

製品コード 6141

研究用

---

**Takara**

**Takara IVTpro™  
mRNA Synthesis System**

---

説明書

v202207Da

Takara IVTpro mRNA Synthesis System は、以下の2つのキットで構成されており、TriLink 社の Cap アナログを用いて mRNA を合成する際の鋳型プラスミドを構築し、鋳型プラスミドから *in vitro* transcription (IVT) により、簡便に目的の mRNA を高収量で調製することが可能です。

- (1) Cloning Kit for mRNA Template は、TriLink 社の Cap アナログ [CleanCap Reagent AG あるいは CleanCap Reagent AG (3' OMe)] を用いた *in vitro* transcription (IVT) に使用可能な鋳型プラスミドを、簡便に構築することができるクローニングキット
- (2) Takara IVTpro T7 mRNA Synthesis Kit は、構築した鋳型プラスミドを用いて *in vitro* transcription (IVT) により高品質、高収量な CleanCap 修飾 mRNA を合成するキット

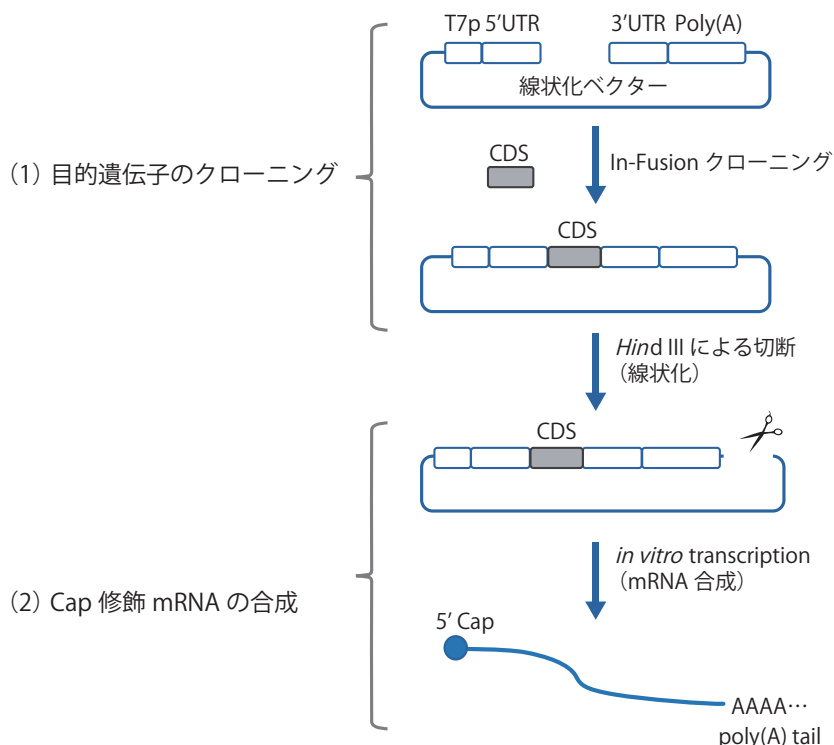


図 1. 本製品の実験フローの概略

### (1) Cloning Kit for mRNA Template (製品コード 6143)

予め線状化されたベクターには、T7 promoter、転写開始配列 (AGG)、5'-UTR (untranslated region)、3'-UTR、Poly(A) 配列 (105 塩基) が含まれているため、発現させたい遺伝子のコーディング配列 (coding sequence: CDS) を In-Fusion® クローニングするだけで、ヒトやマウスといった哺乳類細胞で使用可能な CleanCap Reagent AG を用いた mRNA 合成用の鋳型プラスミドを構築できます。

### (2) Takara IVTpro T7 mRNA Synthesis Kit (製品コード 6144)

T7 promoter 配列を含む二本鎖 DNA を鋳型として、mRNA を *in vitro* transcription (IVT) 反応により合成するためのキットです。真核生物における効率的なタンパク質の翻訳には RNA の 5' 末端に Cap 構造を必要としますが、本製品では CleanCap Reagent AG (TriLink 社: Code: N-7113-1/5/10) などを用いて、Cap 構造を持つ mRNA を効率よく調製することができます。また、導入細胞での免疫原性を低減する目的で、通常の UTP の代わりにシュード UTP 等も mRNA の収量を大きく低下させることなく使用することができます。詳しくは、Takara IVTpro T7 mRNA Synthesis Kit (製品コード 6144) の取扱説明書をご確認ください。

---

## I. 内容

### Cloning Kit for mRNA Template (製品コード 6143\*1) (10 反応系)

ⓁTV	Linearized Template Vector (50 ng/ $\mu$ l)	10 $\mu$ l
ⓁLuc	FLuc Control Fragment (100 ng/ $\mu$ l) *2	10 $\mu$ l
ⓁIn-Fusion	5 $\times$ In-Fusion Snap Assembly Master Mix *3	20 $\mu$ l

### Takara IVTpro T7 mRNA Synthesis Kit (製品コード 6144\*1) (20 回分、20 $\mu$ l 反応系)

ⓁTB	10 $\times$ Transcription Buffer	40 $\mu$ l
ⓁATP	10 $\times$ ATP	40 $\mu$ l
ⓁCTP	10 $\times$ CTP	40 $\mu$ l
ⓁGTP	10 $\times$ GTP	40 $\mu$ l
ⓁUTP	10 $\times$ UTP	40 $\mu$ l
ⓁEM	10 $\times$ Enzyme Mix	40 $\mu$ l
ⓁH <sub>2</sub> O	Nuclease-Free Water	1 ml $\times$ 3
ⓁDNase I	DNase I	80 $\mu$ l
ⓁLiCl	Lithium Chloride Precipitation Solution	600 $\mu$ l
ⓁPCT	Positive Control Template (FLuc) (0.5 $\mu$ g/ $\mu$ l) *4	10 $\mu$ l

\* 1 : 構成成分は単品でも販売しています。

\* 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です。

\* 3 : In-Fusion Snap Assembly Master Mix (製品コード 638943/638944/638947~638949) に含まれているコンポーネントと同じです (volume は各製品ごとに異なります)。

\* 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 です。

## II. 保存

− 20°C

---

### III. 本製品以外に必要な試薬、器具、機器（主なもの）

#### 【試薬】

- コンピテントセル
  - *E. coli* HST08 Premium Competent Cells (製品コード 9128) など
- SOC 培地
- LB (Luria-Bertani) 培地
- LB / カナマイシン (50  $\mu$ g/ml) プレート
- *Hind* III (製品コード 1060A/B)
- Cap アナログ
  - CleanCap Reagent AG (TriLink 社 : Code. N-7113-1/5/10)
  - CleanCap Reagent AG (3' OMe) (TriLink 社 : Code. N-7413-1/5/10)
- 修飾 NTP
  - N<sup>1</sup>-Methylpseudouridine-5'-Triphosphate
  - Pseudouridine-5'-Triphosphate
  - 5-Methoxyuridine-5'-Triphosphate
  - 5-Methylcytidine-5'-Triphosphate など
- エタノール
- 3M 酢酸ナトリウム (pH5.2)
- TE buffer (EDTA 濃度は 0.1 mM)

#### 【器具】

- 反応チューブ
- マイクロピペット、およびチップ

#### 【機器】

- 恒温槽あるいは Thermal cycler
- 冷却遠心機
- 分光光度計
  - NanoDrop (Thermo Fisher Scientific 社) など

### IV. 操作上の注意

鋳型となる二本鎖 DNA や試薬、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 RNA の収量が低下したり、RNA が断片化します。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て、RNase が混入しないようご注意ください。

## V. 目的遺伝子のクローニング：(1) Cloning Kit for mRNA Template

### V-1. 製品概要

Cloning Kit for mRNA Template (製品コード 6143) の製品概要を図 2 A/B に示します。

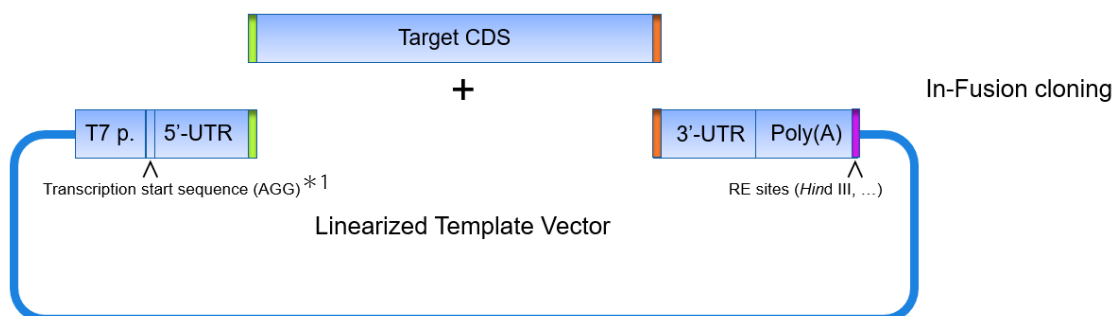


図 2A. In-Fusion クローニング\*2 による鑄型プラスミド構築

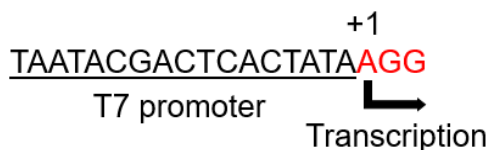


図 2B. CleanCap Reagent AG を用いる際の DNA 鑄型の転写開始配列 (AGG)

- \* 1 : 「Transcription start sequence (AGG)」は、CleanCap Reagent AG を用いた Cap 構造を持つ mRNA を効率よく調製するために必要な転写開始配列です。
- \* 2 : In-Fusion クローニングの詳細は、弊社ウェブサイトの In-Fusion Snap Assembly Master Mix (製品コード 638943/638944/638947～638949) ページをご参照ください。  
<https://catalog.takara-bio.co.jp>

---

## V-2. 鋳型 DNA の調製

※ 以下のプロトコールは Cloning Kit for mRNA Template (製品コード 6143) を使用します。

### A) 目的遺伝子の CDS 設計

1. 発現したい遺伝子の CDS 情報を得る。
  - ある遺伝子を発現させる場合、その CDS (タンパク質に翻訳される開始コドンから終止コドンまでの DNA 配列) が必要となります。遺伝子の一部領域を発現させる場合も、開始コドンと終止コドン配列は必要です (IV-2. B) PCR による目的 CDS 断片の準備」参照)。
  - ベクター側にも終止コドン配列が一つ含まれていますが、目的のタンパク質の翻訳を確実に終結させるために、終止コドンを含む CDS をご用意ください。
2. mRNA を導入する細胞の生物種に合わせて、CDS のコドンを最適化する。
  - オンラインツールや市販のソフトウェアをご使用ください。
  - *in vitro* transcription での RNA 合成の際、哺乳類宿主細胞での免疫原性を抑制する目的で通常の UTP の代わりにシュード UTP 等が使用されますが (参考文献 1)、配列自体に含まれる U の使用頻度を下げることが重要とされています (参考文献 2 および 3)。生物種に合わせたコドン最適化と U の使用頻度のバランスを考慮して、CDS を設計してください。
3. 鋳型プラスミドを線状化する際に使用する制限酵素サイト (*Hind* III 推奨) が、クローニングしたい目的遺伝子の CDS に存在しないことを確認する。使用する制限酵素サイトが CDS に存在する場合は、アミノ酸配列に変化が生じないよう異なるコドン (例えば、セリンコドンの “UCU” から “UCC” など) を利用して DNA 配列を変更する。

【注意】本ベクターでは、*Hind* III の使用を強く推奨します。

  - 目的とする mRNA の転写サイズを均一にするために、鋳型プラスミドを制限酵素で線状化します。制限酵素で切断された鋳型プラスミドの末端が 3' 突出である場合、意図しないアンチセンスやベクター配列に相当する RNA も合成されるとの報告がありますので (参考文献 4)、5' 突出あるいは平滑末端となる制限酵素を推奨します。また、mRNA の Poly(A) 配列後の余分な配列は、mRNA の翻訳効率を低下させる場合があります。できるだけ余分な配列を残さない制限酵素を用いて切断してください。
4. 決定した目的遺伝子の CDS を DNA 合成等により準備する。

## B) PCR による目的 CDS 断片の準備

- 下に示すように、目的遺伝子の CDS 増幅が可能な Forward および Reverse プライマーの 5' 末端に、15 塩基の In-Fusion 配列 (赤色) を付加する。
  - 開始コドン (青色) および終止コドン (緑色：相補鎖)
  - 設計した CDS に上記 In-Fusion 配列を付加した合成二本鎖 DNA 断片も In-Fusion クローニングに使用できます。その場合は、「V-2-C) In-Fusion クローニング」へお進みください。

【例：FLuc】

Forward プライマー：

5'-AGAGAACCCGCCACCATGGAGGACGCCAAGAACATCAA-3'

Reverse プライマー：

5'-CGAGGCTCCAGCTCATCACACGGCGATCTTGCCGC-3'

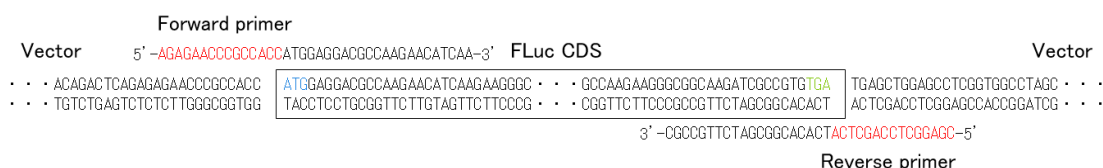





図 3. 目的 CDS 断片の増幅 (例：FLuc)

- 上記プライマーを用いて本製品の  $\text{TM}$  Linearized Template Vector の両末端と各々 15 塩基のオーバーラップ領域を有する CDS を PCR 増幅する。
  - 目的遺伝子の CDS 断片の増幅には、最高レベルの正確性を有する PrimeSTAR<sup>®</sup> Max DNA Polymerase (製品コード R045A/B)、あるいは高い正確性に加え高い PCR 成功率を有する TaKaRa Ex Premier<sup>™</sup> DNA Polymerase (製品コード RR370S/A/B、RR371S/A/B) をご利用ください。
- 反応液の一部 (例：5  $\mu$ l) をアガロース電気泳動し、増幅した PCR 産物とその量を確認する。
  - DNA 精製による溶出後、50~100 ng/ $\mu$ l 程度の DNA 溶液が必要となります。大きさの近い DNA マーカーのバンド量と比較し、十分量が増幅されていることを確認してください。
- 十分量の PCR 産物が単一バンドとして得られている場合、標準的なスピнкаラム精製キット (NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (製品コード 740609.10/.50/.250) など) を用いて精製する。
  - 精製後すぐに使用しない場合は、-20 $^{\circ}$ C で保存してください。
  - 増幅産物が複数ある場合は、目的の PCR 産物をゲル抽出するか、あるいは PCR 条件の最適化やプライマーの再設計をお試しください。

## C) In-Fusion クローニング

1.  Linearized Template Vector および B) で調製した目的 CDS 断片を室温にて融解し、軽く混合した後、スピンドアウンする。
2. 以下の反応液を調製する。

< 1 反応あたり >

試薬	使用量
 Linearized Template Vector (50 ng/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
In-Fusion 配列を付加した CDS 断片*	100 ng
Nuclease-Free Water	X $\mu$ l
 5 $\times$ In-Fusion Snap Assembly Master Mix	2 $\mu$ l
Total	10 $\mu$ l

\* :  FLuc Control Fragment を用いる場合は、1  $\mu$ l (100 ng) をご使用ください。




3. 50°C で 15 分間保温する。
  - ・ 反応後すぐに使用しない場合は、氷上あるいは -20°C にて保存してください。

## D) 形質転換

以下に *E. coli* HST08 Premium Competent Cells (製品コード 9128) を用いた際のプロトコールを示します。形質転換効率が  $1 \times 10^8$  cfu/ $\mu$ g 以上のコンピテントセルをご使用ください。

1. コンピテントセルを氷上で融解する。
2. 軽く混合した後、50  $\mu$ l のコンピテントセルをチューブに移す。
3. 2.5  $\mu$ l の反応液を加えて軽く混ぜ、30 分間氷上に静置する。
4. 42°C で 45 秒間、コンピテントセルをヒートショックする。
5. 氷上で 1 ~ 2 分間冷却する。
6. 450  $\mu$ l の SOC 培地を加え、37°C で 1 時間振盪培養する。
7. 培養液の原液、および SOC 培地での 10 倍希釈液 50  $\mu$ l をカナマイシンを含む LB プレートに塗布し、37°C で一晩培養する。

## E) 期待される結果

 FLuc Control Fragment を用いた場合、培養液の原液 50  $\mu$ l を撒いたプレートから通常 100 個以上のコロニーが得られます。コロニーを液体培養して、プラスミドを標準的な抽出方法 (NucleoSpin Plasmid (製品コード 740588.10) など) を用いて調製してください。得られたプラスミドは配列確認を行ってください。使用した  Linearized Template Vector の配列、および  FLuc Control Fragment を In-Fusion した際の配列情報は、製品ページをご確認ください。

- ・ 使用する大腸菌あるいは培養方法によっては、Poly(A) 配列が短くなる場合があります。得られたコロニー由来のプラスミドの配列確認を正確に行い、大腸菌クローンのグリセロールストックを複数作製することを推奨します。

Poly(A) 配列部分は、以下のプライマーを用いて確認できます。

Poly(A) Forward プライマー : 5'-CCTCGTGGCCTAGCTTCTT-3'

Poly(A) Reverse プライマー : 5'-CAGGGCTCCCAACCTTACC-3'



---

## VI. 鋳型 DNA の調製：(2) Takara IVTpro T7 mRNA Synthesis Kit

※ 以下のプロトコールは Takara IVTpro T7 mRNA Synthesis Kit (製品コード 6144) を使用します。

### A) 線状化鋳型プラスミドの調製

#### a) 制限酵素処理

RNA 合成に用いる鋳型 DNA は最終的に 0.5~1.0  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  の濃度が必要となります。制限酵素処理後のエタノール沈殿あるいはカラム精製による回収ロスも見込んで、以下の例を参考に、制限酵素処理するプラスミド量を決めてください。

#### 【例】

< 1 反応あたり >

試薬	使用量
鋳型プラスミド	50 $\mu\text{g}$
10 × M Buffer	20 $\mu\text{l}$
Nuclease-Free Water	X $\mu\text{l}$
<i>Hind</i> III (15 U/ $\mu\text{l}$ )	10 $\mu\text{l}$
Total	200 $\mu\text{l}$

*Hind* III (製品コード 1060A/B) を用いて 37°C で 3 時間、制限酵素処理を行う。

- 制限酵素処理が不完全で切れ残りの環状鋳型プラスミドが存在する場合、目的サイズ以上の大きな RNA が合成されます。処理した DNA の一部をアガロース電気泳動し、環状プラスミドが完全に切断されていることを確認してください。

#### b) エタノール沈殿

- 制限酵素処理後の溶液に、1/10 量の 3M 酢酸ナトリウム (pH5.2) および 2 倍量のエタノールを加える。
- 良く混合し、- 20°C で 15 分以上冷やす。
- 遠心機の最大スピードで 15 分間遠心し、DNA をペレット化する。
- 上澄み液を注意深く取り除き、1 ml の 70%エタノールを加えて再度同条件で遠心する。
- 上澄み液を再度注意深く取り除き、ペレットを乾燥させる。
- その後  $\oplus$  Nuclease-Free Water あるいは TE buffer (EDTA 濃度は 0.1 mM) で DNA を溶解し、DNA 濃度を測定する。必要に応じて、同溶解液の濃度が 0.5~1.0  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  になるように調整する。使用時まで - 20°C で凍結保存する。
  - この調製方法で得られた線状化プラスミドを用いて合成した mRNA に断片化が見られた場合は、RNase のコンタミネーションが考えられます。RNA の分解を防ぐために制限酵素処理後のプラスミドをフェノール：クロロフォルム抽出し、その後エタノール沈殿により精製してください。

### B) PCR 鋳型の調製

PCR 産物を鋳型として使用する場合は、T7 promoter から Poly(A) までの配列を PCR 増幅後に、上記と同様の標準的な精製方法により調製してください。

## VII. IVT 反応

### 1. 試薬の準備

- (EM) 10 × Enzyme Mix 以外の必要なコンポーネントは室温にて融解し、軽く混合した後、スピンドウンしてご使用ください。
- (EM) 10 × Enzyme Mix は軽くスピンドウンして、使用時まで氷上に置いてください（ボルテックス不可）。

### 2. 室温にて下記の各コンポーネントを加え、反応液を調製する。

※ 各コンポーネントは必ず**記載順**に加えてください。

【CleanCap Reagent AG[あるいは CleanCap Reagent AG (3' OMe)] を用いた mRNA 合成反応】

< 1 反応あたり >

試薬	使用量
(H <sub>2</sub> O) Nuclease-Free Water	X $\mu$ l
(TB) 10 × Transcription Buffer*1	2 $\mu$ l
(ATP) 10 × ATP*2	2 $\mu$ l
(CTP) 10 × CTP*2	2 $\mu$ l
(GTP) 10 × GTP*2	2 $\mu$ l
(UTP) 10 × UTP*2	2 $\mu$ l
CleanCap Reagent AG*3	1.6 $\mu$ l
鋳型 DNA*4	1 $\mu$ g
(EM) 10 × Enzyme Mix	2 $\mu$ l
Total*5	20 $\mu$ l

\* 1 : (TB) 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ので、必ず**記載順**にコンポーネントを加えてください。

\* 2 : **各 NTP 濃度は 100 mM です**。修飾 NTP を使用する場合は、対応する NTP を等量で置き換えてください。

\* 3 : CleanCap Reagent AG[あるいは CleanCap Reagent AG (3' OMe)] は、NTP に対して 4/5 のモル比（最終濃度 8 mM）でご使用ください（図 4 A/B 参照）。

\* 4 : AGG の転写開始配列を有する鋳型をご使用ください。最適な鋳型量是用いる鋳型の大きさや種類によって異なりますが、通常 0.5~2  $\mu$ g の範囲でご使用ください（図 5 参照）。(PC) Positive Control Template (FLuc) の場合は、2  $\mu$ l (1  $\mu$ g) を使用してください。

\* 5 : 必要量に応じてスケールアップ可能です（図 6 A/B 参照）。

### 3. よく混合した後、37°C で 2 時間保温する。

- ターゲットの長さや必要とする RNA 収量に応じて反応時間を調整してください（図 7 A/B 参照）。
- 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。その後の操作に影響はありませんので、次章「VIII. DNase I 処理」へお進みください。

---

## VIII. DNase I 処理

VII-3. の反応後、4  $\mu$ l の  $\ominus$  DNase I を加えて軽く混合した後、さらに 37°C で 15 分間保温する。

## IX. LiCl 沈殿精製

LiCl 沈殿法は、取り込まれなかった NTP やタンパクを効果的に取り除くことができます。しかしながら、RNA 鎖長が 300 塩基以下である場合、あるいは RNA 濃度が 0.1  $\mu$ g/ $\mu$ l 以下である場合は、RNA を効率的に回収できません。その場合は、標準的なフェノール：クロロフォルム抽出後のエタノール沈殿精製や、スピンカラム精製 (NucleoSpin RNA Clean-up (製品コード 740948.10/50/250)) をお試しください。これらの方法により精製された RNA は、トランスフェクションやエレクトロポレーション、あるいはマイクロインジェクションといった実験に使用可能です (図 8 A/B 参照)。

- VIII. で DNase I 処理した IVT 反応液約 24  $\mu$ l に、30  $\mu$ l の  $\oplus$  Nuclease-Free Water と 30  $\mu$ l の  $\oplus$  Lithium Chloride Precipitation Solution を加えて反応を停止する。
  - Lithium Chloride Precipitation Solution は使用前に室温で融解してください。融解後、よく混合しても沈殿物が見られる場合、37°C で溶液を温めてください。それでも沈殿物が残る場合は、そのままご使用ください。性能に影響はありません。
- 良く混合した後、- 20°C で 30 分以上保冷する。
- 冷却遠心機の最高回転数を用いて、4°C にて 15 分間遠心し、RNA をペレット化する。
- 上澄みを丁寧に除去し、1 ml の 70% エタノールでペレットを洗う。
- 再度、冷却遠心機の最高回転数を用いて 4°C にて 15 分間遠心する。
- 再度、丁寧に上澄みを除去する。
- ペレットを風乾し、100  $\mu$ l の  $\oplus$  Nuclease-Free Water で溶解する。
  - 過度な風乾は、 $\oplus$  Nuclease-Free Water での再懸濁が困難になりますので、ご注意ください。
  - RNA の収量によっては、溶解に時間がかかる場合があります。室温あるいは 4°C にて放置し、適宜混合して確認してください。
- 溶解後、RNA 濃度を NanoDrop 等で測定する。直ちに RNA サンプルを使用しない場合は - 20°C 以下で凍結保存する。
  - 取り込まれなかった NTP や Cap アナログ、また使用した鋳型 DNA が RNA 溶液に残存している場合には、OD 測定に影響を及ぼします。上記方法にて精製したサンプルを測定するようにしてください。
  - 必要に応じて、変性アガロース/アクリルアミドゲルや Bioanalyzer (Agilent 社) により、取得した RNA の長さや純度を確認してください。

## X. 実験例

### 【実験例 1-A】

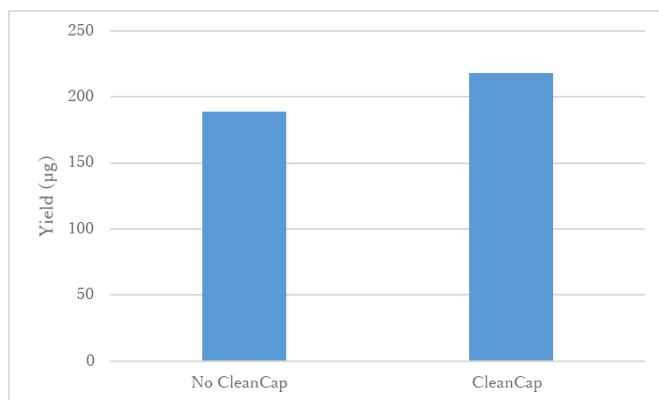


図 4 A. CleanCap Reagent AG (3' OMe) 使用時の RNA 収量

#### <方法>

CleanCap Reagent AG (3' OMe) 有無の IVT 反応液で、FLuc mRNA を合成した。

#### <結果>

CleanCap の使用による RNA 収量への影響はほとんど認められませんでした。

### 【実験例 1-B】

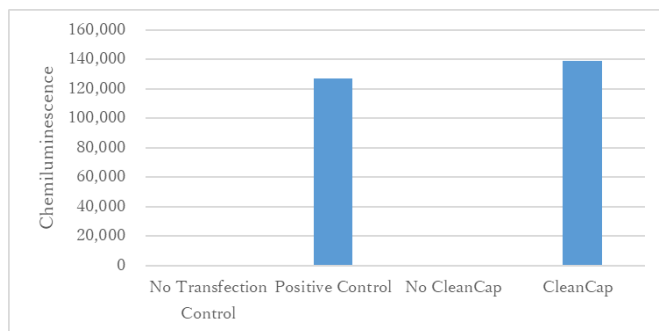


図 4 B. CleanCap Reagent AG (3' OMe) を用いて合成された FLuc mRNA の HEK293T 細胞での発現

#### <方法>

実験例 1-A で得られた RNA の 0.5 µg を *TransIT*-mRNA Transfection Kit (製品コード MIR2225/MIR2250/MIR2255/MIR2256) を用いて HEK293T 細胞にトランスフェクションした。

#### <結果>

24 時間後の細胞を回収し、FLuc の活性を測定したところ、CleanCap 有りの IVT 反応液で合成された FLuc mRNA では、市販の FLuc mRNA positive control と同等の活性を確認しました。一方、CleanCap 無しの IVT 反応液で合成された FLuc RNA では、活性はほぼ認められませんでした。このことは、RNA によるタンパク質の発現に Cap 付加が不可欠であることを示しています。

## 【実験例 2】

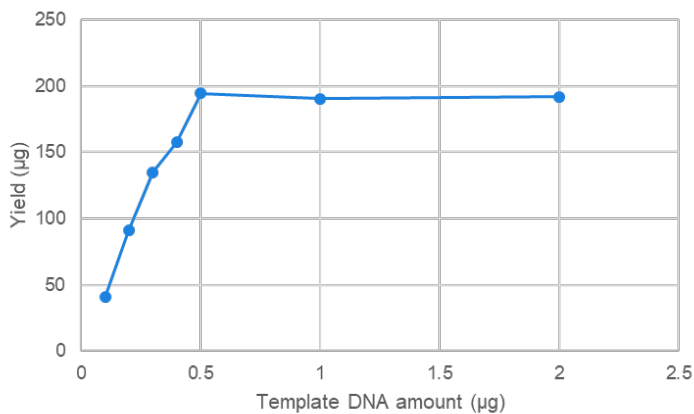


図 5. 鋳型 DNA 量と RNA 収量の関係

### <方法>

様々な量の Positive Control Template (FLuc) を鋳型として、CleanCap Reagent AG (3' OMe) および N<sup>1</sup>-メチルシュード UTP を含む IVT 反応を行った (20 μl 反応系)。

### <結果>

RNA 収量は 0.5 μg の DNA 量で頭打ちとなり、それ以上 (0.5 ~ 2 μg) ではほとんど収量に変化は認められませんでした。

### 【実験例 3-A】

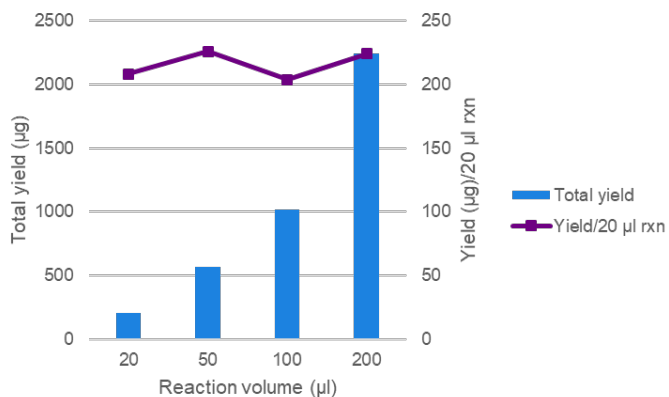


図 6 A. IVT 反応液スケールと RNA 収量の関係

#### <方法>

Positive Control Template (FLuc) を鋳型として、CleanCap Reagent AG (3' OMe) を含む IVT 反応液のスケールアップ実験を行った。反応液量以外は本説明書に記載の通り行った。

#### <結果>

RNA 収量は反応液量に比例し、反応液量をスケールアップしてもその収量に影響はありませんでした。

### 【実験例 3-B】

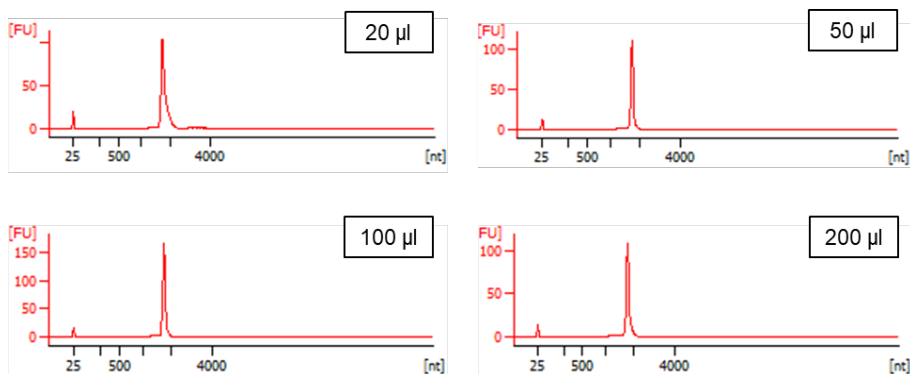


図 6 B. RNA 産物の Bioanalyzer による解析

#### <方法>

実験例 3-A で得られた RNA 産物 1 ng を Bioanalyzer にて確認した。

#### <結果>

反応液量による RNA 産物の違いは認められませんでした。

#### 【実験例 4-A】

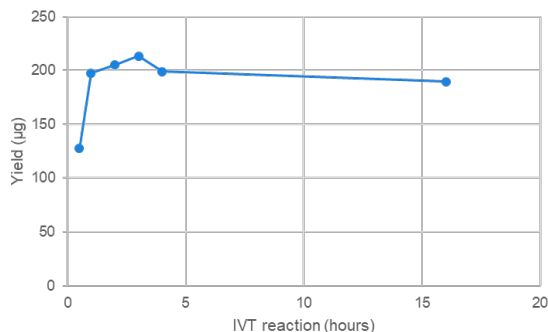


図 7 A. IVT 反応時間と RNA 収量の関係

##### <方法>

Positive Control Template (FLuc) を鋳型として、CleanCap Reagent AG (3' OMe) および N<sup>1</sup>-メチルシュード UTP を含む IVT 反応を様々な反応時間で実施した。

##### <結果>

合成する mRNA の長さが約 1.9 kb の場合、RNA 収量は約 1 時間でほぼ頭打ちとなり、それ以上 (1 ~ 16 時間) ではほとんど変化が認められませんでした。

#### 【実験例 4-B】

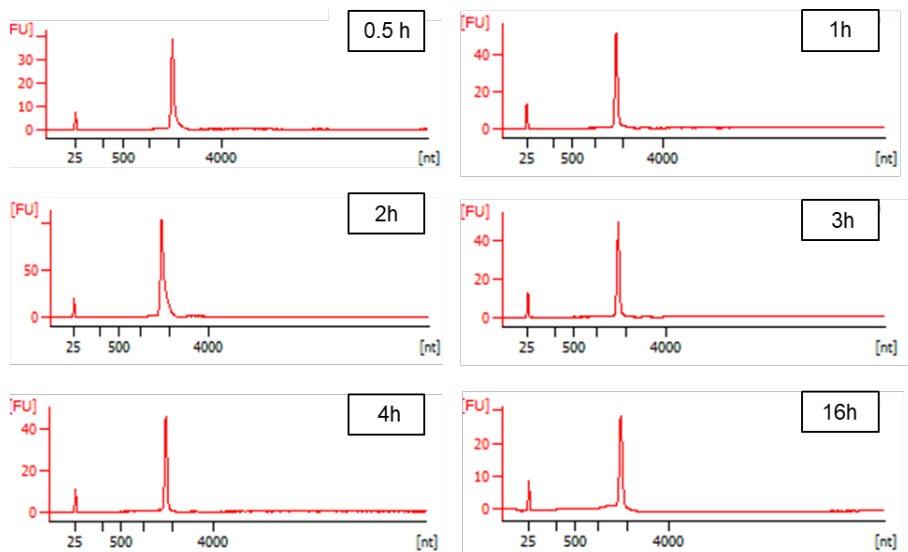


図 7 B. RNA 産物の Bioanalyzer による解析

##### <方法>

実験例 4-A で得られた RNA 産物 1 ng を Bioanalyzer にて確認した。

##### <結果>

反応時間による違いは認められませんでした。

### 【実験例 5-A】

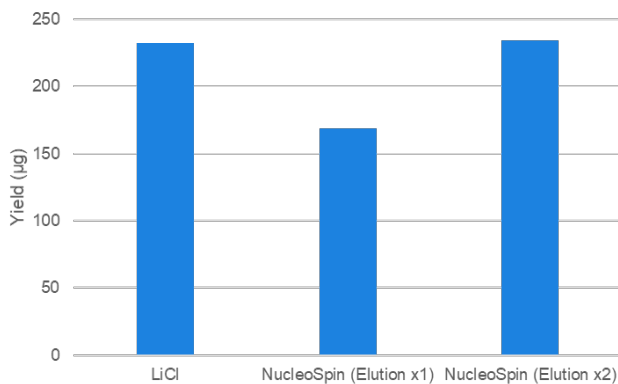


図 8 A. LiCl 沈殿法とスピнкаラム法による RNA 簡易精製

#### <方法>

CleanCap Reagent AG (3' OMe) および N<sup>1</sup>-メチルシュード UTP を含む IVT 反応で FLuc mRNA を合成し、LiCl 沈殿法もしくはスピнкаラム法により簡易精製した。

#### <結果>

LiCl 沈殿法と比べスピнкаラム法で溶出を 1 回実施した場合は、得られる RNA 量は低くなりましたが、溶出を 2 回実施 (50 µl × 2) することで LiCl 沈殿法と同程度の収量でした。スピнкаラム法においては、溶出は 2 回実施することを強く推奨します。

### 【実験例 5-B】

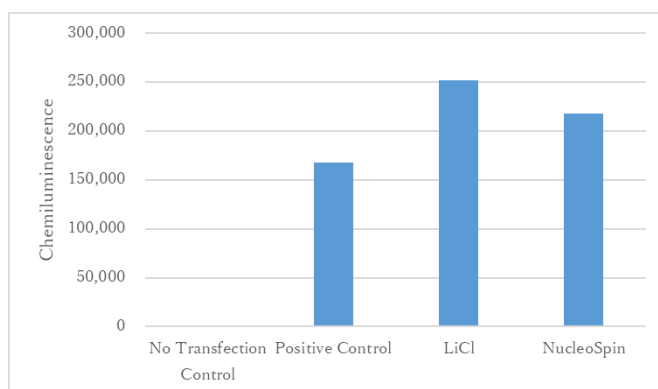


図 8 B. 簡易精製法により得られた FLuc mRNA の HEK293T 細胞での発現

#### <方法>

実験例 5-A で得られた RNA の 0.5 µg を、TransIT-mRNA Transfection Kit を用いて HEK293T 細胞にトランスフェクションした。

#### <結果>

24 時間後の細胞を回収し、FLuc の活性を測定したところ、どちらも市販の FLuc mRNA positive control と同等以上の活性を確認しました。



## XI. トラブルシューティング

### 【目的の鋳型プラスミドが得られない場合】

- In-Fusion Snap Assembly Master Mix (製品コード 638943/638944/638947～638949)  
ユーザーマニュアル記載の Troubleshooting Guide  
以下の弊社ウェブサイトをご参照ください。  
<https://catalog.takara-bio.co.jp>
- In-Fusion Cloning tips and FAQs  
以下の弊社 US ウェブサイトをご参照ください。  
<https://www.takarabio.com>

### 【その他の場合】

問題点	原因	解決策
RNA 収量が少ない	鋳型 DNA への RNase のコンタミネーション	制限酵素処理後の鋳型 DNA をフェノール：クロロフォルム抽出し、その後エタノール沈殿により精製してください。
	鋳型 DNA 量が不適切	調製した鋳型 DNA をアガロース電気泳動し、DNA 量を確認してください。OD 測定値との解離がある場合には、再度鋳型 DNA の精製を試みてください。
	反応時間が不十分	IVT の反応時間を延ばしてください。
	RNA 鎖長が 300 塩基以下、あるいは RNA 濃度が 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 以下	LiCl 沈殿法ではなく、標準的なフェノール：クロロフォルム抽出後のエタノール沈殿精製や、スピнкаラム精製をお試しください。
	RNA ペレットのロス	できるだけ最小のチップを装着したマイクロピペットを用いて、上澄みを丁寧に取り除いてください。
	RNA の溶解・溶出が不十分	RNA の収量によっては、溶解に時間がかかる場合があります。室温あるいは 4°C に放置し、適宜混合して完全に RNA が溶解されてから、RNA 量を測定してください。それでも溶解しない場合は、溶解液を追加してください。また、スピнкаラム精製溶出時には、1 回の溶出では不十分な場合があります。2 度の溶出 (例えば 50 $\mu\text{l} \times 2$ ) を強く推奨します。
	試薬器具あるいは操作上の RNase のコンタミネーション	反応に使用するチューブ、チップ等は専用のものとし、反応を行うときはディスポーザブル手袋を着用して、RNase が混入しないように細心の注意を払ってください。
	試薬の劣化	使用する酵素類は、氷上においてください。過度の攪拌や凍結融解は行わないでください。☺ Positive Control Template (FLuc) を用いて 100 $\mu\text{g}$ 以上の RNA が得られない場合は、本製品を再度購入してください。
目的サイズより大きい RNA が見られる	鋳型プラスミドの線状化が不十分	再度、鋳型プラスミドを制限酵素処理し、アガロース電気泳動で完全にプラスミドが線状化していることを確認の上、ご使用ください。
	RNA の変性が不十分	変性アガロースゲルあるいはアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行ってください。
目的サイズより小さい RNA が見られる	T7 RNA Polymerase の転写終結シグナルに似た配列が含まれる	可能であれば、配列を変更してください。コーディング配列を変更する場合は、アミノ酸配列に注意し、コドン変換を行ってください。
目的サイズ以下に断片化した RNA が見られる	RNase のコンタミネーション	反応に使用するチューブ、チップ等は専用のものとし、反応を行うときはディスポーザブル手袋を着用して、RNase が混入しないように細心の注意を払ってください。

## XII. 参考文献

- 1) Karikó, K. *et al.* Incorporation of pseudouridine into mRNA yields superior nonimmunogenic vector with increased translational capacity and biological stability. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther.* (2008) **16**: 1833–1840.
- 2) Vaidyanathan, S. *et al.* Uridine Depletion and Chemical Modification Increase Cas9 mRNA Activity and Reduce Immunogenicity without HPLC Purification. *Mol Ther Nucleic Acids.* (2018) **12**: 530-542.
- 3) Xia, X. Detailed Dissection and Critical Evaluation of the Pfizer/BioNTech and Moderna mRNA Vaccines. *Vaccines (Basel).* (2021) **9**: 734.
- 4) Schenborn, E. T. and Mierendorf, R. C. A novel transcription property of SP6 and T7 RNA polymerases: dependence on template structure. *Nucleic Acids Res.* (1985) **13**: 6223–6236.

## XIII. 関連製品

Cloning Kit for mRNA Template (製品コード 6143)  
Takara IVTpro™ T7 mRNA Synthesis Kit (製品コード 6144)  
PrimeSTAR® Max DNA Polymerase (製品コード R045A/B)  
TaKaRa Ex Premier™ DNA Polymerase (製品コード RR370S/A/B、RR371S/A/B)  
*E. coli* HST08 Premium Competent Cells (製品コード 9128)  
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (製品コード 740609.10/.50/.250)  
NucleoSpin Plasmid (製品コード 740588.10/.50/.250)  
*Hind* III (製品コード 1060A/B)  
NucleoSpin RNA Clean-up (製品コード 740948.10/.50/.250)  
*TransIT*-mRNA Transfection Kit (製品コード MIR2225/MIR2250/MIR2255/MIR2256)  
In-Fusion Snap Assembly Master Mix (製品コード 638943/638944/638947 ~ 638949)

## XIV. 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。
- ・In-FusionはTakara Bio USA, Inc.の、PrimeSTARはタカラバイオ株式会社の登録商標です。IVTpro、Ex Premierはタカラバイオ株式会社の商標です。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**