

製品コード 6140

研究用

Takara

***in vitro* Transcription T7 Kit**
(for siRNA Synthesis)

説明書

v202104Da

in vitro transcription 反応は、プロモーター配列を含む二本鎖 DNA を鋳型として、RNA ポリメラーゼにより一本鎖 RNA を合成する反応です。近年、RNAi、*in vitro* translation、subtractive hybridization、構造分析、RNA splicing の研究、リボザイムの作製、アンチセンス RNA、RNA-タンパク質 interaction の研究など RNA についての研究のために大量の RNA が必要とされるようになり、簡便かつ効率のよい *in vitro* transcription 反応が広く利用されています。

in vitro Transcription T7 Kit (for siRNA Synthesis) は、このような大量の RNA を *in vitro* transcription 反応により合成するためのキットです。本キットで使用する T7 RNA ポリメラーゼは、T7 プロモーター配列の下流領域を転写し効率よく一本鎖 RNA を合成します。たとえば、本キットの Control Template (直鎖状にしたプラスミド DNA) 20 ng を鋳型として約 2 kb の RNA を合成する場合には、20 μ l の反応で通常 10 μ g 程度の RNA が得られます。

また、このキットには一本鎖 RNA のグアニル酸残基の 3' 側のホスホジエステル結合のみを特異的に切断する酵素、RNase T₁ が含まれており、*in vitro* transcription 反応により siRNA の合成も行うことができます (VIII. siRNA の作製を参照)。

(注意) このキットは、大量の RNA を合成するために至適化していますので、高比活性の RNA プローブを作製する目的にはお勧めできません。

I. 内容 (50 回分、20 μ l 反応)

1.	10 × Transcription Buffer	100 μ l
2.	T7 RNA Polymerase (50 U/ μ l)	100 μ l
3.	RNase Inhibitor (40 U/ μ l)	25 μ l
4.	ATP Solution (50 mM)	100 μ l
5.	GTP Solution (50 mM)	100 μ l
6.	CTP Solution (50 mM)	100 μ l
7.	UTP Solution (50 mM)	100 μ l
8.	RNase free DNase I (5 U/ μ l)	200 μ l
9.	Control Template (50 ng/ μ l)	20 μ l
10.	RNase T ₁ (100 U/ μ l)	25 μ l
11.	RNase T ₁ Dilution Buffer	700 μ l
12.	RNase Free dH ₂ O	1 ml
13.	10 × Annealing Buffer*	500 μ l

* : siRNA 作製のための 2 本のオリゴヌクレオチドをアニーリングする際に使用します。

[組成]	100 mM	Tris-HCl, pH8.0
	500 mM	CH ₃ COOK
	10 mM	EDTA

II. 保存

− 20°C

III. 操作上の注意

鋳型となる二本鎖 DNA や、反応に使用するチューブ、マイクロピペット用チップなどに RNase が混入した場合、反応後に得られる transcript RNA は収量が低下したり、状態の悪いものになってしまいます。反応に使用するチューブ、マイクロピペット用チップは専用のものとし、反応を行うときはディスポーザブル手袋を着用し、RNase が混入しないように注意します。また、プラスミド調製などの RNase を使用する区画で反応を行うことは避けてください。

IV. 鋳型 DNA の調製

T7 プロモーターを含む、直線化したプラスミドあるいは PCR 増幅産物を鋳型として使用します。

T7 プロモーター配列

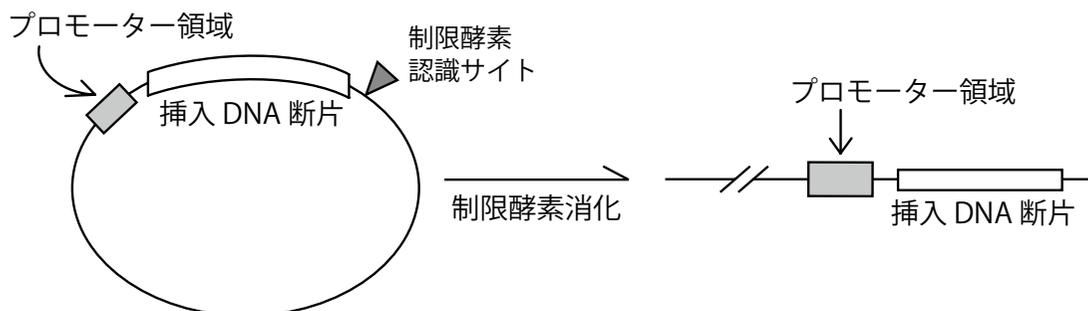


太文字の + 1 の G より transcript RNA が合成されていきます。

(1) プラスミドの場合

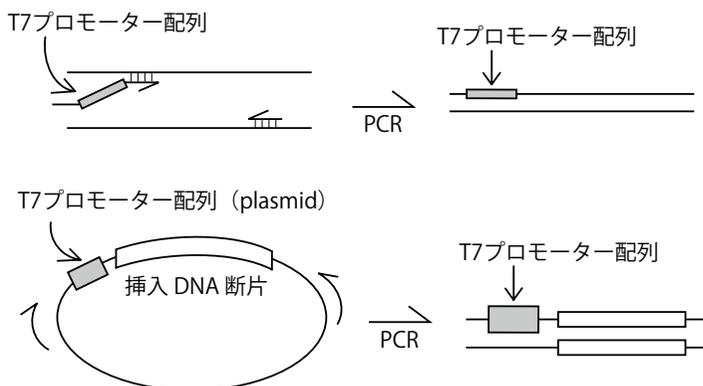
T7 プロモーター配列を有するプラスミドベクターに、目的とする DNA 断片をクローニングします。次いで、目的の DNA 断片をクローニングしたプラスミドを直線化するために制限酵素で消化します。この時、プロモーター領域と反対側で、挿入した DNA 断片の下流に位置し、挿入 DNA 断片中に認識配列を持たない制限酵素を使用して反応を行います。制限酵素は 5' 突出あるいは平滑末端を形成するものを用いてください (文献 3 参照)。反応終了後、次の手順で Proteinase K 処理、および精製を行います。

- 1) 反応終了後の制限酵素反応液に、Proteinase K を最終濃度 100 $\mu\text{g/ml}$ 、SDS を最終濃度 0.5% となるように添加する。
- 2) 37°C で 30 分間反応を行う。
- 3) TE 飽和フェノール/クロロホルム処理を行う。
- 4) 1/10 量の 3 M 酢酸ナトリウムと 2.5 倍量のエタノールを加えてエタノール沈殿を行う。
- 5) 遠心により回収した DNA の沈殿を 80% エタノールで洗浄する。
- 6) RNase-free の TE バッファーに溶解する。



(2) PCR 増幅産物の場合

5' 側に T7 プロモーター配列 (TAATACGACTCACTATAGGG) を付加したセンスプライマー (この時、この T7 プロモーター配列の上流にさらに 6 ~ 10 ヌクレオチドを付加することで、効率的に T7 RNA Polymerase が結合し、RNA を合成することができます)、あるいは、インサートを挿入したプラスミド DNA 中の T7 プロモーター領域の上流に設定したセンスプライマーと、アンチセンスプライマーを用いて PCR を行います。得られた増幅産物を NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (製品コード 740609.10/.50/.250) を用いて精製します。



V. *in vitro* transcription 反応

(1) 以下のように反応液を調製する。

試薬	使用量
10 × Transcription Buffer	2 μl
ATP Solution	2 μl
GTP Solution	2 μl
CTP Solution	2 μl
UTP Solution	2 μl
RNase Inhibitor	0.5 μl
T7 RNA Polymerase	2 μl
RNase Free dH ₂ O	x μl
linear template DNA	20 ng ~ 1 μg ^{注)}
Total	20 μl

注) 10 × Transcription Buffer 中にはスペルミジンが含まれています。スペルミジンは核酸と複合体を形成して場合によっては不溶物質として沈殿する可能性があります。鋳型 DNA は必ず最後に加えるようにしてください。

上記反応液調製は 20 μl 反応容量ですが、スケールアップもしくはスケールダウンが可能です。

(2) ピペティングにより穏やかに混和したのち、軽く遠心してチューブの下部に反応液を集め、インキュベーターを用いて 42°C で 1 ~ 2 時間反応を行う。

(注意) 反応終了後、白い沈殿が生じる場合があります。これは、反応により遊離したピロリン酸と反応液中のマグネシウムにより産生されたピロリン酸マグネシウムと考えられます。あとの操作に影響はありませんが、除きたい場合は EDTA を添加することで消失します。EDTA を加えるとあとの操作に影響がある場合は、遠心を行って上清を回収します。

VI. DNase 処理

鋳型 DNA を除きたい場合は、transcription 反応後に次の手順で DNase 処理を行います。

- (1) transcription 反応後、10 ~ 20 U/20 μ l 反応液となるように RNase free DNase I を加え混和する。
- (2) 37°C で 30 分間反応を行う。

VII. transcript RNA の精製

A. 下記の手順でフェノール/クロロホルム抽出、イソプロパノール沈殿を行います。

反応液の volume が 100 μ l より少ない場合、RNase free の滅菌精製水を加えて全量を 100 μ l とすると取り扱いやすくなります。

- (1) 等量の酸性フェノール (pH4.5) /クロロホルム/イソアミルアルコール (25 : 24 : 1) を加えて vortex によりよく攪拌し、12,000 rpm で 2 分間、室温で遠心する。
- (2) 上層 (水層) を新しいチューブに移し、クロロホルム/イソアミルアルコール (24 : 1) を等量加えて vortex によりよく攪拌し、12,000 rpm で 2 分間、室温で遠心する。
- (3) 上層 (水層) を新しいチューブに移し、1/10 量の 3 M 酢酸ナトリウム、等量のイソプロピルアルコールを加えてよく攪拌する。
- (4) 室温で 5 分おいた後、15,000 rpm で 5 分間室温で遠心する。
- (5) 注意深く上清を取り除き、80%エタノールで沈殿を洗浄する。
- (6) 減圧下で軽く乾燥させた後、RNase-free の滅菌精製水もしくは TE buffer に溶解する。
- (7) 必要に応じて小分けし、- 20 ~ - 70°C で保存する。

B. 市販キットを使用する場合 (transcript RNA size >200 bases の場合)

NucleoSpin RNA Clean-up (製品コード 740948.10/740948.50/740948.250)

または

NucleoSpin RNA Clean-up XS (製品コード 740903.10/740903.50/740903.250)

をご利用ください。

VIII. siRNA の作製

本キットを用いて、以下の方法で siRNA を作製することができます。詳細は 7 ページからの実験例をご参照ください。

【概要】

< Step 1 >

T7 プロモーター配列を付加した siRNA 配列を有する二本鎖 DNA オリゴヌクレオチドを二組作製します。



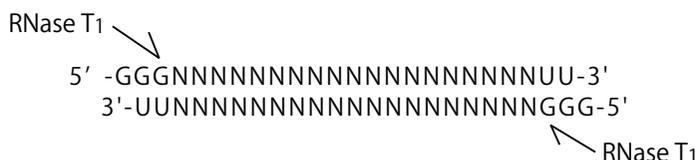
< Step 2 >

作製した二組の二本鎖オリゴヌクレオチドを鋳型として 1 本のチューブ中で *in vitro* transcription 反応を行うことにより、センス、アンチセンスのそれぞれの RNA が同時に合成されます。合成された RNA は二本鎖を形成します。



< Step 3 >

DNase I により鋳型のオリゴヌクレオチド、さらに RNase T1 処理により一本鎖の RNA 部分 (GGG) を分解します。



< Step 4 >

3' 末端 2 塩基が突出した siRNA を精製、回収します。



[オリゴヌクレオチドの設計について]

siRNA 作製用合成オリゴヌクレオチドを設計するには、まず目的の siRNA の配列を決める必要があります。次に siRNA のセンス鎖、アンチセンス鎖それぞれに対して一組ずつ、計 4 本について適切な向きに T7 プロモーター配列を付加したオリゴヌクレオチドを設計します。この時、T7 プロモーターの上流に 6 base 程度の任意配列を付加しておくこと転写効率が高くなります。

<実験例：GFP に対する siRNA の作製>

(1) 鋳型 DNA オリゴヌクレオチドの合成

プロモーター領域

5'-GATCACTAATACGACTCACTATAGGG**GGAGTTGTCCCAATTCTTGT**T-3' Oligo-1
3'-CTAGTGATTATGCTGAGTGATATCCCC**CTCAACAGGGTTAAGAACA**A-5' Oligo-2

5'-**AAGGAGTTGTCCCAATTCTTG**CCCTATAGTGAGTCGTATTAGTGATC-3' Oligo-3
3'-**TTCTCAACAGGGTTAAGAACA**GGGATATCACTCAGCATAATCACTAG-5' Oligo-4
プロモーター領域

以上の4本を siRNA 作製の鋳型オリゴヌクレオチド用に合成した。T7 RNA Polymerase が効率よく RNA を合成するようにプロモーター領域の上流に6ヌクレオチドを付加してある。

また、negative control として、上記太文字の塩基配列をシャッフルした以下のオリゴヌクレオチドも合成した。

プロモーター領域

5'-GATCACTAATACGACTCACTATAGGG**GGGATGTCTCACATCTTGT**TT-3' n-Oligo-1
3'-CTAGTGATTATGCTGAGTGATATCCCC**CTACAGAGTGTAGAACA**AA-5' n-Oligo-2

5'-**AAGGGATGTCTCACATCTTGT**CCCTATAGTGAGTCGTATTAGTGATC-3' n-Oligo-3
3'-**TTCCCTACAGAGTGTAGAACA**GGGATATCACTCAGCATAATCACTAG-5' n-Oligo-4
プロモーター領域

(2) 二本鎖オリゴヌクレオチドの調製 (アニーリング)

- 1) 合成したオリゴヌクレオチドを 100 pmol/ μ l となるように滅菌精製水に溶解し、チューブに次のように試薬を加えよく混和した。

10 × Annealing Buffer	2 μ l
100 pmol/ μ l Oligo A* ¹	2 μ l
100 pmol/ μ l Oligo B* ²	2 μ l
滅菌精製水	14 μ l

A*¹、B*² の組み合わせ

Oligo-1 と Oligo-2、Oligo-3 と Oligo-4、n-Oligo-1 と n-Oligo-2、n-Oligo-3 と n-Oligo-4 がそれぞれ対になるようにオリゴヌクレオチドを加えた。

- 2) 各混合液をサーマルサイクラーにセットし、95°Cで2分間熱処理した後、45分かけて25°Cに冷やし、そのまま10分間保持した。それぞれ200 pmolのオリゴヌクレオチドを用いて20 μ lの反応 volume でアニーリングを行ったので、得られた二本鎖オリゴヌクレオチド溶液は10 pmol/ μ lとなる。この溶液を鋳型 DNA 溶液とした。鋳型 DNA 溶液は使用するまで-20°Cで保存した。

(3) *in vitro* transcription 反応

1) 以下のように反応液を調製した。

試薬	使用量
10× Transcription Buffer	2 μ l
ATP Solution	2 μ l
GTP Solution	2 μ l
CTP Solution	2 μ l
UTP Solution	2 μ l
RNase Inhibitor	0.5 μ l
T7 RNA Polymerase	2 μ l
RNase Free dH ₂ O	x μ l
10 pmol/ μ l 鋳型 DNA 溶液 (Oligo-1/-2)	1 μ l
10 pmol/ μ l 鋳型 DNA 溶液 (Oligo-3/-4)	1 μ l
Total	20 μ l ^{注2)}

同様に、n-Oligo-1/-2 と n-Oligo-3/-4 の鋳型 DNA 溶液を用いて反応液を調製した。

注 1) 10× Transcription Buffer 中にはスperlミジンが含まれています。スperlミジンは核酸と複合体を形成して場合によっては不溶物質として沈殿する可能性があるため、鋳型 DNA は必ず最後に反応液に添加します。

注 2) 必要に応じて反応系のスケールアップが可能です。

2) ピペッティングにより穏やかに混和した後、軽く遠心してチューブの下部に反応液を集め、42°C で 2 時間反応を行った。反応液の一部を用いて電気泳動を行い、産物を確認した。

(4) ヌクレアーゼ処理

1) 転写反応を行ったチューブに以下の試薬を加えて混和した。

RNase free DNase I (5 U/ μ l)	2 μ l
RNase T ₁ (4 U/ μ l) *	1 μ l

* : 4 U/ μ l RNase T₁ : キットに含まれる 100 U/ μ l の RNase T₁ を RNase T₁ Dilution Buffer を用いて 4 U/ μ l に調製する。
(希釈後の酵素液は保存できないので、必要量を用時調製する。)

注) スケールアップした場合は、反応液量に応じた量の酵素液を加えてください。

2) 37°C、2 時間反応を行った。

(5) 精製

- 1) 等量の酸性フェノール (pH4.5) / クロロホルム / イソamilアルコール (25:24:1) を加えて転倒混和し、室温で 10,000 rpm × 5 分間遠心した。
- 2) 上層 (水層) を新しいチューブに移し、等量の 5 M 酢酸アンモニウム (pH5.6) と 4 倍量の 99.5% エタノールを加えて転倒混和し、室温で 5 分間静置した。さらに室温で 15,000 rpm × 10 分間遠心して上清を取り除いた後、80% エタノールを 100 μ l 加え、室温で 15,000 rpm × 5 分間遠心した。
- 3) 上清を取り除き軽く乾燥させた後、RNase free の滅菌精製水 20 ~ 50 μ l に溶解した。

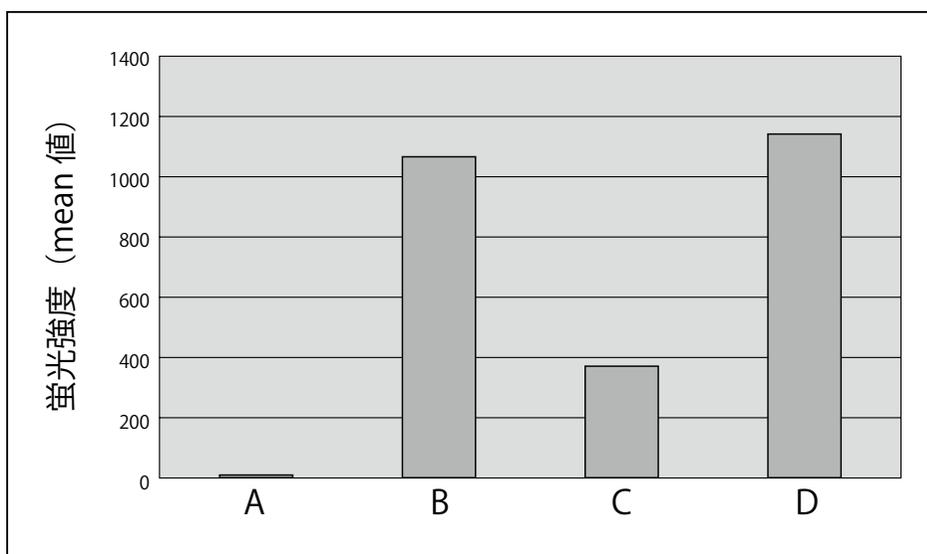
上記精製方法で NTP が十分に除けない場合、あるいはスケールアップして反応した場合は、CHROMA SPIN™ + TE-30 columns (製品コード 636069) などで精製を行ってください。

- 4) これを精製 siRNA とし、OD₂₆₀ 測定、電気泳動による確認を行った後、siRNA の効果検討を行った。

(6) siRNA の効果検討

- < 1 > GFP 発現プラスミドと siRNA を同時に 293T 細胞に導入し、RNAi 効果を検討した。

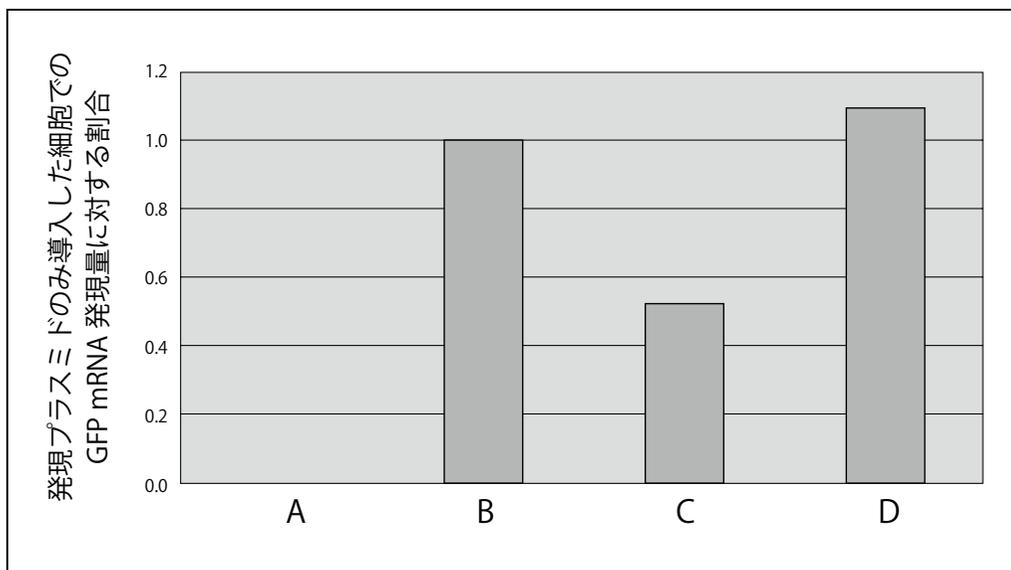
GFP 発現ベクターと siRNA を、*TransIT-293* Transfection Reagent (製品コード MIR2700) と *TransIT-TKO* Transfection Reagent (製品コード MIR2150) を用いて 293T 細胞に導入し、翌日 FCM (flow cytometry) にて GFP の蛍光強度 (mean 値) を測定した。



- A : 293T 細胞
B : 発現プラスミドのみ導入 (negative control)
C : 作製 siRNA 導入
D : 作製 siRNA-shuffle 導入 (negative control)

< 2 > < 1 >で siRNA を導入した細胞より抽出した total RNA を用いてリアルタイム RT-PCR を行い、GFP の mRNA 発現量を測定した。

Smart Cycler II System (Cepheid 社) により、インターカレーター法で検出を行った。50 ng の total RNA を鋳型として用い、4 種の housekeeping gene の発現量で RNA 量を補正した。



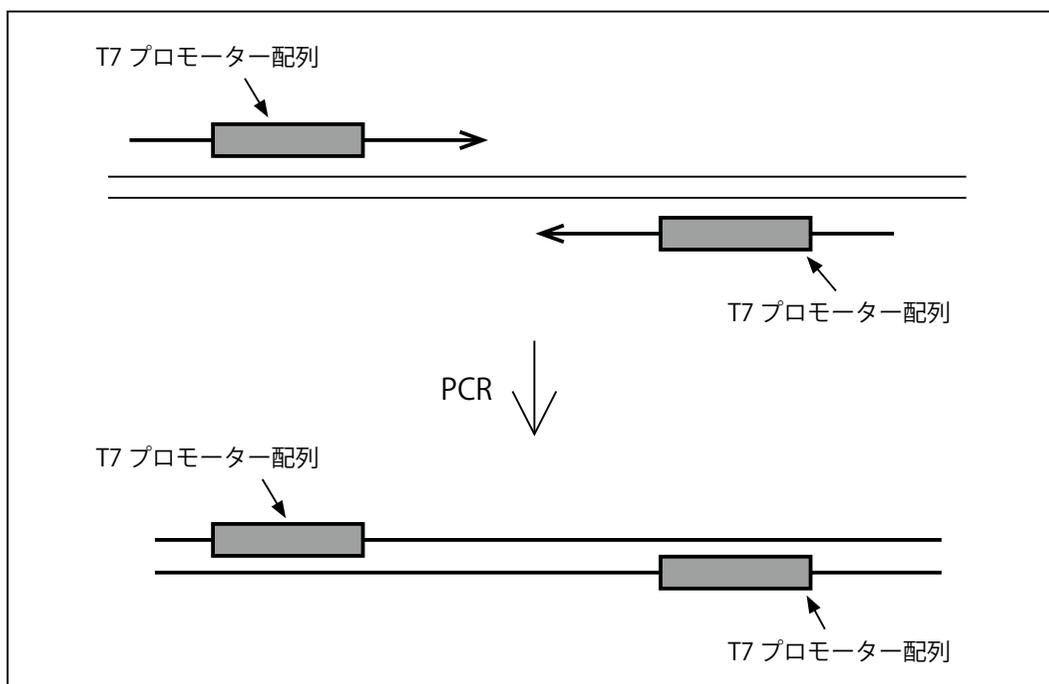
- A : 293T 細胞
- B : 発現プラスミドのみ導入 (negative control)
- C : 作製 siRNA 導入
- D : 作製 siRNA-shuffle 導入 (negative control)

以上のように、*in vitro* Transcription T7 Kit (for siRNA Synthesis) を用いて作製した GFP に対する siRNA は、GFP の発現を低下させていることが確認された。

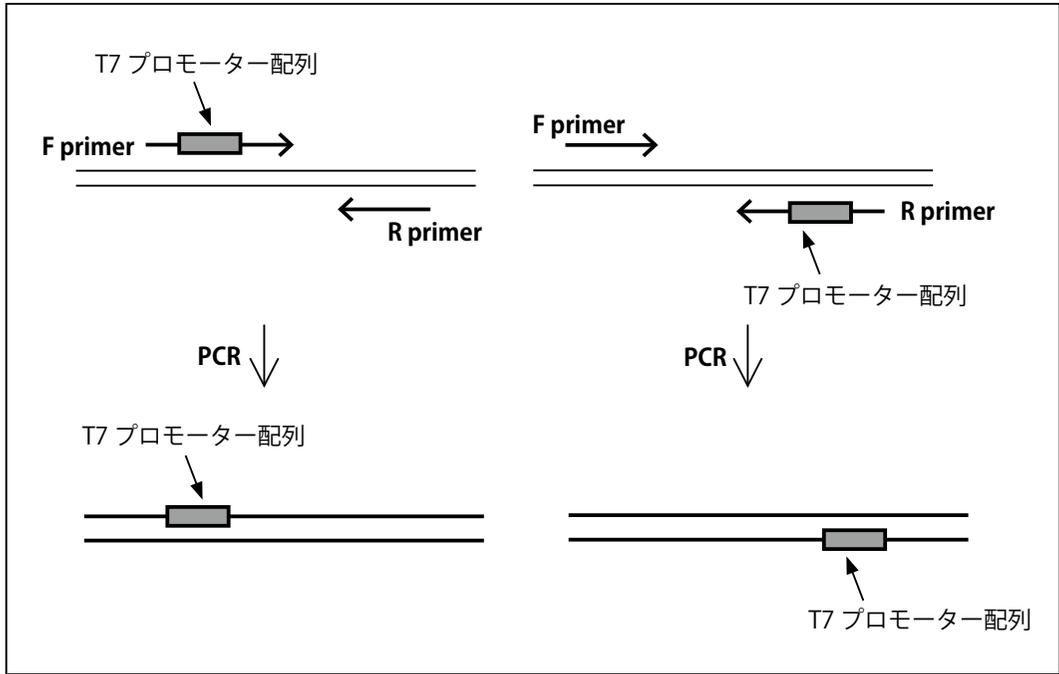
【備考】

本キットを用いて、下記のように Dicer および RNase III の基質となる二本鎖 RNA を合成することも可能です。

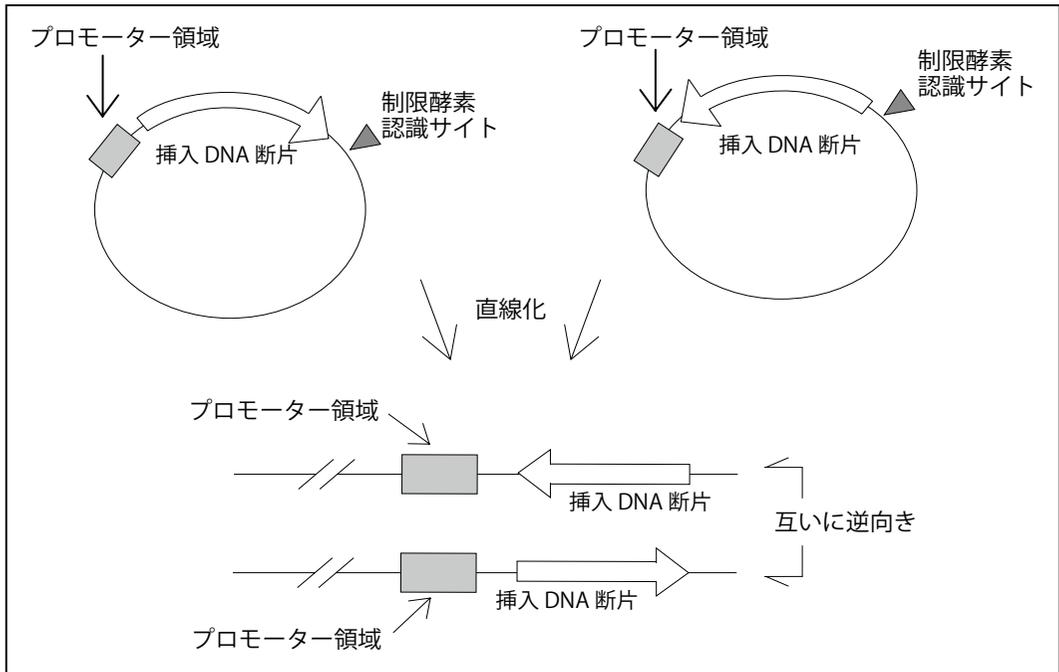
- (A) それぞれのプライマーの 5' 部分に T7 プロモーター配列を付加したプライマーを用いて PCR を行うことにより、それぞれの strand の 5' 部分に T7 プロモーター配列を有する二本鎖 DNA (鑄型例< 1 >) を作成することができる。これを鑄型として *in vitro* transcription 反応を行う。合成された RNA は、800 base 以下のものであれば反応中にアニーリングし、二本鎖 RNA を形成する。ただし (B) に比べると収量は少なくなる場合がある。
- (B) 片方のプライマーの 5' 部分に T7 プロモーター配列を付加したプライマーと通常の対をなすプライマーを用いて PCR を行い、二種類の増幅産物 (鑄型例< 2 >) を作製する。これらを鑄型として同量用い、1 本のチューブの中で同時に *in vitro* transcription 反応を行う。あるいは、別々に *in vitro* transcription 反応を行った後、アニーリング操作を行い、二本鎖 RNA を形成する。(A) に比べて収量が多い。
- (C) T7 プロモーター配列を有するベクターに transcript RNA を作製したいフラグメントを互いに逆向きにクローニングし、それぞれを直線化する (鑄型例< 3 >)。二種類の直線化したプラスミドを鑄型として同量用い、1 本のチューブの中で同時に *in vitro* transcription 反応を行う。あるいは、別々に *in vitro* transcription 反応を行った後、アニーリング操作を行い、二本鎖 RNA を形成する。



鑄型例< 1 >



鋳型例< 2 >



鋳型例< 3 >

IX. トラブルシューティング

1. RNA の合成量が少ない。

- (1) 使用した鋳型 DNA 中に RNase や EDTA などが混入していた。
 - 鋳型 DNA を Proteinase K で処理するとよいでしょう。
100 μ g の Proteinase K と 0.5% SDS を鋳型溶液に加え、37°C、30 分間処理した後、フェノール/クロロホルム処理、エタノール沈殿を行います。
80%エタノールでの洗浄を必ず行ってください。
- (2) 鋳型 DNA 中に NaCl が含まれていた。
 - 高濃度 (>30 mM) の NaCl は RNA polymerase の活性を低下させます。脱塩操作 (スピncラムを使用する、あるいは再度エタノール沈殿を行い、80%エタノールでの洗浄を 2 回くり返す) を行い NaCl を除いてください。
- (3) 鋳型 DNA 量が少なかった。
 - 反応に使用した鋳型 DNA が少なすぎる場合があります。調製した鋳型 DNA は、吸光度 (OD₂₆₀) を測定するだけでなく、電気泳動を行い、十分量使用していることを確認してください。
- (4) 反応時間が短かった。
 - 1 ~ 2 時間反応を行うことで十分量の transcript RNA が得られることを確認していますが、用いる鋳型 DNA によっては、まれに長い反応時間を必要とする可能性があります。4 時間くらいまで反応時間を伸ばしてみてください。

2. 複数の反応産物が見られる、または目的のサイズの反応産物が得られていない。

- (1) 3' 突出の制限酵素を使用した。
 - プラスミド DNA を鋳型とする場合、直線化する際に 3' 突出を形成する制限酵素を使用すると、長い transcript RNA が合成されてしまいます (文献 3 参照)。3' 突出を形成する制限酵素は使用しないでください。他の制限酵素が使用できない場合は平滑末端処理を行ってください。
- (2) プラスミドを直線化するための制限酵素反応で切れ残りがあった。
 - 直線化したサンプルを電気泳動により確認します。切れ残りがある場合は、もう一度制限酵素処理を行ってください。
- (3) 電気泳動時に RNA が二次構造を形成した。
 - *in vitro* transcription 反応で合成された RNA を通常の非変性ゲルを用いて電気泳動を行うと、RNA が二次構造を取るために、予想されるサイズよりも大きなサイズのバンドと予想されるサイズの二本のバンドが認められることがあります。変性ゲルを用いて泳動を行ってください。あるいは、例えば [64% ホルムアミド、26 mM MOPS (pH7.2)、6.45 mM 酢酸ナトリウム、0.6 mM EDTA] からなるバッファーと混合し、65°C、15 分処理を行った後に泳動を行うことにより、RNA の二次構造に由来するバンドは消失、もしくは軽減されます。

X. 参考文献

- 1) Davanloo, P., Rosenberg, A H., Dunn, J J., Studier, F W. Cloning and expression of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA*. (1984) **81**: 2035-2039.
- 2) Browning, K S. Transcription and translation of mRNA from polymerase chain reaction-generated DNA. *Amplifications*. (1989) **3**: 14-15.
- 3) Schenborn, E T. and Mierendorf Jr, R C. A novel transcription property of SP6 and T7 RNA polymerase : dependence on template structure. *Nuc Acids Res*. (1985) **13**: 6223-6236.
- 4) Heinonen, J E., Smith, C I., and Nore, B F. Silencing of Bruton's tyrosine kinase (Btk) using short interfering RNA duplexes (siRNA). *FEBS Letter*. (2002) **527**: 274-278.

XI. 関連製品

T7 RNA Polymerase (製品コード 2540A/B)
CHROMA SPIN™ +TE-30 Columns (製品コード 636069)
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (製品コード 740609.10/.50/.250)
NucleoSpin RNA Clean-up (製品コード 740948.10/.50/.250)
NucleoSpin RNA Clean-up XS (製品コード 740903.10/.50/.250)

XII. 注意

- ・本製品は研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断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。
- ・ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- ・CHROMA SPIN は Takara Bio USA, Inc. の商標です。その他、本説明書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。

製品についての技術的なお問い合わせ先
テクニカルサポートライン
Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995
ウェブサイト <https://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社