

# Apt-Get 2'-F T7 Transkription - Kit

ZUR SYNTHESE VON NUKLEASERESISTENTEN,  
2'-FLUORO-PYRIMIDIN MODIFIZIERTEN RNAs

## T7 RNA Polymerase - modifiziert, optimiert - (Bakteriophage T7, E. coli)

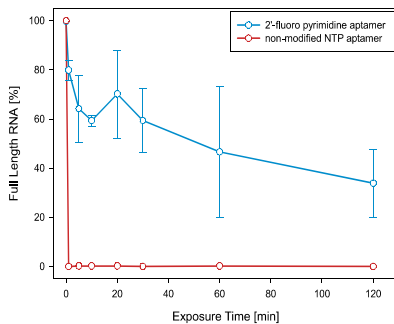
<b>Artikel Nr.</b>	<b>Größe</b>
E0905-01	25 x 25 µl Reaktionen
E0905-02	50 x 25 µl Reaktionen

### Definition der Einheit:

Eine Einheit ist die Menge des Enzyms, das erforderlich ist, um 1 nmol markiertes UTP in 1 Stunde bei 37°C in die säureunlösliche Form zu überführen.

### Lagerbedingungen:

Lagerung bei -20°C



**Abb. 1:** Demonstration der Stabilität, erhöhten Resistenz gegenüber Nukleasen und der verlängerten Halbwertszeit von 2'-F-Pyrimidin RNA-Aptameren in nukleasereichen Tierseren. 2'-F-Py RNA Aptamere (blau) und nicht modifizierte RNA-Aptamere (rot) wurden zunächst in Zellkulturmedium mit fötalem Kälberserum inkubiert, zurückgewonnen und radioaktiv markiert. Mittels nicht denaturierender PAGE wurden radioaktiv markierte RNA-Aptamere voller Länge aufgetrennt. Die Bandenintensitäten von RNA-Aptameren voller Länge wurden visualisiert und durch Autoradiographie quantifiziert (8). Die Halbwertszeit von 2'-F Py Aptameren sind erfahrungsgemäß stark abhängig von deren individueller Sequenz und von Eigenschaften ihrer Sekundärstruktur. Deshalb kann sich die Halbwertszeit verschiedener Aptamere deutlich voneinander unterscheiden. Für einige 2'-F Py Aptamere wurden Halbwertszeiten von mehr als 24 Stunden gemessen. Die Halbwertszeiten nicht modifizierter RNA-Aptamere ist zu kurz für eine verlässliche Messung.

**T7 Transkriptionskit zur Synthese von nukleaseresistenter RNA. Enthält einen NTP-Mix mit 2'-Fluoro-CTP und 2'-Fluoro-UTP. Das Kit beinhaltet eine modifizierte T7 RNA Polymerase mit spezifischen Optimierungen zum Einbau 2'-modifizierter Nukleotide.**

### Beschreibung:

- Der Einbau von 2'-Fluoro Pyrimidinen schützt Oligonukleotide vor Abbau durch extrazelluläre Nukleasen und verlängert somit die Halbwertszeit in nukleasereichen Umgebungen (z.B. Serum) (4).
- Die Effizienz von T7-Reaktionsansätzen hängt stark ab sowohl von der ausbalancierten Komposition wie auch von der hohen Qualität aller beteiligten Reaktionskomponenten. Alle Reaktionskomponenten werden speziell auf die Erfordernisse hocheffizienter in-vitro Synthese modifizierter RNA genau eingestellt und spezifisch optimiert.
- 2'-Fluoro-Pyrimidin RNAs werden regelmäßig eingesetzt zur Synthese von RNA-Aptameren wie auch zur Entwicklung nukleaseresistenter, kurzer, interferierender RNA-Moleküle (siRNAs) zur Dämpfung der Genexpression ("silencing") (5).
- Die Synthese von RNA mit 2'-fluoro modifizierten Pyrimidinen ist die gängigste Methode, um nuklease-resistente RNA Fragmente wie RNA-Aptamere herzustellen (5), da die Syntheseeffizienz des Enzyms einerseits und die Nukleaseresistenz der synthetisierten RNA andererseits in einem günstigen Verhältnis stehen.
- 2'-Fluoro-Modifikationen wirken sich, im Vergleich zu 2'-Amino-modifizierten Nukleotiden, vorteilhafter auf die Fähigkeit synthetisierter RNA-Moleküle zur Ausildung von Sekundärstrukturen aus. Gleichzeitig ist, im Vergleich zu 2'-O-Methyl-modifizierten Nukleotiden, die Kompatibilität zu weiteren enzymatischen Modifikationen höher.
- Die Halbwertszeit 2'-fluoro-modifizierter Aptamere hängt von ihrer Sequenz (Primärstruktur) und von Sekundärstruktur-Eigenschaften ab, wie auch von deren Zusammensetzung und der Nukleaselast des umgebenden Mediums. Typische Halbwertszeiten in humanen oder in Tierseren betragen zwischen 30 Minuten und mehreren Stunden. Unmodifizierte RNAs hingegen besitzen in diesen Umgebungen typischerweise Halbwertszeiten, die zu kurz für verlässliche Messungen sind.
- 2'-Fluoro-modifizierte Pyrimidin-RNA ist kompatibel zu RT-Reaktionen mit NG dART Reverse Transkriptase (Best. Nr. 0801).
- Der NTP-Mix besteht aus 2'-modifizierten Pyrimidinen (2'-Deoxy-2'-Fluorocytidin 5'-Triphosphat, 2'-Deoxy-2'-Fluorouridin 5'-Triphosphat) und aus unmodifizierten Purinen (ATP und GTP). Der NTP-Mix enthält keinerlei unmodifizierte Pyrimidine (weder CTP noch UTP).

### Qualitätskontrolle:

Alle Chargen werden auf Endonuklease-, Exonuklease-, unspezifische RNase sowie einzel- und doppelsträngige DNase- Aktivitäten geprüft. Typische Präparationen sind zu mehr als 95 % rein, wie aufgrund von SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese beurteilt werden kann

### Literatur:

1. Chamberlin, M. und Ring, J. (1973) J. Biol. Chem. 248, 2235-2244.
2. Tabor, S and Richardson, C.C. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 1074-1078.
3. Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second edition, pp. 10.27-10.37, Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour.
4. Pieken W.A. *et al.* (1991) Science 253 (5017) 314-317.
5. Hernandez F.J. *et al.* (2012) Nucleic Acid Ther. 22 (1) 58-68.
6. Aurup H. *et al.* (1992) Biochemistry 31, 31 (40) 9636-9641
7. Sousa R., Padilla R. (1995) EMBO J. 15 14 (18) 4609-2461
8. Meyer C., Berg K. *et al.* (2014) RNA Biology 11 (1), 1-9

# Apt-Get 2'-F T7 Transkription - Kit

## RNA TRANSKRIPTION PROTOKOLL

### Kit - Packungsinhalt:

Kit Komponente:	25 Reaktionen	50 Reaktionen
5 x T7 Reaktionspuffer	150 µl	300 µl
2'-F NTP Mix, je 25 mM*	37,5 µl	75 µl
Apt-Get 2'-F T7 RNA Polymerase	12,5 µl	25 µl
RNase freies Wasser	0,5 ml	1.0 ml

\* Der NTP Mix enthält nicht modifizierte Purine (ATP und GTP), und 2'-F-modifizierte Pyrimidine (2'-CTP und 2'-F UTP).

### Reaktionsbedingungen:

Reaktion auf Eis gemäß dem folgenden Pipettierschema zusammenfügen:

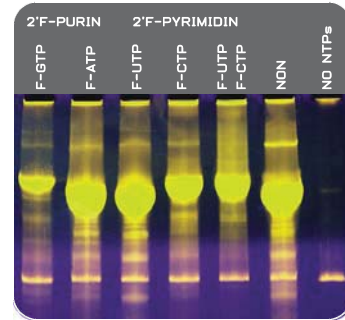
5 x Reaktionspuffer (reaction buffer)	5 µl
2'-F Py NTP-Mix, je 25 mM	1,5 µl
DNA Vorlage (template)*	1-2 µg
Apt-Get 2'-F-T7 RNA Polymerase**	0,5 µl
RNase freies water	@ 25 µl
<b>TOTAL</b>	<b>25 µl</b>

Für 1 bis 2 Stunden bei 37°C oder bis max. 42°C inkubieren.

Anschließend RNA Transkription mittels denaturierender Polyacrylamid-Gelelektrophese (PAGE) überprüfen.

\* Eine wichtige Voraussetzung für eine hohe Reaktionsausbeute ist eine hohe Reinheit der DNA-Vorlage. Im Reaktionsansatz sollte keine RNase A-Kontamination (z.B. aus unzureichender Plasmid-Aufreinigung) verbleiben, um eine Leerlauf-Transkription zu vermeiden. Zwischen Kits verschiedener Hersteller zeigen sich deutliche Unterschiede hinsichtlich RNase freier Aufreinigung von Plasmid-DNA. Für eine RNase freie Plasmidaufreinigung hat sich in der Praxis unser - eigens für diese Anwendung getestetes - Plasmid-Kit bestens bewährt (Best.Nr. E3500). Wenn ein PCR-Fragment als T7 DNA-Vorlage dient, sollten verbliebene Primer vor der Reaktion vollständig entfernt werden (Empfohlene Vorgehensweise: Aufreinigung der Vorlage aus Agarose Gelen mit dem AgaroseOUT DNA Kit, Best.Nr. E3540).

\*\*Für eine effiziente Markierung (Labelling) wird 0.2 µl T7 RNA Polymerase benötigt. Für RNA-Transkription im präparativen Maßstab werden höhere Enzymmengen benötigt.



**Abb. 2** T7 Transkription mit EURx Apt-Get 2'-F T7 RNA Polymerase zum Einbau von 2'-F modifizierten NTPs. In jeder Spur wurde das bezeichnete 2'-F- NTP-Analog an Stelle des entsprechenden, unmodifizierten Nucleotides eingebaut. NON: Kontrollreaktion mit allen vier nicht-modifizierten, natürlich vorkommenden NTPs. Transkriptlänge: 500 nt RNA. 10 µl jedes Transkriptionsassays wurde auf ein 7% [w/v] denaturierendes Polyacrylamidgel mit 8% [w/v] Harnstoff geladen.

**Hinweis:** Unmodifizierte Wildtyp- T7 RNA Polymerase kann 2'-F NTP-Analoga nicht als Substrat nutzen.

### Sequenzdaten zum Design geeigneter PCR-Primer:

#### T7 Promotor-Sequenz (zwingend erforderlich):

$$\begin{array}{c} | \quad \text{Recognition} \quad | \quad > \text{Transcription} \\ | -17 \quad \quad \quad -5 | \quad -1 | \\ \text{5'- T AAT ACG ACT CAC TAT A -3'} \end{array}$$

Beispiel für einen häufig verwendeten, funktionierenden T7 PCR Primer (5):

5'-GAA ATT AAT ACG ACT CAC TAT AGG - sequenzspezifischer Abschnitt -3'

T7 RNA Polymerase synthetisiert von 5'- in 3'-Richtung. Daher muss die DNA-Vorlage entsprechend von 3'- in 5'-Richtung orientiert sein. Der Gegenstrang zum T7-Promotor (also der Primersequenz) dient als DNA-Vorlage ("Template").

5'- GAAATTAATACGACTCACTATAGG -3' Nicht-Vorlage  
3'- CTTTAATTATGCTGAGTGATATCC -5' Vorlage

#### Generische T7 Terminatorsequenzen (optional):

1) Klasse I Terminator, Haarnadelschleife mit GC-reichem Abschnitt, gefolgt von T-reichen Elementen (4)

5'-AGCATAACCCCTTGGGGCCTCAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTIGCTGAAAG-3'

2) Klasse II Terminatoren / 7-8 nt stromabwärts des ATCTGTT Motivs pausiert die RNA Polymerase, Termination erfolgt an den unterstrichenen Positionen (4).

5'-ATCTGTTacagtcct-3' or

5'-ATCTGTTtcttgcaag-3'