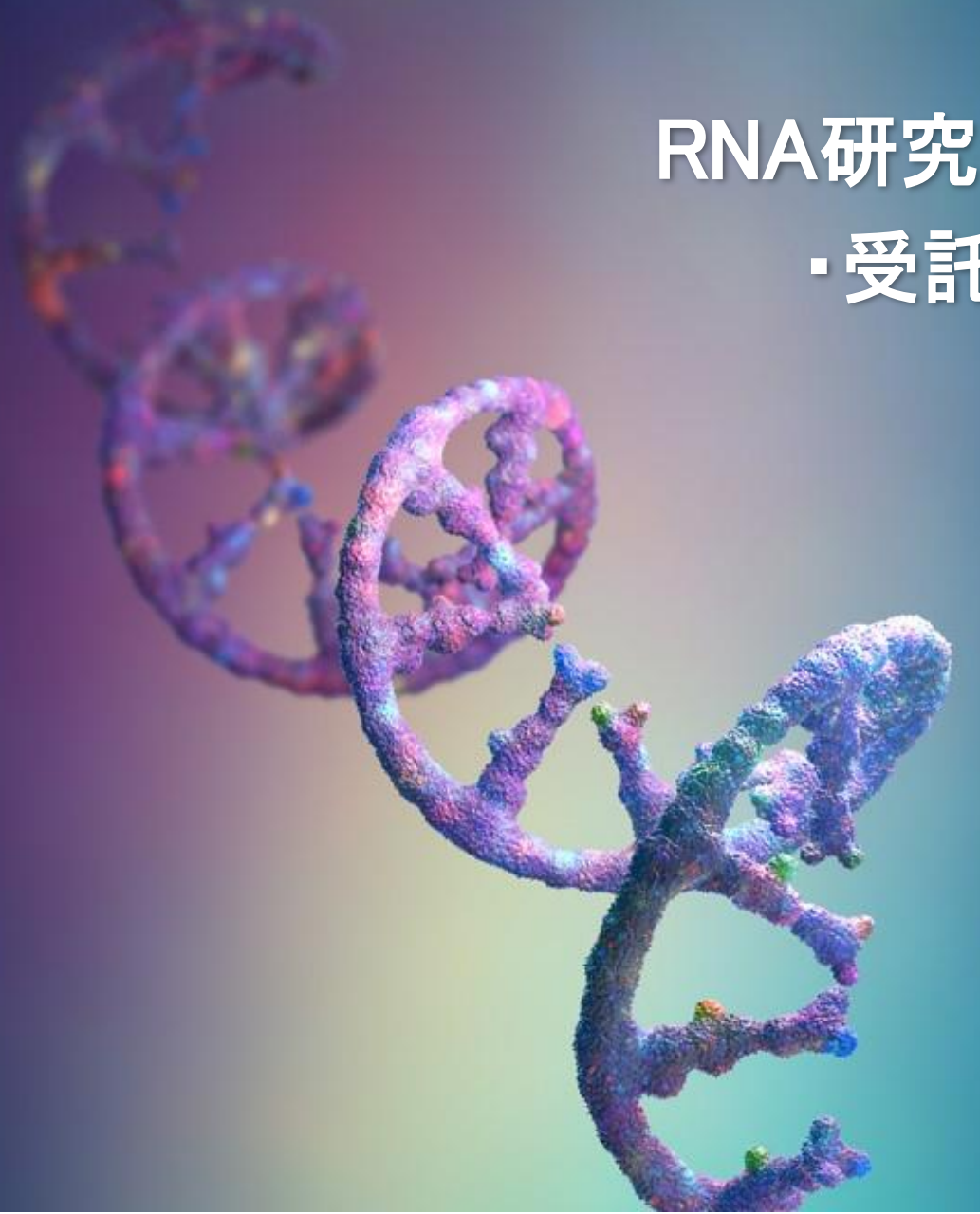




RNA研究関連製品 ・受託サービス ガイド

(2023年6月版)

- | | |
|--|--------|
| ● mRNA合成キット | P.1, 2 |
| ● 単品酵素 (RNA合成／Capping) | P.3, 4 |
| ● Type IIS制限酵素 | P.5 |
| ● RNase Inhibitor／mRNA製造用酵素 (HQグレード／GMPグレード) | P.6 |
| ● RNA関連受託 | 裏表紙 |



簡単操作で世界最高クラスの高収量を実現したmRNA合成キット

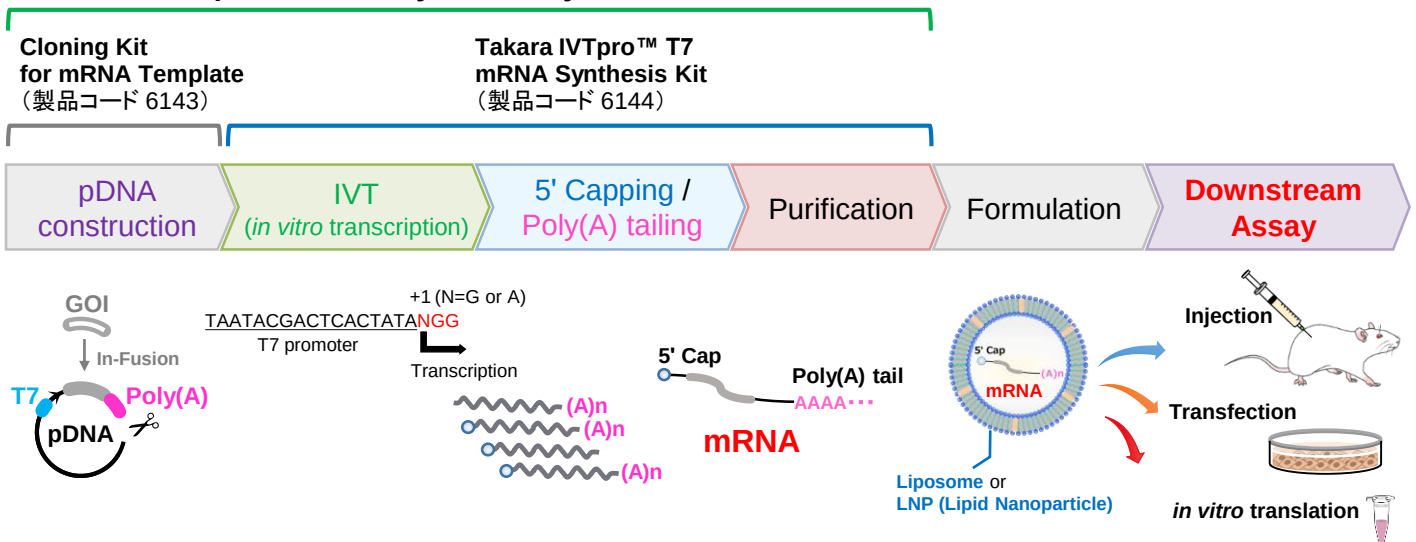
Takara IVTpro™ mRNA Synthesis System

- Cap構造とPoly(A)配列を有するmRNAを簡便に合成可能なキット。Co-transcriptional capping手法に基づくプロトコルをご用意
- T7 RNA Polymeraseによる*in vitro*転写 (IVT) 反応を最適化し、高効率なRNA合成・高収量を実現
- mRNA合成量を低下させることなくシュードウリジン等によるRNA修飾が可能
- In-Fusion試薬の採用 (製品コード 6143) により、鋳型プラスミドDNAのクローニングが容易に
- LiCl 溶液を用いたRNA精製により、下流のアッセイ系にすぐに使用可能

Takara IVTpro™ mRNA Synthesis System (製品コード 6141) は、TriLink社製のCapアナログ (CleanCap Reagent AG など) を用いた*in vitro* transcription (IVT) により、ヒトやマウスといった哺乳類細胞で使用可能なCap構造とPoly(A)配列を有するmRNAを簡便かつ高効率に合成することができるキットです。キットは、Cloning Kit for mRNA Template (製品コード 6143) とTakara IVTpro™ T7 mRNA Synthesis Kit (製品コード 6144) の2種類のキットで構成されており、プラスミドDNAの構築から合成したmRNAの精製までに対応しています。

★ シンプルなワークフロー：鋳型DNAの調製からmRNAの精製までのシームレスなプロトコル

Takara IVTpro™ mRNA Synthesis System (製品コード 6141)



製品名	容量	製品コード	価格	構成
Takara IVTpro™ mRNA Synthesis System	1 Set	6141	¥59,000	製品コード 6143と6144のセット品
Cloning Kit for mRNA Template	10回	6143	¥25,000	• Linearized Template Vector (50 ng/μl) ※1 • FLuc Control Fragment (100 ng/μl) ※2 • 5× In-Fusion Snap Assembly Master Mix ※3
Takara IVTpro™ T7 mRNA Synthesis Kit	20回	6144	¥38,000	• 10× Transcription Buffer • 10× ATP • 10× CTP • 10× GTP • 10× UTP • 10× Enzyme Mix • Nuclease-Free Water • DNase I • Lithium Chloride Precipitation Solution • Positive Control Template (FLuc) ※4

注：Capアナログやシュードウリジン等の修飾ヌクレオチドは本製品に含まれていません。CleanCap Reagent AG (TriLink社) などを別途ご用意ください。

※1：IVTでのmRNA合成を意図したブレデザイン済みのIn-Fusionクローニング用線状化プラスミドDNA

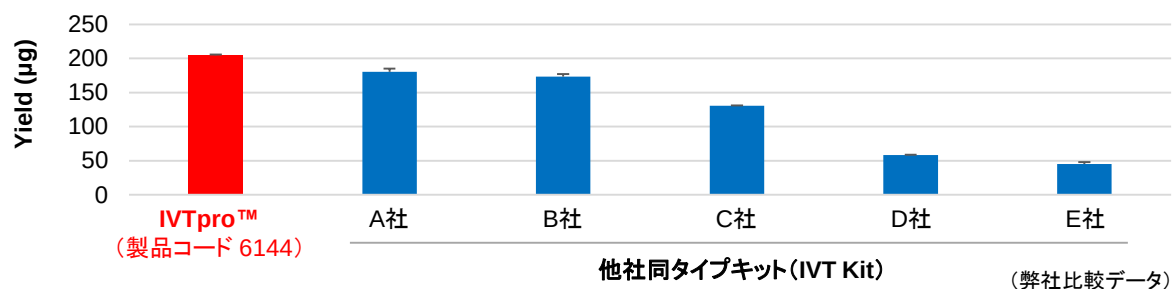
※2：ヒト細胞での発現にコドン最適化された、ホタル (Photinus pyralis) 由来ルシフェラーゼのCDSを含むIn-Fusionクローニング用コントロール断片

※3：In-Fusionクローニング試薬。DNA断片同士の末端15塩基の相同配列を融合させ、簡単・迅速なクローニングが可能

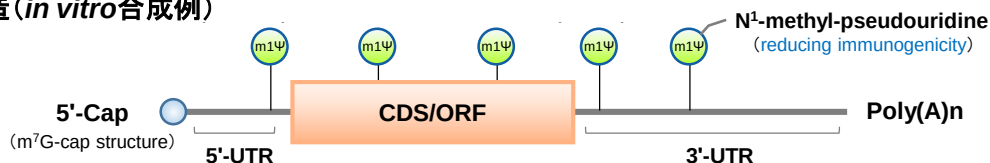
※4：T7 promoter + 5'UTR + FLuc-CDS + 3'UTR + Poly(A) で構成される配列を有する線状化プラスミドDNA

Application

他社同タイプキットと比較し、より多くのRNA合成収量を実現



mRNAの構造 (in vitro合成例)



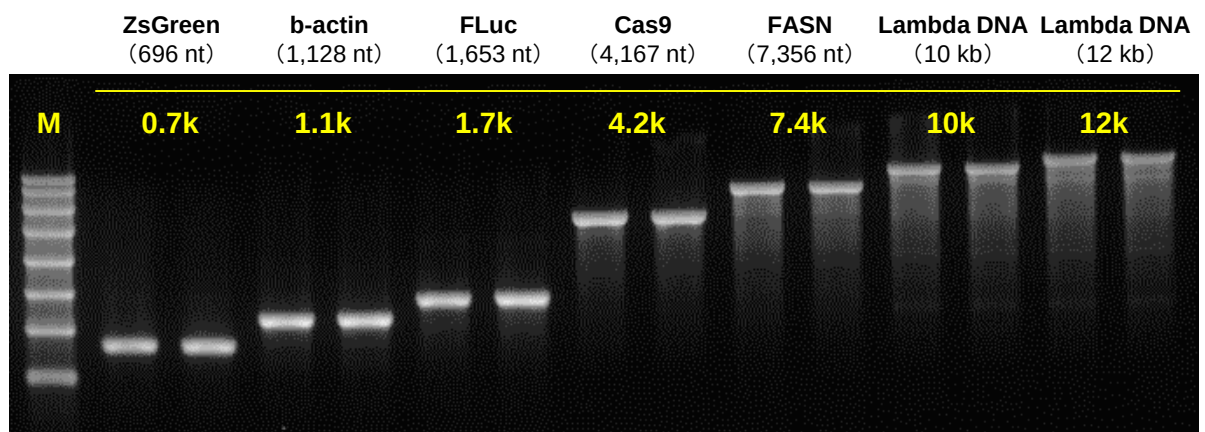
<方法>

各社キットの推奨プロトコールに従い、CleanCap Reagent AG (3' OMe) (TriLink社)およびN1-メチルシュードUTPを含むIVT反応系でFLuc mRNAを合成した。いずれも鋳型DNAとしてPositive Control Template (FLuc)を1 µg使用し、20 µl反応系でIVT反応を2時間行った。

<結果>

IVTpro™のRNA合成量は**1反応あたり**(20 µl反応系)**200 µg以上**となり、他社同タイプキットと比べ最も合成量が多い結果となった。

様々なサイズのIVT RNAの合成が可能



M : RNA Ladder

※ホルムアルデヒド変性アガロースゲル

<方法>

Takara IVTpro™ T7 mRNA Synthesis Kit(製品コード 6144)を用いて、長さの異なる各種mRNAを合成した。CleanCap Reagent AG (3' OMe) (TriLink社)およびシュードUTPを含むIVT反応系を採用し、いずれも鋳型プラスミドとしてLinearized Template Vector(製品コード 6143の構成成分)を用いているため、IVT RNAにはCapおよびPoly(A)配列が付加されている(mRNAとして合成)。IVTで合成したmRNAを65℃で10分間熱変性を行い、各200 ngをホルムアルデヒドを含むアガロースゲル電気泳動にて確認した。

<結果>

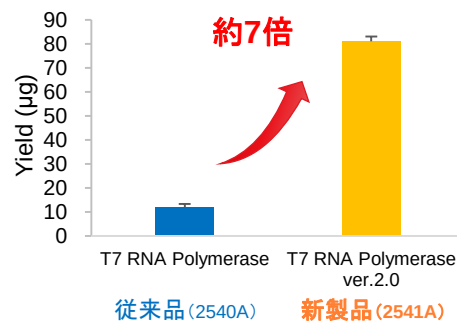
IVTpro™では、**約700 nt~12 kb**までの様々な長さのmRNAを合成できていることが確認できた。

◆ IVTでのRNA合成の基本酵素

T7 promoter配列を含むdsDNAを鋳型にRNAを合成する酵素

T7 RNA Polymerase ver.2.0

- 従来品 (製品コード 2540A) に比べて、1反応 (20 μl 反応系) あたりのRNA合成収量が約7倍に向上



RNAやDNAの合成反応を促進し収量向上に寄与する酵素

Pyrophosphatase (inorganic)

- 無機ピロリン酸 (PPi) の加水分解を触媒してオルトリン酸 (H_3PO_4) を生成する酵素
- RNAやDNAの合成反応で生じるピロリン酸を分解し、合成反応を促進※

※ 核酸合成反応中に生じるinorganic pyrophosphate (=PPi) は、反応液中の Polymerase の補因子である Mg^{2+} と反応して沈殿物を生じ、合成反応を低下させてしまう。
IPPIは、PPiを分解してオルトリン酸 (H_3PO_4) とすることで、Polymerase活性に関わる Mg^{2+} の沈殿を防ぎ、合成反応を促進する。

◆ RNAの5'-Cap修飾酵素 (Post-transcriptional capping 試薬)

IVTなどで合成したRNAの5'末端に m^7G cap構造 (Cap 0) を付加する酵素

Vaccinia Capping Enzyme

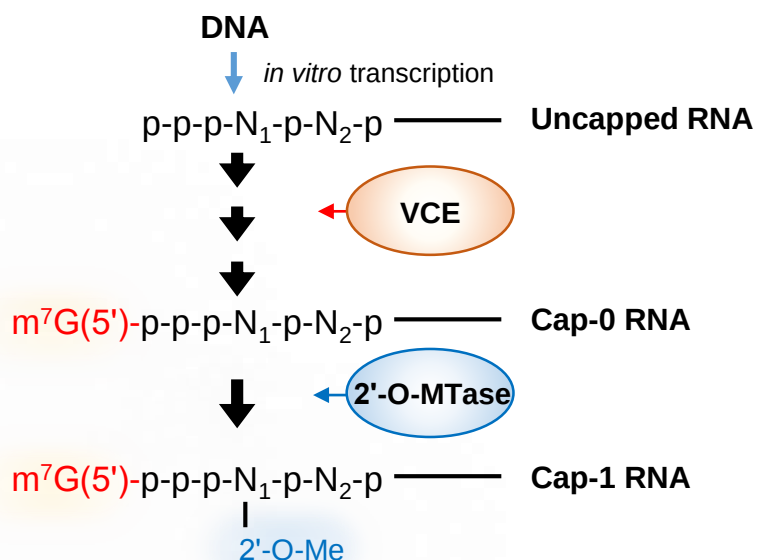
m^7G -cap構造 (Cap 0) を持つRNAのCap 1構造への変換

mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase



Vaccinia Capping Enzyme (VCE、製品コード 2460A/B) は、vacciniaウイルス由来のキャップ化酵素であり、RNA (5'-triphosphate RNAなど) の5'末端に7-methylguanylate cap構造 (Cap 0) を付加します。真核生物においてキャップ構造は、mRNAの安定化、核外輸送および翻訳において重要です。また、本酵素をmRNA Cap 2'-O-Methyltransferase (2'-O-MTase、製品コード 2470A/B) と同時に用いることで、Cap-0 RNAの1番目のヌクレオチドの2'-O部位がメチル化されたCap 1構造を持つRNAをシングルステップ反応で調製することも可能です。

★ VCEと2'-O-MTaseを用いたRNAの5'-Cap修飾方法



【反応工程】

IVTでRNA (5'-triphosphate RNA) を合成



VCEによる3ステップ反応の媒介:

- (1) 5'末端のリン酸基を1つ除去
 - (2) 5'末端にG(5')-pの付与
 - (3) 5'末端のG(5')塩基の7位のメチル化
- ※ Cap-0 RNA (m^7G -capped RNA) 修飾



2'-O-MTaseによる修飾:

- (4) 1st nucleotideの2'-OH基のメチル化
- ※ Cap-0 RNAのCap-1 RNAへの変換

🔑 製品Tips

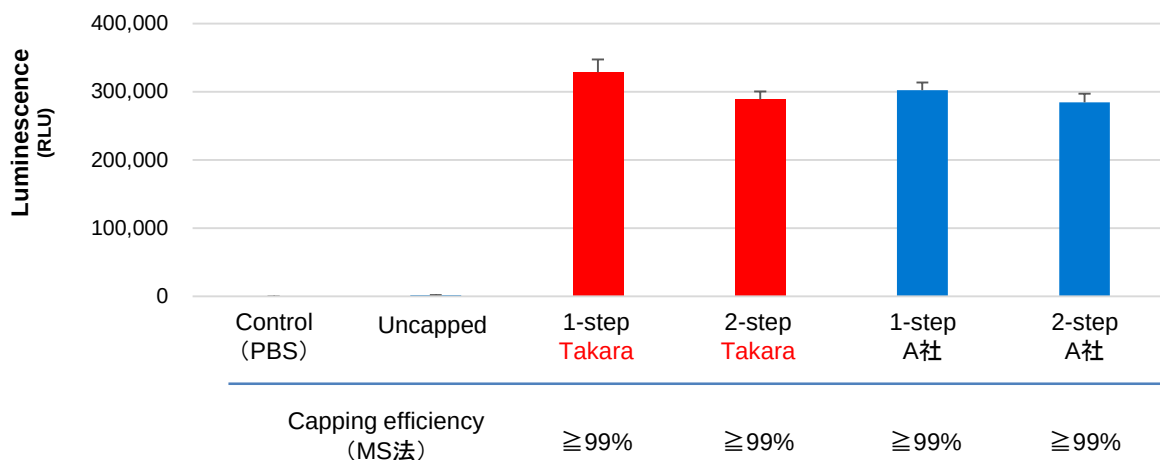
1ステップ でCap-1 RNAへと変換することも可能です!

(4ページの「★ 目的に応じたRNAの5'-Cap修飾方法の使い分け」を参照)

Application

各種試薬・方法で調製したFLuc mRNA (Cap 1)のHEK293Tにおける発現量比較

（弊社比較データ）



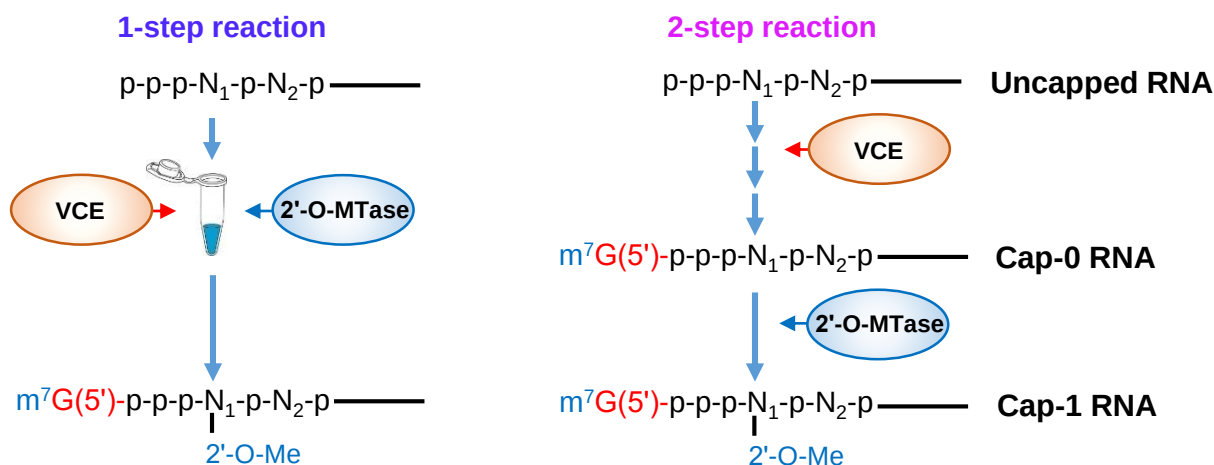
<方法>

弊社のVCE（製品コード 2460A/B）および2'-O-MTase（製品コード 2470A/B）、および他社同タイプ試薬を用いて、1-step法もしくは2-step法でCap-1 FLuc mRNAを合成し、トランスフェクション後24時間におけるHEK293T細胞でのFLuc発現量を比較した。また、1-stepおよび2-stepの手法で得られた修飾RNA産物の5'末端を質量分析（MS）した。

<結果>

VCEおよび2'-O-MTaseで合成したCap-1 FLuc mRNAは他社品と同等以上の活性を示し、かつ1-stepと2-stepで得られる結果に大きな違いがないことが確認された。またMS法により、Capping効率は99%以上であることが確認できた。

★ 目的に応じたRNAの5'-Cap修飾方法（1-step反応系と2-step反応系）の使い分け



製品名	容量	製品コード	価格
T7 RNA Polymerase ver.2.0	20,000 U	2541A	¥39,000
Pyrophosphatase (inorganic)	10 U	2450A	¥9,000
	50 U	2450B	¥39,000
Vaccinia Capping Enzyme	500 U	2460A	¥27,000
	2,000 U	2460B	¥98,000
mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase	2,500 U	2470A	¥11,000
	10,000 U	2470B	¥39,000

翻訳効率の最大化を目的としたmRNA合成用鋳型DNA調製に有用なType IIS制限酵素

BspQ I



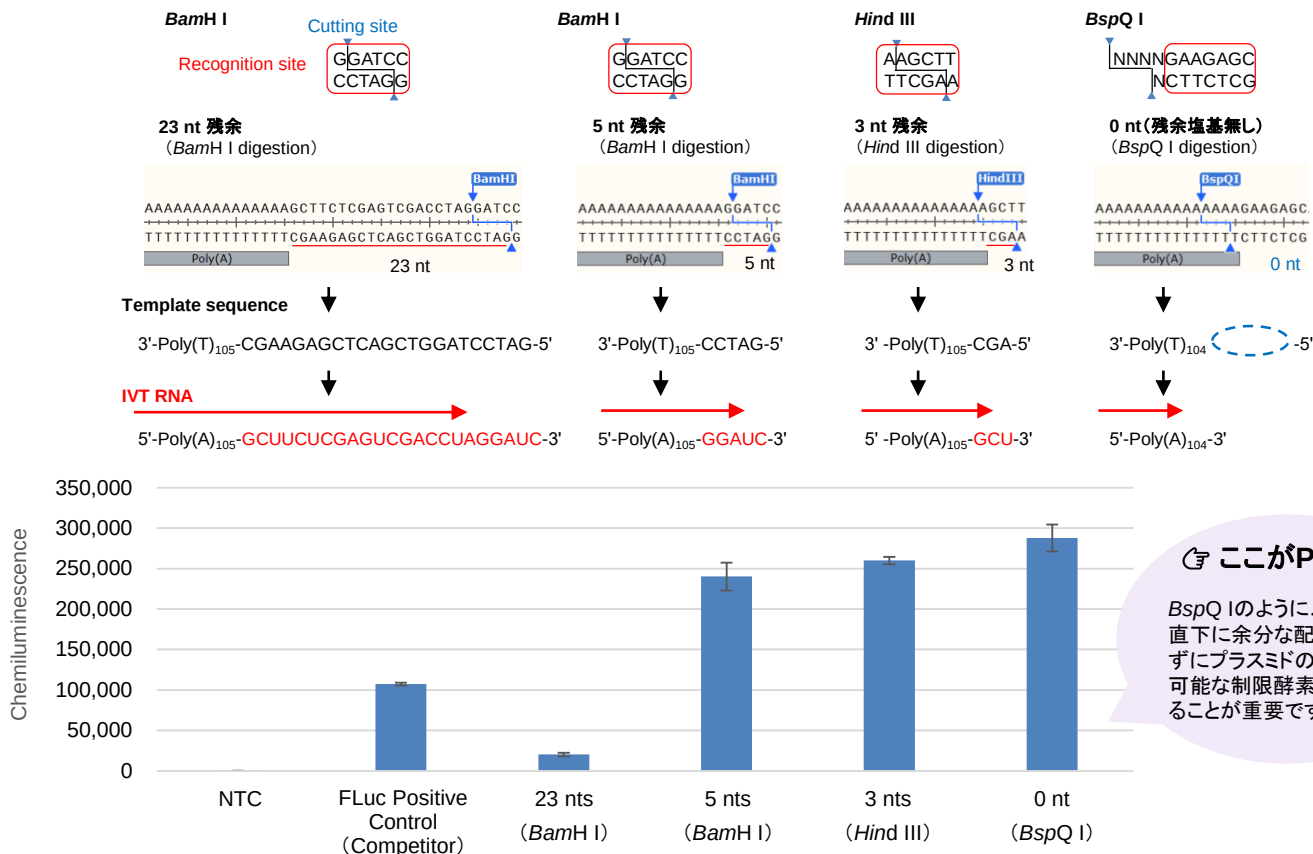
- 非対称の特定の二本鎖DNA配列を認識し、その外側の一定距離で両鎖を切断するType IIS制限酵素 (Isoschizomer)
- IVT合成したmRNAのPoly(A)直下に余分な配列が残存しないデザインが可能で翻訳効率低下を抑制
- 酵素および反応用バッファー(添付試薬)にBSAが不含

Application

Poly(A)配列以降の残余塩基数と翻訳効率の関係性の検証

Poly(A)直下の余分な付加配列はmRNAのタンパク質への翻訳効率の低下を招くため、IVTでのmRNA合成を目的とする鋳型DNA調製の際には、Poly(A)直下に余剰配列が残らないように設計することが重要とされている。Poly(A)配列以降の残余塩基数の影響を検討するために、制限酵素処理後にPoly(A)配列後の残存塩基数が異なるプラスミド鋳型を用意し、CleanCap Reagent AG (3' OMe)およびN1-メチルシュードUTPを含むIVT反応でFLuc mRNAを合成した。IVT RNAのPoly(A)以降の残余塩基配列は赤文字で示している。

※Hind III (3 nt残余)のデザインは、Linearized Template Vector (製品コード 6143のコンポーネント)と同一



<結果>

得られたRNAの0.5 μgを、TransIT®-mRNA Transfection Kit(製品コード MIR2250ほか)を用いてHEK293T細胞にトランスフェクションした。24時間後の細胞を回収してFLucの活性を測定したところ、23塩基が残存するプラスミド鋳型から調製したmRNAでは、他と比べ活性が著しく低下していた。

一方、残存塩基が5塩基以下である場合はいずれも高活性を示し、大差はないものの残存塩基が少なくなるにつれ活性が若干高くなる傾向が見られた。残余塩基数が0 ntの時に翻訳効率が最大となることから、mRNA合成を目的とする鋳型DNAプラスミドのデザイン時はBspQ IなどのType IIS制限酵素の使用が推奨される。

※Poly(A)配列直下の残余塩基が3塩基となるHind IIIで直鎖化した場合、若干翻訳効率が下がるものの、残余塩基 0 ntの結果と大きな差は認められなかった。

製品名	容量	製品コード	価格
BspQ I	500 U	1227A	¥10,000
	2,500 U	1227B	¥39,000

RNase A活性を阻害しRNAの安定化に寄与

Recombinant RNase Inhibitor ver.2.0

- Porcine liverを由来とするRNase inhibitor組換え体のバージョンアップ製品
- 不活化の原因となりやすいシステイン残基に変異を導入し、酸化耐性が向上
- RNAの安定性が要求されるIVTやRT-PCRといった様々な反応液中で使用可能

Application

酸化耐性能の比較

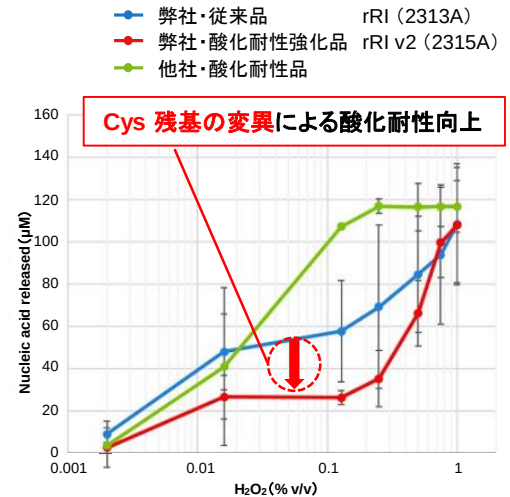
(弊社比較データ)

<方法>

酸化耐性能を強化したRecombinant RNase Inhibitor ver.2.0 (製品コード 2315A/B)、従来品のRecombinant RNase Inhibitor (2313A) および他社酸化耐性RNase Inhibitorについて、過酸化水素 H_2O_2 を用いて酸化耐性能を評価した(3重測定×2回の試験)。

<結果>

H_2O_2 濃度が低い領域では大きな差はないが、 H_2O_2 濃度が0.01%を超えるあたりからRNase Aによる基質(16S/23S rRNA)の分解・遊離に差が生じ、不活化の原因となりやすいシステイン残基に変異を導入したRecombinant RNase Inhibitor ver.2.0 (製品コード 2315A/B) が最も強い酸化耐性を有していることが示された。



製品名	概要	容量	製品コード	価格
Recombinant RNase Inhibitor ver.2.0	RNase A活性を阻害しRNAの安定化に寄与。不活化の原因となりやすいCys残基に変異を導入し、酸化耐性能を向上させたバージョンアップ製品	5,000 U	2315A	¥16,000
		25,000 U	2315B	¥60,000
Recombinant DNase I (RNase-free)	中性域での安定性が向上。RNA調製にも安心して使用可能	1,000 U	2270A	¥13,000
Poly(A) Polymerase	ポリリボヌクレオチド (RNA) の3'末端にアデニル残基を重合していく酵素	20 U	2180A	¥20,000
T4 RNA Ligase	5'-P末端のオリゴヌクレオチドと3'-OH末端のオリゴヌクレオチドを結合させる酵素	1,000 U	2050A	¥21,000

mRNAワクチン研究／RNA医薬開発のスケールアップ・プロセス開発等に利用可能

mRNA製造用酵素(HQグレード／GMPグレード)

タカラバイオは、一般研究用試薬(RUOグレード)のほか、RNA医薬・ワクチン製造工程のプロセス開発時等の使用を想定したHigh Quality (HQ) グレードやワクチン製造の原材料となるGMPグレードなど、各開発段階に対応可能な酵素開発を日本国内で進めており、順次発売していく予定です。弊社ウェブサイトをご確認のうえ、利便性の高いmRNA合成関連試薬をぜひお試しください。



Hot topic!

		基礎研究	プロセス開発	医薬品製造
		RUO grade	HQ grade	GMP grade
各ヌクレアーゼフリー試験		✓	✓	✓
不純物試験 Endotoxin、Bioburden、ホストセル、DNA/RNA/Protein 等		—	✓	✓
生物由来原材料フリー	最終組成液	—	✓	✓
	一次原料	—	—	✓
βラクタムフリー	最終組成液	—	✓	✓
	一次原料	—	—	✓
原材料(規格)		ISO 9001: 2015	ISO 9001: 2015	適格性評価 (PIC/S GMP)
製造工程(規格)		ISO 9001: 2015	ISO 9001: 2015	PIC/S GMP

RUO grade:

一般研究用試薬と同等の品質試験を実施。

HQ grade:

GMP gradeと同じ品質試験を実施し、ほぼ同じ原材料と工程を用いて製造(※1)。**ワクチン製造工程のプロセス開発時などに適している。**

※1: 準拠する規格、製造設備は異なる

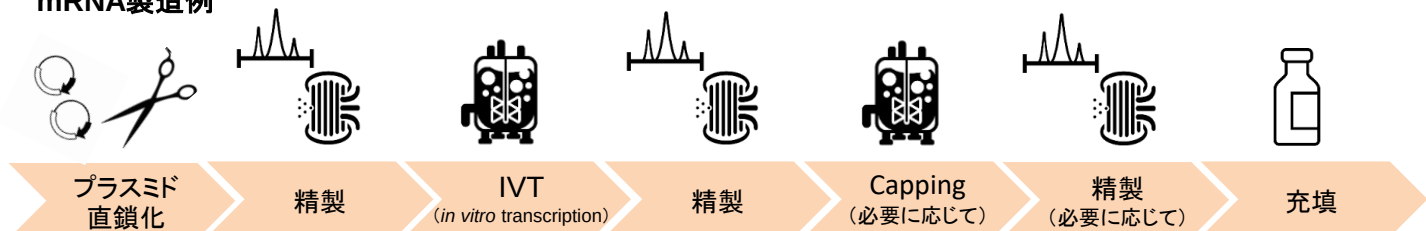
GMP grade:

PIC/S (医薬品査察協定及び医薬品査察共同スキーム) のGMPガイドラインに準拠し、製造および品質管理を実施。**医薬品の原薬製造に**適している。

GMPグレードのmRNA製造／品質試験もお任せください!!

- 治験薬製造実績に基づいたmRNA製造プロセスを提案
- シングルユースシステムを用いたGMPグレードのmRNA製造
- ラボスケールからスケールアップ対応可能
- GMPグレードはmRNA 約1 gから様々なスケールに対応
- GMP対応の品質試験を多数ラインナップ

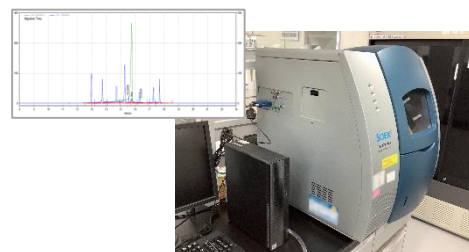
mRNA製造例



mRNA品質試験

試験項目	試験法
RNA濃度・純度試験	UV分光光度計
mRNA完全性試験	キャピラリーゲル電気泳動
塩基配列確認試験	サンガーシーケンス(信頼性保証)
キャッピング効率試験	LC/MS
PolyA鎖長確認試験	LC/MS キャピラリーゲル電気泳動
タンパク質残留試験	Micro BCA法またはNano Orange法
プラスミドDNA残留試験	qPCR法
二本鎖RNA残留試験	ELISA法
pH試験	日本薬局方
浸透圧試験	日本薬局方
エンドキシン試験	日本薬局方(カイネティック比濁法)
微生物限度試験	日本薬局法(メンブレンフィルター法)

※特性解析試験：力価試験など、別途開発のご相談を承ります。



キャピラリー電気泳動

研究用mRNA作製も承ります

用途に合わせたグレードのmRNAを作製いたします。
少量(1 mg～)からご提供します。

お気軽にお問い合わせください →



・本パンフレットで紹介した製品はすべて研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
・タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
・ライセンスなどに関する最新の情報は弊社ウェブサイトをご覧ください。
・本パンフレットに記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。
・本パンフレット記載の価格は2023年6月1日現在の希望小売価格です。価格に消費税は含まれておりません。

2023年6月修正N

タカラバイオ株式会社

東日本支店・西日本支店 TEL 03-3271-8553 FAX 03-3271-7282
関西支店・営業第2部 TEL 077-565-6969 FAX 077-565-6995
テクニカルサポートライン TEL 077-565-6999 FAX 077-565-6995
Website <https://www.takara-bio.co.jp>
Facebook <https://www.facebook.com/takarabio.jp>

取扱店