



## Набор для синтеза мРНК *in vitro*

Кат. номер mRNA-20

### Описание:

Набор для синтеза мРНК *in vitro* предназначен для постановки реакции транскрипции *in vitro* для получения мРНК. 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 100 мкг РНК с 1 мкг контрольной ДНК-матрицы. Общий выход РНК с одного набора – до 2 мг.

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 T7 РНК-полимеразы



**Важно!** Минимальная последовательность промотора T7:

5'-NNNNNNNTAATACGACTCACTATA NNN...-3':

Обязательные первые основания:

при использовании кэп аналога ARCA: NNN = GNN.

при использовании кэп аналога m7GmAmG: NNN = AGN.

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

**Примечание:** набор для синтеза мРНК *in vitro* также позволяет включать в структуру РНК модифицированные нуклеотиды (природные (псевдоуридин, 5-метилцитидин, N6-метиладенозин); химически модифицированные (биотин-, флюоресцеин-, аминоксил-NTP); аналоги кэпа (ARCA, m7GmAmG)).

## Состав набора:

Компонент	mRNA-20 20 реакций
(×5) Буфер для синтеза мРНК	240 мкл
(×10) ДТТ	120 мкл
T7 РНК-полимераза	70 мкл
АТР	120 мкл
УТР	120 мкл
СТР	120 мкл
GTP	120 мкл
Стерильная вода	1 мл
Контрольная ДНК-матрица hMGFP-GG	20 мкл
Контрольная ДНК-матрица hMGFP-AG	20 мкл

### (×5) Буфер для синтеза мРНК

Буфер на основе HEPES, соли и другие компоненты

### T7 РНК-полимераза

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

### АТР, УТР, СТР, GTP

30 мМ каждого NTP

### (×10) ДТТ

100 мМ ДТТ

### Контрольная ДНК-матрица hMGFP-GG

Линейризованная плаزمида hMGFP-GG, 1 т.н., 0,25 мкг/мкл (первые основания РНК: GG)

### Контрольная ДНК-матрица hMGFP-AG

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

### 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
(×5) Буфер для синтеза мРНК	(×5)	(×1)	10 мкл
(×10) ДТТ	(×10)	(×1)	5 мкл
АТР	30 мМ	3 мМ	5 мкл
УТР	30 мМ	3 мМ	5 мкл
СТР	30 мМ	3 мМ	5 мкл
GTP	30 мМ	3 мМ	5 мкл
T7 РНК-полимераза	250 е.а./мкл	15 е.а./мкл	3 мкл
ДНК-матрица	вариабельная	вариабельная	0,5–2 мкг
Стерильная вода			до 50 мкл
Общий объем реакции			50 мкл

**Важно!** Протокол синтеза мРНК оптимизирован для 0.5–2 мкг ДНК–матрицы и конечной концентрации каждого НТР 3 мМ. Реакция объемом 50 мкл дает выход около 50–100 мкг мРНК с 1 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–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 °С в течение 15 минут. Обработка ДНКазой необязательна, если ДНК–матрица не мешает в последующих экспериментах. ДНКаза не входит в состав набора.

## Индивидуальная оптимизация протокола синтеза мРНК

В качестве матрицы для транскрипции *in vitro* можно использовать как линейаризованную плазмидную ДНК, так и ПЦР–продукт, содержащие Т7 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 (ТААТА...): (5'-NNNNNNN ТААТАСГАСТСАСТАТАNNN...-3) – обязательно для связывания Т7 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; включение в структуру РНК модифицированных нуклеотидов).

При работе с короткими ДНК–матрицами (< 0,5 т.п.н.) рекомендуется увеличить время инкубации до 4–х 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:**

Контрольные ДНК-матрицы hMGFP-GG и hMGFP-AG представляют собой линейризованные плазмиды, содержащие ген зелёного флуоресцентного белка (hMGFP) под транскрипционным контролем промотора T7. ДНК-матрица hMGFP-GG: иницирующая последовательность GG – используется для контроля стандартных реакций транскрипции без использования аналогов кэпа, а также реакций с включением аналога кэпа ARCA в структуру РНК. 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 1 мкг контрольной ДНК-матрицы, выполненной по протоколу набора mRNA-20, не менее 50 мкг РНК за 2 ч при 37 °C.

### **Примечание!**

Контрольная реакция, с включением аналога кэпа ARCA в структуру РНК, выполненная по протоколу набора ARCA-mRNA-20, должна давать не менее 20 мкг РНК за 2 ч при 37 °C.

Контрольная реакция, с включением аналога кэпа m7GmAmG (аналог CleanCap AG (3' OMe)) в структуру РНК, выполненная по протоколу набора AG-mRNA-20, должна давать не менее 50 мкг РНК за 2 ч при 37 °C.

### **Условия хранения и транспортирования:**

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

Допускается транспортировка при +4 °C не более суток.

### **Дополнительные реагенты**

- Ингибитор РНКаз (RI-0020)
- Неорганическая пирофосфатаза (E-13002)
- Псевдоуридин-5'-трифосфат (TPU-0050, TPU-0500)
- 5-метилцитидин-5'-трифосфат (TMC-0050)
- Аналог кэпа ARCA (ARCA-0050)
- Аналог кэпа m7GmAmG (AGME-0050)
- 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 (Кат. № DR-50, DR-250)
- Набор Micro для выделения ДНК и РНК из реакционных смесей (Кат. № DR-50-micro, DR-250-micro)
- Набор Maxi для выделения ДНК и РНК из реакционных смесей (DR-20-maxi)