

製品コード 6143

研究用

Takara

Cloning Kit for mRNA Template

説明書

v202207Da

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)] を用いて mRNA を合成する際の鋳型プラスミドを構築するためのキットです。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することができます (図 1、図 2)。構築した鋳型プラスミドからは、Takara IVTpro™ T7 mRNA Synthesis Kit (製品コード 6144) を用いた *in vitro* transcription により、簡便に目的の mRNA を高収量に調製することが可能です。

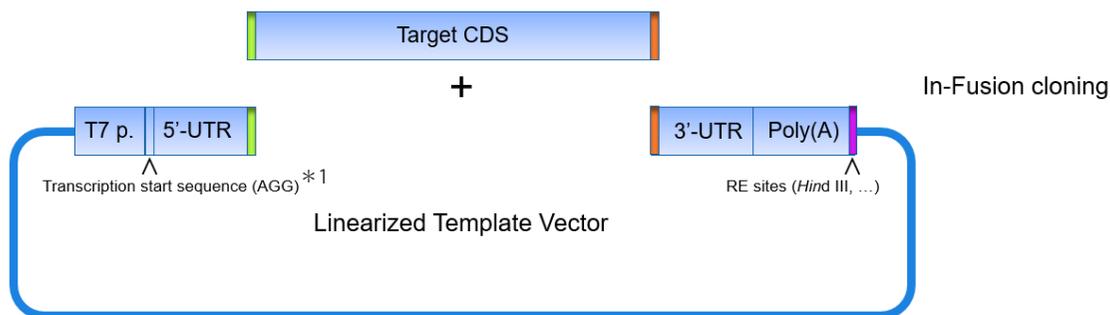


図 1. In-Fusion クローニング*2 による鋳型プラスミド構築

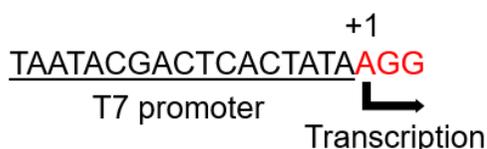


図 2. CleanCap Reagent AG を用いる際の DNA 鋳型の転写開始配列 (AGG)

* 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>

I. 内容 (10 反応系)

 Linearized Template Vector (50 ng/ μ l)	10 μ l
 FLuc Control Fragment (100 ng/ μ l) *1	10 μ l
 5 × In-Fusion Snap Assembly Master Mix *2	20 μ l

* 1 : 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。

* 2 : 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)。

※ 本製品は以下のセット品でも販売しております。
Takara IVTpro mRNA Synthesis System (製品コード 6141)

【内容】

- Cloning Kit for mRNA Template (製品コード 6143)
- Takara IVTpro T7 mRNA Synthesis Kit (製品コード 6144)

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 μ g/ml) プレート

【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

IV. 操作上の注意

調製する鋳型プラスミドに 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、反応を行う際に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. 鋳型プラスミドの構築

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 (「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、「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'

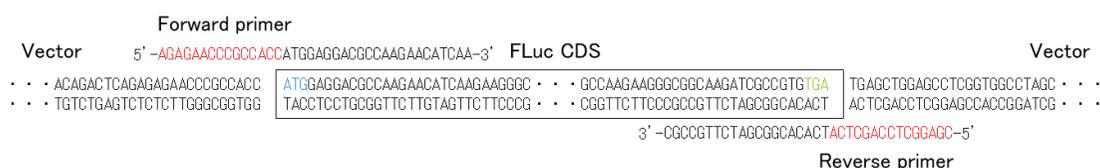


図 3. 目的 CDS 断片の増幅 (例：FLuc)

- 上記プライマーを用いて本製品の  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® 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™ 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 μl) 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/μl 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nc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℃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/ μ l)	1 μ l
In-Fusion 配列を付加した CDS 断片*	100 ng
Nuclease-Free Water	X μ l
 5 \times In-Fusion Snap Assembly Master Mix	2 μ l
Total	10 μ l

* :  FLuc Control Fragment を用いる場合は、1 μ 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ルを示します。形質転換効率が 1×10^8 cfu/ μ 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 μ l のコンピテントセルをチューブに移す。
3. 2.5 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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、大腸菌クロニング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. 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>

VII. 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.* (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.

VIII. 関連製品

Takara IVTpro™ mRNA Synthesis System (製品コード 6141)
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)
In-Fusion® Snap Assembly Master Mix (製品コード 638943/638944/638947～638949)

IX. 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