

Apt-Get 2'-F T3 Transcription Kit 2'-Fluoro-Pyrimidine Set

Nr kat.	Opakowanie
E0906-01	25 reakcji po 25 µl
E0906-02	50 reakcji po 25 µl

Przechowywanie: -20°C.

Kontrola jakości:

Wszystkie preparaty są testowane pod kątem zanieczyszczenia egzonukleazami, endonukleazami, nieswoistymi RNazami oraz aktywności jedno- i dwuniciowych DNaz.

Literatura:

1. Pieken W.A. et al. (1991) *Science* 19 253 (5017) 314-317.
2. Hernandez F.J. et al. (2012) *Nucleic Acid Ther.* 22 (1) 58-68.
3. Aurup H. et al. (1992) *Biochemistry* 13, 31 (40) 9636-9641.
4. Sousa R., Padilla R. (1995) *EMBO J.* 15 14 (18) 4609-2461.
5. Meyer C., Berg K. et al. (2014) *RNA Biology* 11 (1), 1-9.

Zestaw do transkrypcji T3, przeznaczony do syntezy RNA niewrażliwego na nukleazy. Zawiera mieszanę NTPs z 2'-fluoro CTP i 2'-fluoro UTP. Polymeraza RNA T3 jest zoptymalizowana pod kątem włączenia 2'-fluoroanalogów.

Opis:

- Włączenie 2'-fluoropirymidyn chroni oligonukleotydy przed trawieniem przez nukleazy zewnątrzkomórkowe i wydłuża okres półtrwania oligonukleotydów w środowisku bogatym w nukleazy (1, 3).
- Skuteczność transkrypcji T3 w dużym stopniu zależy od optymalizacji i zastosowania wysokiej jakości składników reakcji. Zestaw zawiera starannie dobrane odczynniki i warunki, które zapewniają wysoką efektywność syntezy RNA.
- 2'-fluoropirymidynowe analogi są często stosowane w SELEX do syntezy aptamerów, jak również do uzyskania małych interferujących RNA (siRNA) odpornych na nukleazy, posiadających zdolność wyciszania genów (2).
- Modyfikacje 2'-fluoro zapewniają lepsze możliwości tworzenia struktury drugorzędowej, w porównaniu z modyfikacjami 2'-aminowymi i wykazują lepszą kompatybilność z dalszymi manipulacjami enzymatycznymi, w porównaniu z RNA modyfikowanym 2'-O-metylo analogami.
- Okres półtrwania aptamerów modyfikowanych 2'-fluoro analogami zależy od ich dokładnej sekwencji i struktury drugorzędowej, a także od obecności i rodzaju nukleaz w środowisku reakcji. Typowe wartości okresu półtrwania w surowicy ludzkiej lub zwierzęcej mieszczą się w zakresie od 30 minut do kilku godzin. Natomiast całkowicie niezmodyfikowane RNA ulegają w tych warunkach szybkiej degradacji, a okresy półtrwania są zwykle zbyt krótkie, aby można je było wiarygodnie zmierzyć.
- 2'-fluoropirymidyny są kompatybilne z reakcją odwrotnej transkrypcji z użyciem odwrotnej transkryptazy NG dART (Nr kat. E0801).
- Mieszanka rybonukleotydów składa się z 5'-trifosforanu 2'-deoksy-2'-fluorocytydyny, 5'-trifosforanu 2'-deoksy-2'-fluorouracydyny oraz niezmodyfikowanych ATP i GTP. Mieszanka nie zawiera żadnych niezmodyfikowanych CTP ani UTP.

Składniki:

	E0906-01	E0906-02
5 x T3 Reaction Buffer	150 µl	300 µl
2'-F NTPs mix, 25 mM each	37,5 µl	75 µl
Apt-Get 2'-F T3 RNA Polymerase	12,5 µl	25 µl
RNase-free Water	0,5 ml	1 ml

This product is developed, designed and sold exclusively for research purposes and in vitro use only.

EURx Ltd. 80-297 Gdańsk Poland ul. Przyrodników 3, NIP 957-07-05-191, KRS 0000202039
www.eurx.com.pl, orders@eurx.com.pl, tel. +48 58 524 06 97, fax +48 58 341 74 23

In vitro transkrypcja T3:

1. Przygotowanie mieszaniny reakcyjnej.

Składnik:	ilość:
5 x T3 Reaction Buffer	5 µl
2'-F NTPs mix, 25 mM each	1,5 µl
Matryca DNA*	1-2 µg
Apt-Get 2'-F T3 RNA Polymerase**	0,5 µl
RNase-free Water	do 25 µl

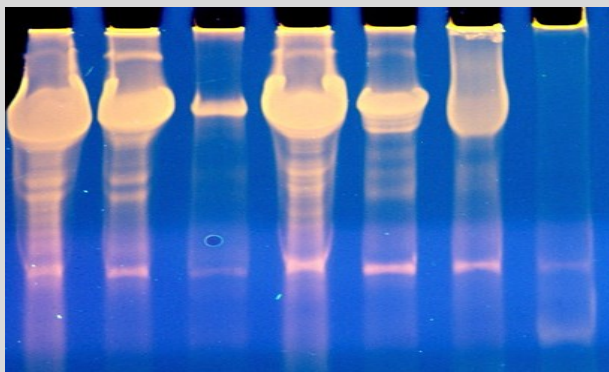
2. Reakcję należy inkubować 1-2 godziny w temperaturze 37°C, następnie zweryfikować rezultat transkrypcji na odpowiednim denaturującym żelu poliakrylamidowym.

Uwagi:

*Wysoka czystość matrycy jest ważna dla uzyskania maksymalnej wydajności reakcji. Jeśli stosowana jest transkrypcja typu *run-off*, należy unikać zanieczyszczenia RNazą A. W tym celu zalecamy użycie zestawu EURx RNase-free Plasmid DNA Purification Kit (Nr kat. E3500), który doskonale sprawdza się przy przygotowywaniu plazmidowego DNA wolnego od RNaz. W przypadku, gdy matryca DNA jest fragmentem PCR, należy usunąć startery, np. zestawem EURx PCR/DNA Clean-Up Purification Kit (Nr kat. E3520). Zaleca się potwierdzenie jednorodności DNA na żelu agarozowym.

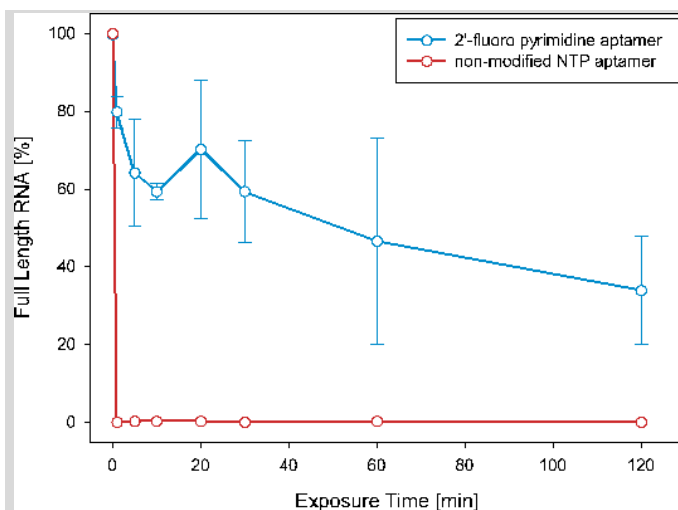
**Do znakowania rekomenduje się używanie 0,2 µl Polimerazy RNA T3, natomiast na skalę preparatywną zalecane są większe ilości enzymu.

NON F'GTP F'ATP F'UTP F'CTP F'UTP/CTP NO NTPs



Transkrypcja T3 wykonana za pomocą Apt-Get 2'-F T3 Transcription Kit. W kolejnych ścieżkach zastosowano wskazany 2'-F analog (reszta rybonukleotydów niezmodyfikowana). NON to reakcja ze wszystkimi czterema standardowymi rybonukleotydami. Długość transkryptu: 500 nt RNA. 10 µl każdej testowej reakcji zostało naniesione na 7% [w/v] żel poliakrylamidowy z 8 M mocznikiem.

Uwaga: Polimeraza RNA T3 typu dzikiego nie wykorzystuje jako substratu żadnych analogów 2'-F NTP (4).



Określanie stabilności i oporności na nukleazy wyrażonych parametrem czasu półtrwania 2'-F aptamerów RNA w surowicach zwierzęcych bogatych w nukleazy. Aptamery 2'-F RNA (niebieskie) i niezmodyfikowane aptamery RNA (czerwone) inkubowano w pożywce do hodowli komórkowej zawierającej płodową surowicę bydlęcą. Wyznakowane radioaktywnie aptamery pełnej długości rozdzielono metodą niedenaturującej elektroforezy. Intensywność pasm aptamerów pełnej długości wizualizowano i określano ilościowo za pomocą autoradiografii (5). Okresy półtrwania aptamerów 2'-F silnie zależą od indywidualnych cech sekwencji i struktury drugorzędowej, a zatem mogą zmieniać się w szerokim zakresie. W przypadku niektórych aptamerów 2'-F okresy półtrwania przekraczały 24 godziny.