


Биолабмикс®

Набор для высокопроизводительного синтеза мРНК *in vitro* (с N1-Ме-ЦТФ, с m7GmAmG)

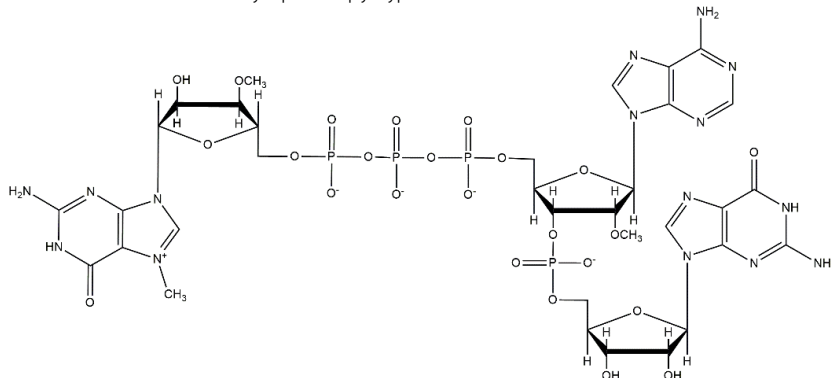
Кат. номер AG-High-mRNA-NY-20

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: N1-метил-псевдоуридин (N1-Ме-Ц). 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(A)-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: N1-метил-псевдоуридина – повышает стабильность и снижает иммуногенность мРНК.

Синтез РНК-транскрипта на ДНК-матрице с помощью Т7 РНК-полимеразы



Важно! Минимальная последовательность промотора Т7:

5'-NNNNNNNТААТАСGACTCACTATAAGN...-3':

Обязательные первые основания: **AGN**.

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

Состав набора:

Компонент	AG-High-mRNA- NY-20 20 реакций
(x5) Буфер для синтеза мРНК (High)	240 мкл
Т7 РНК-полимераза	120 мкл
АТФ	90 мкл
NI-Me-ЦТФ	90 мкл
СТФ	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

Т7 РНК-полимераза

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

АТФ, NI-Me-ЦТФ, СТФ, GTP

100 мМ каждого NTP

m7GmAmG

100 мМ аналога кэпа m7GmAmG

Контрольная ДНК-матрица hMGFP-AG

Линеаризованная плаزمида 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
N1-Ме-УТР	100 мМ	7,5 мМ	3,75 мкл
СТР	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 на N1-Ме-УТР. 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 (TAATA...): (5'-NNNNNNN TAATACGACTCACTATAAGN...-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:N1-Ме-УТР).

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-NY-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)