



Набор для проведения T7-транскрипции *in vitro*

Кат. номер T7-tr-20, T7-tr-100

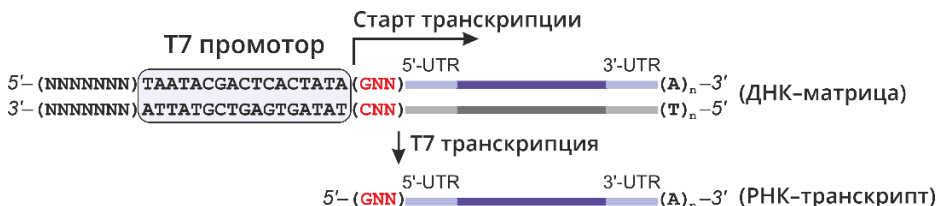
Описание:

Набор для проведения T7-транскрипции *in vitro* (T7-tr-20, T7-tr-100) предназначен для постановки реакции транскрипции *in vitro* для получения РНК. 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 40 мкг РНК с 1 мкг контрольной ДНК-матрицы. Общий выход РНК с одного набора – до 0,8 мг.

Полученная в результате транскрипции РНК может быть использована для изучения функций РНК, 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'-NNNNNNNTAATACGACTCACTATAGNN...-3'.

Обязательные первые основания: GNN

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-, аминоаллил-NTP); аналоги кэпа (ARCA)).

Состав набора:

Компонент	T7-tr-20 (20 реакций)	T7-tr-100 (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
Контрольная ДНК-матрица hMGFP-GG	20 мкл	20 мкл

(x5) Буфер для T7-транскрипции

Буфер на основе Трис, соли и другие компоненты

T7 РНК-полимераза

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

Смесь рНТФ

25 мМ каждого NTP (ATP, UTP, CTP, GTP)

(x25) ДТТ

250 мМ ДТТ

Контрольная ДНК-матрица hMGFP-GG

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

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

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 пробирку добавьте следующие компоненты:

Компонент	Концентрация	Финальная концентрация	Объем
(x5) Буфер для T7-транскрипции	(x5)	(x1)	10 мкл
(x25) ДТТ	(x25)	(x1)	2 мкл
Смесь рНТФ	25 мМ каждого NTP	1 мМ каждого NTP	2 мкл
T7 РНК-полимераза	250 е.а./мкл	5 е.а./мкл	1 мкл
ДНК-матрица	вариабельная	вариабельная	0,5–2 мкг
Стерильная вода			до 50 мкл
Общий объем реакции			50 мкл

Важно! Протокол синтеза РНК оптимизирован для 0,5–2 мкг ДНК-матрицы и конечной концентрации каждого NTP 1 мМ. Реакция объемом 50 мкл дает выход около 20–40 мкг РНК с 1 мкг ДНК-матрицы. Количество получаемой РНК 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°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. ДНКаза не входит в состав набора.

Индивидуальная оптимизация протокола синтеза РНК

В качестве матрицы для транскрипции *in vitro* можно использовать как линейризованную 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 (ТААТА...): (5'-NNNNNNN ТААТАСГАСТСАСТАТАNNN...-3') – обязательно для связывания T7 РНК–полимеразы с ДНК–матрицей. В случае плазмиды, ДНК должна быть полностью линейризована. Рекомендуется очищать ДНК–матрицу перед постановкой реакции транскрипции.

В зависимости от последовательности и конечного применения синтезируемой РНК индивидуальная оптимизация отдельных этапов протокола может улучшить как выход реакции, так и биологическую функцию РНК (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 РНК

Целостность и длину полученной в результате транскрипции *in vitro* РНК 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 РНК 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 РНК 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-GG представляет собой линейризованную плазмиду, содержащую 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.

Ожидаемый результат: размер синтезируемого транскрипта ~1,04 кб; выход реакции с 1 мкг контрольной ДНК-матрицы, выполненной по протоколу набора T7-tr-20/100, не менее 20 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

- Набор для синтеза мРНК in vitro (mRNA-20)
- 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)
- Рекombинантная 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)