



## Набор для высокопроизводительного синтеза мРНК *in vitro*

Кат. номер High-mRNA-20

### Описание:

Набор для высокопроизводительного 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 300 мкг РНК с 2 мкг контрольной ДНК-матрицы. Общий выход РНК с одного набора – до 6 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'-NNNNNNNTAATACGACTCACTATANNN...-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-метилдениозин); химически модифицированные (биотин-, флюоресцеин-, аминоксил-NTP); аналоги кэпа (ARCA, m7GmAmG)).

## Состав набора:

Компонент	High-mRNA-20 20 реакций
(x5) Буфер для синтеза мРНК (High)	240 мкл
T7 РНК-полимераза	120 мкл
АТР	90 мкл
УТР	90 мкл
СТР	90 мкл
GTP	90 мкл
Стерильная вода	1 мл
Контрольная ДНК-матрица hMGFP-GG	20 мкл
Контрольная ДНК-матрица hMGFP-AG	20 мкл
ЭДТА	1,2 мл
<b>(x5) Буфер для синтеза мРНК (High)</b> Буфер на основе HEPES, соли и другие компоненты	<b>Контрольная ДНК-матрица hMGFP-GG</b> Линеаризованная плаزمида hMGFP-GG, 1 т.н., 0,25 мкг/мкл (первые основания РНК: GG)
<b>T7 РНК-полимераза</b> 250 е.а./мкл, содержит пиррофосфатазу и ингибитор РНКаз, 50% (v/v) глицерин	<b>Контрольная ДНК-матрица hMGFP-AG</b> Линеаризованная плазмида hMGFP-AG 1 т.н., 0,25 мкг/мкл (первые основания РНК: AG)
<b>АТР, УТР, СТР, GTP</b> 100 мМ каждого NTP	
<b>Стерильная вода</b> Вода, обработанная ДЭПК	<b>ЭДТА</b> 50 мМ ЭДТА

## 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
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
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. 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 пирофосфата 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 линейризованную плазмидную ДНК, так и ПЦП–продукт, содержащие T7 промотор со стороны 5'–конца последовательности, которая должна быть транскрибирована. В случае ПЦП–продукта наличие 6–7 п.н. (NNNNNNN) в направлении 5'–конца от начала промотора (TAATA...): (5'-NNNNNNN TAATACGACTCACTATANN...–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 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 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 рРНК 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 линейаризованные 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 2 мкг контрольной ДНК-матрицы, выполненной по протоколу набора High-mRNA-20, не менее 150 мкг РНК за 2 ч при 37 °С.

### **Примечание!**

Контрольная реакция, с включением аналога кэпа ARCA в структуру РНК, выполненная по протоколу набора ARCA-High-mRNA-20, должна давать не менее 50 мкг РНК за 2 ч при 37 °С.

Контрольная реакция, с включением аналога кэпа m7GmAmG (аналог CleanCap AG (3' OMe)) в структуру РНК, выполненная по протоколу набора AG-High-mRNA-20, должна давать 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)
- Псевдоуридин-5'-трифосфат (TPU-0050)
- 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 (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)