрипта на ДНК-матрице с помощью T7 РНК-полимеразы



Важно! Минимальная последовательность промотора T7:

5'-NNNNNNNNTAATACGACTCACTATAAGN...-3':

Обязательные первые основания: **AGN**.

Примечание: использование ДНК-матрицы, кодирующей поли(A)-хвост на 3'-конце транскрипта, позволяет получить Cap-1 экпированную полиаденилированную мРНК в ходе одной реакции. Альтернативный путь полиаденилирования мРНК: посттранскрипционное до-бавление поли(A)-хвоста с помощью поли(A)-полимеразы.

Состав набора:

Компонент	AG-High-mRNA-YC-20 20 реакций
(x5) Буфер для синтеза мРНК (High)	240 мкл
T7 РНК-полимераза	120 мкл
АТФ	90 мкл
УТФ	90 мкл
m5СТР	90 мкл
GTP	90 мкл
m7GmAmG	90 мкл
Стерильная вода	1 мл
Контрольная ДНК-матрица hMGFP-AG	20 мкл
ЭДТА	1,2 мл

(x5) Буфер для синтеза мРНК (High)

Буфер на основе HEPES, соли и другие компоненты

T7 РНК-полимераза

250 е.а./мкл, содержит пирофосфатазу и ингибитор РНКаз, 50% (v/v) глицерин

АТФ, УТФ, m5СТР, GTP

100 мМ каждого NTP

m7GmAmG

100 мМ аналога кэпа m7GmAmG

Контрольная ДНК-матрица hMGFP-AG

Линеаризованная плазмида hMGFP-AG
1 т.н., 0,25 мкг/мкл
(первые основания РНК: AG)

ЭДТА

50 мМ ЭДТА

Стерильная вода

Вода, обработанная ДЭПК

Материалы и оборудование, необходимые для работы:

- пробирки на 0,2; 0,6 или 1,5 мл;
- амплификатор или термостат с возможностью поддержания температуры 37 °С;
- микроцентрифуга.

Важно! 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.

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 пробирку добавьте следующие компоненты:

Компонент	Концентрация	Финальная концентрация	Объем
(x5) Буфер для синтеза мРНК (High)	(x5)	(x1)	10 мкл
АТР	100 мМ	7,5 мМ	3,75 мкл
ΨТР	100 мМ	7,5 мМ	3,75 мкл
m5СТР	100 мМ	7,5 мМ	3,75 мкл
GTP	100 мМ	7,5 мМ	3,75 мкл
m7GmAmG	100 мМ	6,0 мМ	3 мкл
T7 РНК-полимераза	250 е.а./мкл	25 е.а./мкл	5 мкл
ДНК-матрица	вариабельная	вариабельная	1–4 мкг
Стерильная вода			до 50 мкл
Общий объем реакции			50 мкл

Важно! Протокол синтеза мРНК оптимизирован для 2 мкг ДНК-матрицы и конечной концентрации каждого NTP 7,5 мМ; соотношения m7GmAmG:GTP, равном 4:5; полной замены UTP и СТР на ΨТР и m5СТР, соответственно. Реакция объемом 50 мкл дает выход около 150–300 мкг мРНК с 2 мкг ДНК-матрицы. Количество получаемой мРНК может варьироваться в зависимости от ДНК-матрицы (дизайн промотора, длина последовательности, формирование вторичной структуры).

2. Инкубация

Тщательно перемешайте реакционную смесь пипетированием. Инкубируйте реакционную смесь при 37 °С в течение 2–4х 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 °С в течение 15 минут. Обработка ДНКазой необязательна, если ДНК-матрица не мешает в последующих экспериментах. ДНКаза не входит в состав набора.

Примечание: в ходе реакции транскрипции возможно появление белого осадка пиррофосфата магния. Для его растворения рекомендуется добавить в реакцию 50 мМ ЭДТА до конечной концентрации 25 мМ (равный объем реакции), тщательно перемешать реакционную смесь, при необходимости инкубировать при 37 °С в течение 15 минут.

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 ПЦР-продукта наличие 6–7 п.н. (NNNNNNN) в направлении 5'-конца от начала промотора (TAAATA...): (5'-NNNNNNN TAA TAGCACTCACTATAAGN...-3') – обязательно для связывания T7 РНК-полимеразы с ДНК-матрицей. 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 соотношений m7GmAmG:GTP; UTP:ΨТР; СТР:m5СТР).

При работе с короткими ДНК–матрицами (<0,5 т.п.н.) рекомендуется увеличить время инкубации до 6–8-и часов. Допускается инкубировать реакцию при 37 °С в течение 16-и часов (например, в течение ночи).

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.

Количество неочищенной РНК в реакционной смеси можно оценить с помощью наборов для измерения концентрации РНК на флуориметре типа Qubit.

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 (наборы для выделения ДНК и РНК из реакционных смесей серии DR, ООО «Биолабмикс»).

Количество очищенной мРНК можно оценить, как с помощью флуориметрии, так и с помощью УФ-спектрометрии на спектрофотометре типа NanoDrop. Характерный максимум поглощения для РНК: при $\lambda = 260$ нм. Для оценки концентрации РНК (мкг/мл) применяется следующая формула:

$$C_{\text{РНК}} = A_{260} \times \text{разбавление} \times 40 \text{ мкг/мл.}$$

Характерные соотношения оптической плотности РНК: $A_{260}/A_{280} \geq 1,8-2,0$; $A_{260}/A_{230} \geq 1,9$.

Контрольная реакция:

Контрольная ДНК–матрица hMGFP-AG представляет собой линейаризованную плазмиду, содержащую ген зелёного флуоресцентного белка (hMGFP) под транскрипционным контролем промотора T7. ДНК–матрица hMGFP-AG: иницирующая последовательность AG – используется для контроля реакций транскрипции с включением аналога кэпа m7GmAmG в структуру РНК.

Ожидаемый результат: размер синтезируемого транскрипта ~1,04 кб; выход реакции с 2 мкг контрольной ДНК–матрицы, выполненной по протоколу набора AG-High-mRNA-UC-20, не менее 150 мкг РНК за 2 ч при 37 °С.

Условия хранения и транспортирования:

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

Допускается транспортировка при +4 °С не более суток.

Дополнительные реагенты

- Ингибитор РНКаз (RI-0020)
- Неорганическая пирофосфатаза (E-13002)
- Буфер для нанесения образцов РНК на гель «ФриК» (D-3001)
- Рекомбинантная ДНКаза I (EDI-100)
- Набор Mini для выделения ДНК и РНК из реакционных смесей (DR-50, DR-250)
- Набор Micro для выделения ДНК и РНК из реакционных смесей (DR-50-micro, DR-250-micro)
- Набор Maxi для выделения ДНК и РНК из реакционных смесей (DR-20-maxi)