



Общество с ограниченной ответственностью  
«Биолабмикс»  
ИНН 5408278957 КПП 540801001  
630090, Новосибирская обл., г. Новосибирск,  
ул. Инженерная, дом № 28  
Tel/Fax: +7(383)363-51-91, Tel: +7(383)363-22-40  
E-mail: sales@biolabmix.ru

## Набор для проведения T7-транскрипции *in vitro*

Кат. номер T7-tr20, T7-tr100

### Описание:

Набор для проведения T7-транскрипции *in vitro* (T7-tr-20, T7-tr-100) 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).

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.



Рисунок 1. Синтез РНК транскрипта на ДНК матрице с помощью T7 РНК-полимеразы.

**Примечание!** Минимальная последовательность промотора T7:

5'-NNNNNNNTAATACGACTCACTATAGNN...-3'

Первое основание, включаемое в РНК: **G**;

следующие NN: идеально **CG**.

**Примечание!** Набор для проведения T7-транскрипции *in vitro* также позволяет включать в структуру РНК модифицированные нуклеотиды (природные (псевдоуридин, 5-метилцитидин, N6-метиладенозин); химически модифицированные (биотин-, флуоресцеин-, аминоксил-НТФ); аналоги кэпа (ARCA)).

**Состав набора:**

	T7-tr20 (20 реакций)	T7-tr100 (100 реакций)
(x5) Буфер для T7-транскрипции	240 мкл	1,2 мл
(x25) ДТТ	50 мкл	250 мкл
T7 РНК-полимераза	25 мкл	125 мкл
Смесь рНТФ	45 мкл	230 мкл
Стерильная вода	1 мл	4 мл

**(x5) Буфер для T7-транскрипции**

Буфер на основе Трис, соли и другие компоненты

**(x25) ДТТ**

250 мМ ДТТ

Стерильная вода

**T7 РНК-полимераза**

150 е.а./мкл в буфере для хранения, 50% (v/v) глицерин

**Смесь рНТФ**

25 мМ каждого rNTP (rATP, rUTP, rCTP, rGTP)

**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 РНК. Рекомендуется использовать ингибитор РНКаз на этапах синтеза и последующей работы с РНК.

**Сопутствующая продукция**

- ДНКаза (термолабильная) (EM-100, Биолабмикс).
- Ингибитор РНКаз (RI-0020, Биолабмикс).
- Псевдоуридин-5'-трифосфат (TPU-0050, Биолабмикс).
- 5-метилцитидин-5'-трифосфат (TMC-0050, Биолабмикс).
- Аналог кэпа ARCA (ARCA-0050, Биолабмикс).
- Буфер для нанесения образцов РНК на гель «Фрик» (D-3001, Биолабмикс).
- Набор для выделения РНК на колонках (RU-10, Биолабмикс).

**Протокол T7-транскрипции *in vitro***

**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	Коонцентрация	Финальная	Объем
-----------	---------------	-----------	-------

		КОНЦ.	
(×5) Буфер для T7-транскрипции	(×5)	(×1)	10 мкл
(×25) ДТТ	(×25)	(×1)	2 мкл
Смесь рНТФ	25 мМ каждого rNTP	1 мМ каждого rNTP	2 мкл
T7 РНК-полимераза	150 е.а./мкл	3 е.а./мкл	1 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 РНК оптимизирован для 0.5–2 мкг ДНК матрицы; конечной концентрации каждого rNTP 1 мМ.

**Примечание!** Реакция объемом 50 мкл дает выход около 10–30 мкг РНК с 1 мкг ДНК матрицы после 2-х часов инкубации (РНК транскрипт 1.2 т.н.). Количество получаемой РНК может варьироваться в зависимости от ДНК матрицы (дизайн промотора, длина последовательности, формирование вторичной структуры).

### Индивидуальная оптимизация протокола

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.

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 РНК

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

Очистить РНК 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 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:  $A_{260}/A_{280} \geq 1.8-2.0$ ,  $A_{260}/A_{230} \geq 1.9$ .

**Условия хранения:**

Хранить при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ . Срок годности: 12 месяцев.