

Набор для синтеза мРНК *in vitro* (с УТР и m5СТР, с ARCA)

Кат. номер ARCA-mRNA-YC-20

Описание:

Набор для синтеза мРНК *in vitro* (с УТР и m5СТР, с ARCA) предназначен для постановки реакции транскрипции *in vitro* для получения ARCA-кэпированной мРНК, содержащей в структуре модифицированные нуклеотиды: псевдоуридин (Ψ), 5-метилцитидин (m5C). Принцип действия набора основан на ферментативном синтезе молекул РНК на ДНК-матрице при помощи ДНК-зависимой РНК-полимеразы бактериофага T7.

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

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: псевдоуридина и 5-метилцитидина – повышает стабильность и снижает иммуногенность мРНК.

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



Важно! Минимальная последовательность промотора T7:

5'-NNNNNNNTAATACGACTCACTATA**GNN**...-3'.

Обязательное первое основание, включаемое в РНК: **G**

Примечание! Использование ДНК-матрицы, кодирующей поли(A)-хвост на 3'-конце транскрипта, позволяет получить ARCA-кэпированную полигиденилированную мРНК в ходе одной 2-х часовой реакции. Альтернативный путь полигиденилирования мРНК: пост-транскрипционное добавление поли(A)-хвоста с помощью поли(A)-полимеразы.

Состав набора:

Компонент	ARCA-mRNA-YC-20 20 реакций
(x5) Буфер для синтеза мРНК	240 мкл
(x10) ДТТ	120 мкл
T7 РНК-полимераза	70 мкл
ATP	120 мкл
ΨTP	120 мкл
m5CTP	120 мкл
GTP	120 мкл
ARCA	120 мкл
Стерильная вода	1 мл
Контрольная ДНК-матрица hMGFP-GG	20 мкл
 (x5) Буфер для синтеза мРНК Буфер на основе HEPES, соли и другие компоненты	T7 РНК-полимераза 250 е.а./мкл, содержит пирофосфатазу и ингибитор РНКаз, 50% (v/v) глицерин
 (x10) ДТТ 100 мМ ДТТ	ATP, ΨTP, m5CTP, GTP 30 мМ каждого NTP
 Контрольная ДНК-матрица hMGFP-GG Линеаризованная плазмида hMGFP-GG (первые основания РНК: GG) (1 т.н.), 0,25 мкг/мкл	ARCA 30 мМ ARCA Стерильная вода

Материалы и оборудование, необходимые для работы:

- Пробирки на 0,2; 0,6 или 1,5 мл
- Амплификатор или термостат с возможностью поддержания температуры 37 °C
- 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.

Сопутствующая продукция

- Ингибитор РНКаз (RI-0020, Биолабмикс)
- Неорганическая пирофосфатаза (E-13002, Биолабмикс)
- Уридин-5'-трифосфат (UTP) (N-rU0100-w, Биолабмикс).
- Цитидин-5'-трифосфат (CTP) (N-rC0100-w, Биолабмикс).
- Аналог кэпа m7GmAmG (AGME-0050, Биолабмикс)
- Буфер для нанесения образцов РНК на гель «ФриК» (D-3001, Биолабмикс)
- ДНКаза (Биолабмикс)
- Набор для выделения ДНК и РНК из реакционных смесей (DR-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 пробирку добавьте следующие компоненты:

Компонент	Концентрация	Финальная концентрация	Объем
(x5) Буфер для синтеза мРНК	(x5)	(x1)	10 мкл
(x10) ДТТ	(x10)	(x1)	5 мкл
ATP	30 мМ	3 мМ	5 мкл
УТР	30 мМ	3 мМ	5 мкл
т5СТР	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	250 е.а./мкл	15 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. ДНКаза не входит в состав набора.

Важно! 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 т5СТР, соответственно. Реакция объемом 50 мкл дает выход около 20–30 мкг мРНК с 1 мкг ДНК-матрицы. Количество получаемой мРНК может варьироваться в зависимости от ДНК-матрицы (дизайн промотора, длина последовательности, формирование вторичной структуры).

Контрольная реакция:

Контрольная ДНК-матрица hMGFP-GG представляет собой линеаризованную плазмиду, содержащую ген зелёного флуоресцентного белка (hMGFP) под транскрипционным контролем промотора T7. ДНК-матрица *hMGFP-GG* инициирующая последовательность GG – используется для контроля стандартных реакций транскрипции без использования аналогов кэпа, а также реакций с включением аналога кэпа ARCA в структуру РНК. Размер синтезируемого транскрипта: ~1,04 кб. Ожидаемый результат: контрольная реакция, выполненная по протоколу набора *ARCA-mRNA-YC-20*, должна давать не менее 20 мкг РНК за 2 ч при 37 °C.

Примечание! Контрольная реакция, выполненная по протоколу без включения аналога кэпа ARCA в структуру РНК (**кат. номер mRNA-20**), должна давать не менее 70 мкг РНК за 2 ч при 37 °C.

Индивидуальная оптимизация протокола синтеза мРНК

В качестве матрицы для транскрипции *in vitro* можно использовать как линеаризованную плазмидную ДНК, так и ПЦР-продукт, содержащие Т7 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 TAATACGACTCACTATAGNN...-3') – обязательно для связывания Т7 РНК-полимеразы с ДНК-матрицей. В случае плазмиды, ДНК должна быть полностью линеаризована. 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 UTP:UTP, CTP:m5CTP).

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 кэпирования, как правило, достигается при соотношении ARCA:GTP, равном 4:1 (\approx 80% ARCA-кэпированной 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 кэпирования, 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.

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, 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: $A_{260} \times \text{разбавление} \times 40$ 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°C. Срок годности: 12 месяцев.