

Информация о продукте

Набор для синтеза мРНК *in vitro* (с ΨТР и м5СТР с ARCA) ARCA-mRNA-ΨC-20

Описание продукта

Набор для синтеза мРНК *in vitro* (с ΨТР и м5СТР с ARCA) предназначен для постановки реакции транскрипции *in vitro* для получения ARCA-кэпированной мРНК, содержащей в структуре модифицированные нуклеотиды: псевдоуридин (Ψ), 5-метилцитидин (м5С). Принцип действия набора основан на ферментативном синтезе молекул РНК на ДНК-матрице при помощи ДНК-зависимой РНК-полимеразы бактериофага Т7 (Рисунок 1).

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 ARCA в структуру мРНК возможно только в правильной ориентации, кэпированные мРНК обладают 100% трансляционной активностью. 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.

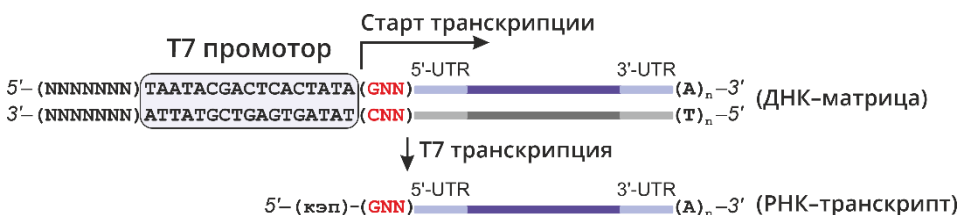


Рисунок 1. Синтез РНК-транскрипта на ДНК-матрице с помощью Т7 РНК-полимеразы.

Примечание! Минимальная последовательность промотора Т7:

5'-NNNNNNN**TAATACGACTCACTATA**GNN...-3'.

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

следующие NN: идеально **CG**.

Примечание! Использование ДНК-матрицы, кодирующей поли(А)-хвост на 3'-конце транскрипта, позволяет получить ARCA-кэпированную 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

Компонент	ARCA-mRNA-УС-20 (20 реакций)
(×5) Буфер для синтеза мРНК	240 мкл
(×10) ДТТ	120 мкл
T7 РНК-полимераза	70 мкл
АТФ	120 мкл
ΨТР	120 мкл
m5СТР	120 мкл
GTP	120 мкл
ARCA	120 мкл
Стерильная вода	1 мл

(×5) Буфер для синтеза мРНК

Буфер на основе HEPES, соли и другие компоненты

(×10) ДТТ

100 мМ ДТТ

Стерильная вода

T7 РНК-полимераза

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

АТФ, ΨТР, m5СТР, GTP

30 мМ каждого NTP

ARCA

30 мМ ARCA

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 (термолабильная) (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 конц.	Объем
(×5) Буфер для синтеза мРНК	(×5)	(×1)	10 мкл
(×10) ДТТ	(×10)	(×1)	5 мкл
АТФ	30 мМ	3 мМ	5 мкл
УТР	30 мМ	3 мМ	5 мкл
m5CTP	30 мМ	3 мМ	5 мкл
GTP	30 мМ	0.6 мМ	1 мкл
ARCA	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 ARCA:GTP, равном 4:1; полной замены UTP и CTP на УТР и m5CTP, соответственно.

Примечание! Реакция объемом 50 мкл дает выход около 10–30 мкг ARCA-кэпированной 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:m5CTR).

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).

Оптимальный баланс между выходом реакции и эффективностью экпирования, как правило, достигается при соотношении ARCA:GTP, равном 4:1 (≈ 80% ARCA-экпированной мРНК). Синтез протяженных мРНК (более 5 т.н.) может требовать более высоких концентраций GTP. Несмотря на то, что уменьшение соотношения ARCA:GTP (например, до 2:1) снижает эффективность экпирования, это может существенно увеличить выход протяженных мРНК.

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 $\lambda = 260 \text{ нм}$. 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: $A_{260}/A_{280} \geq 1.8-2.0$, $A_{260}/230 \geq 1.9$.

Хранение

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

ООО «Биолабмикс»
630090 г. Новосибирск,
Ул., Инженерная, 28
Тел.: (383) 363-51-91
www.biolabmix.ru
sales@biolabmix.ru