

	Mode opératoire	Réf : MO_TIV_AQU Version 1 date : 27/01/2008 révisé 24 07 2018
	TRANSCRIPTION IN VITRO	

1. Objet et domaine d'application

Transcription in vitro pour expression hétérologue (ovocytes de xénope)

2. Documents de référence

3. Personne référent

C Tournaire

4. Liste de diffusion et si nécessaire niveau de confidentialité

BPMP

5. Hygiène et sécurité

Phénol



Danger H301+H311+H331-H314-H341-H373-H411

Manipuler le phénol sous sorbonne

Porter des gants et une blouse

6. Contenu du mode opératoire

Linéarisation du plasmide :

- Couper 2 à 5 µg de plasmide avec une enzyme de restriction appropriée (linéarisation du plasmide côté 3' en aval de 3'UTR Bglobin).

Rq : la digestion par enzymes FAST DIGEST (Thermo) marche très bien.

- Faire 2 extractions au phénol/chloroforme (**sous sorbonne**). Précipiter avec Acétate de sodium 3 M pH 5,2 (1/10° de vol) et 2 vol d'éthanol : 1h à – 20° C. Laver avec éthanol 75° . sécher le culot et reprendre dans 9,6 µl ou 24,5 µl d'H₂O DEPC.

	Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
Nom :	C Tournaire		
Visa :			

	Mode opératoire	Réf : MO_TIV_AQU Version 1
	TRANSCRIPTION IN VITRO	date : 27/01/2008 révisé 24 07 2018

Transcription :

Préparer les mélanges réactionnels suivant (en fonction de l'échelle de transcription choisie).
L'échelle 2µg/40µL est généralement suffisante

	Dans 40 µl 2µg d'ADN (8,1 µl)	Dans 100 µl 5µg d'ADN (23 µl)
Tampon T3/T7 (5X)	8 µl	20 µl
ACUG (ATP-CTP-UTP:2,5mM-GTP0,5 mM)	16 µl	40 µl
DTT 100 mM (PROMEGA)	2 µl	5 µl
(m ⁷ G(5')ppp(5')G cap (BIOLABS, 25 OD/137 µl)	2.4 µl	6 µl
RNasin 40 U/µl (PROMEGA)	1 µl	2,5 µl
RNA pol (T3 ou T7) 20 U/ µl (PROMEGA)	2,5 µl	6.25 µl

Incuber 1H30 à 37°C

Ajouter de la RNA polymérase:

	0,5 µl	1 µl
--	--------	------

Incuber 1 H à 37 °C

Ajouter:

RNasin	1 µl	2,5 µl
RQ1 - Dnase (1 U/ µl)	1,5 µl	4 µl

Incuber 30 min à 37 °C

- Ajuster le volume à 100 µl et faire 2 phénol/chloroforme et 1 chloroforme (sous sorbonne).
- Précipiter avec acétate de Na et éthanol : 1 H à – 70 °C
- Laver le culot avec de l'éthanol 75°. Sécher le culot et le reprendre dans 15 µl d'H₂O-DEPC 2X + 1µl de RNasin
- On peut vérifier la qualité et la quantité des ARN obtenus sur mini-gel dénaturant..

	Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
Nom :	C Tournaire		
Visa :			

	Mode opératoire	Réf : MO_TIV_AQU Version 1
	TRANSCRIPTION IN VITRO	date : 27/01/2008 révisé 24 07 2018

	Rédacteur	Vérificateur	Approbateur
Nom :	C Tournaire		
Visa :			

