

製品コード 6144

研究用


Takara

**Takara IVTpro™
T7 mRNA Synthesis Kit**











説明書

v202205Da

Takara IVTpro T7 mRNA Synthesis Kit は、T7 promoter 配列を含む二本鎖 DNA を鋳型として、T7 RNA ポリメラーゼにより 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への翻訳には RNA の 5' 末端に Cap 構造を必要としますが、本製品では CleanCap (TriLink 社) や ARCA (Anti-Reverse Cap Analog) といった Cap アナログを用いて大量の Cap 構造を持つ mRNA が調製できます。

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できます。例えば、本製品の  Positive Control Template (FLuc) 1 μg を鋳型として、CleanCap 構造およびシュードウリジンを含む約 1.9 kb の mRNA を合成する場合には、20 μl の反応系で通常 180 μg 程度の mRNA が得られます。

I. 内容 (20 回分、20 μl 反応系)

 10 × Transcription Buffer	40 μl
 10 × ATP	40 μl
 10 × CTP	40 μl
 10 × GTP	40 μl
 10 × UTP	40 μl
 10 × Enzyme Mix	40 μl
 Nuclease-Free Water	1 ml × 3
 DNase I	80 μl
 Lithium Chloride Precipitation Solution	600 μl
 Positive Control Template (FLuc) (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) *	10 μl

* : 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。

※ 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】

- 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)
 - ARCA (Anti-Reverse Cap Analog)
 - m⁷G-Cap (N7-Methyl-Guanosine-5'-Triphosphate-5'-Guanosine) など
- 修飾 NTP
 - N¹-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. 鋳型 DNA の調製

T7 promoter を含む線状化したプラスミドあるいは PCR 産物が本キットを用いた IVT の鋳型 DNA として使用できます。「線状化鋳型プラスミドの調製」は V-B)、「PCR 鋳型の調製」は V-C) をご参照ください。なお、CleanCap Reagent AG [あるいは CleanCap Reagent AG (3' OMe)] を Cap アナログとして mRNA 合成する場合の鋳型プラスミド構築については、Cloning Kit for mRNA Template (製品コード 6143) が、簡便に目的配列を含む鋳型 DNA を構築可能なキットとして利用できます。当該キットを用いて鋳型を構築した場合は、「V-B) 線状化鋳型プラスミドの調製」へお進みください。

A) 鋳型 DNA の構造

a) 全体の構造

T7 promoter 下に転写物 (Transcript) に必要な配列を準備する。



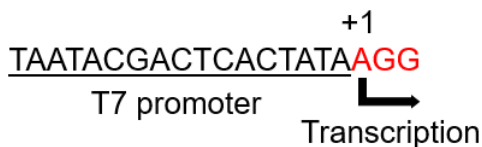
図 1. タンパク質発現を目的とした mRNA 合成に使用される標準的な鋳型 DNA の構造

- Cloning Kit for mRNA Template を使用しない場合は、各々の実験目的に応じた 5' UTR、3' UTR、Poly(A) 配列等をご用意ください (参考文献 1 および 2)。なお、Poly(A) 配列は鋳型に含めず、IVT 反応後に Poly(A) Polymerase を用いて付加することも可能です。

b) T7 promoter と転写開始配列

使用する Cap アナログによって転写開始配列を使い分ける。

1. CleanCap Reagent AG [あるいは CleanCap Reagent AG (3' OMe)] を用いる場合は、AGG の転写開始配列を使用する。



2. ARCA あるいは m⁷G-Cap を用いる場合は、GGG の転写開始配列を使用する。

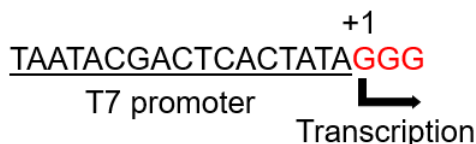


図 2. T7 promoter と転写開始配列

- これら転写開始配列の鋳型 DNA は、Cap 構造を必要としない RNA の大量調製にも使用できます。

c) コドン最適化

mRNA を導入する細胞の生物種に合わせて、目的遺伝子 (CDS: coding sequence) 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 3)、配列自体に含まれる U の使用頻度を下げることも重要とされています (参考文献 4 および 5)。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。

B) 線状化鑄型プラスミドの調製

均一な長さの mRNA を合成するために、鑄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鑄型の末端が 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 6)、5' 突出あるいは平滑末端となる制限酵素を用いて切断することを推奨します。また、IVT により合成される 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。なるべく、余分な配列を残さない制限酵素を選択してください。

a) 制限酵素処理

RNA 合成に用いる鑄型 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
鑄型プラスミド	50 μg
10 × M Buffer	20 μl
Nuclease-Free Water	X μl
<i>Hind</i> III (15 U/ μl)	10 μl
Total	200 μl

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鑄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。

C) PCR 鑄型の調製

PCR 産物を鑄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。

VI. 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 ₂ O) Nuclease-Free Water	X μ l
(TB) 10 × Transcription Buffer*1	2 μ l
(ATP) 10 × ATP*2	2 μ l
(CTP) 10 × CTP*2	2 μ l
(GTP) 10 × GTP*2	2 μ l
(UTP) 10 × UTP*2	2 μ l
CleanCap Reagent AG*3	1.6 μ l
鋳型 DNA*4	1 μ g
(EM) 10 × Enzyme Mix	2 μ l
Total*5	20 μ l

* 1 : (TB) 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 3 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 μ g の範囲でご使用ください（図 4 参照）。(PC) Positive Control Template (FLuc) の場合は、2 μ l (1 μ 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 5 A/B 参照）。

【ARCA あるいは m⁷G-Cap を用いた mRNA 合成反応】

< 1 反応あたり >

試薬	使用量
Ⓜ Nuclease-Free Water	X μl
Ⓟ 10 × Transcription Buffer*1	2 μl
Ⓜ 10 × ATP*2	2 μl
Ⓜ 10 × CTP*2	2 μl
Ⓜ 10 × GTP*2	0.4 μl
Ⓜ 10 × UTP*2	2 μl
ARCA あるいは m ⁷ G-Cap (100 mM)*3	1.6 μl
鋳型 DNA*4	1 μg
Ⓜ 10 × Enzyme Mix	2 μl
Total*5	20 μl

* 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 : ARCA あるいは m⁷G-Cap は、GTP に対して 4 倍のモル比 (最終濃度 8 mM で GTP との和が 10 mM) でまずお試しください。目標とする Cap 付加効率、あるいは目的遺伝子の大きさと収量によって、最適な GTP とのモル比を適宜調整してください (図 6 参照)。

* 4 : GGG 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 μg の範囲でご使用ください。なお、Ⓜ Positive Control Template (FLuc) は、転写開始配列が "AGG" である CleanCap Reagent AG あるいは CleanCap Reagent AG (3' OMe) 用であるため、使用できません。

* 5 : 必要量に応じてスケールアップ可能です。

【Cap アナログを使用しない RNA 合成反応】

< 1 反応あたり >

試薬	使用量
Ⓜ Nuclease-Free Water	X μ l
ⓉB 10 × Transcription Buffer*1	2 μ l
ⓂATP 10 × ATP*2	2 μ l
ⓂCTP 10 × CTP*2	2 μ l
ⓂGTP 10 × GTP*2	2 μ l
ⓂUTP 10 × UTP*2	2 μ l
鋳型 DNA*3	1 μ g
ⓂEM 10 × Enzyme Mix	2 μ l
Total*4	20 μ l

* 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 : GGG あるいは AGG の転写開始配列を有する鋳型をご使用ください。最適な鋳型量は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 μ g の範囲でご使用ください。

* 4 : 必要量に応じてスケールアップ可能です。

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「VII. DNase I 処理」へお進みください。

VII. DNase I 処理

VI-3. の反応後、4 μ l の ⊖ 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。

VIII. LiCl 沈殿精製

LiCl 沈殿法は、取り込まれなかった NTP やタンパク質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 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 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)。

1. VII. で DNase I 処理した IVT 反応液約 24 μl に、30 μl の RNase-Free Water と 30 μl の $\text{Lithium Chloride Precipitation Solution}$ 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。
2. 良く混合した後、 -20°C で 30 分以上保冷する。
3. 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。
4. 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。
5. 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。
6. 再度、丁寧に上澄みを除去する。
7. ペレットを風乾し、100 μl の RNase-Free Water で溶解する。
 - 過度な風乾は、 RNase-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。
8. 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。

IX. 実験例

【実験例 1-A】

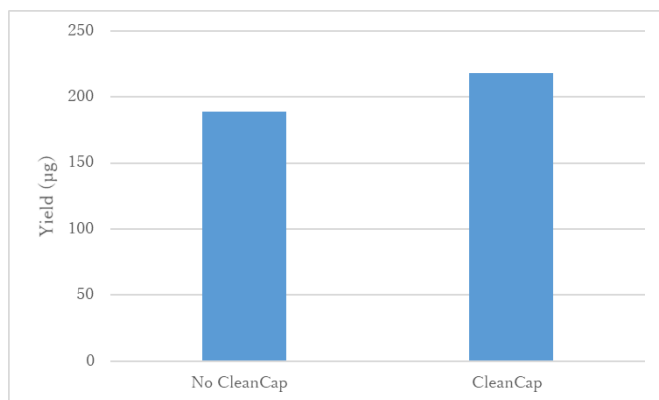


図 3 A. CleanCap Reagent AG (3' OMe) 使用時の RNA 収量

<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】

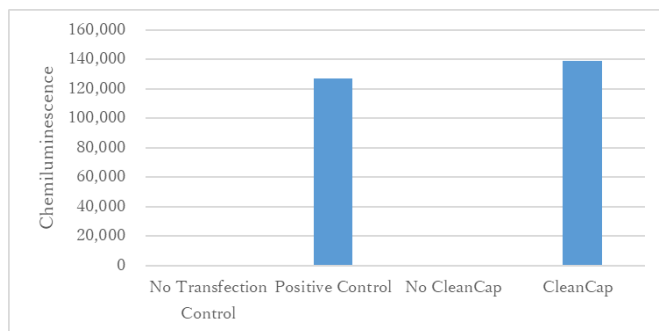


図 3 B. CleanCap Reagent AG (3' OMe) を用いて合成された FLuc mRNA の HEK293T 細胞での発現

<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】

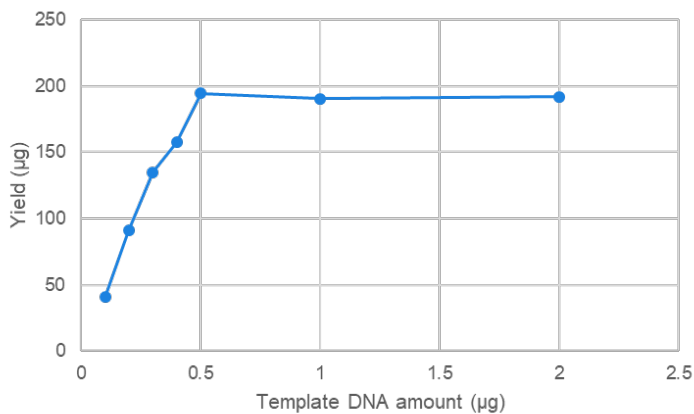


図 4. 鋳型 DNA 量と RNA 収量の関係

<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 N¹-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】

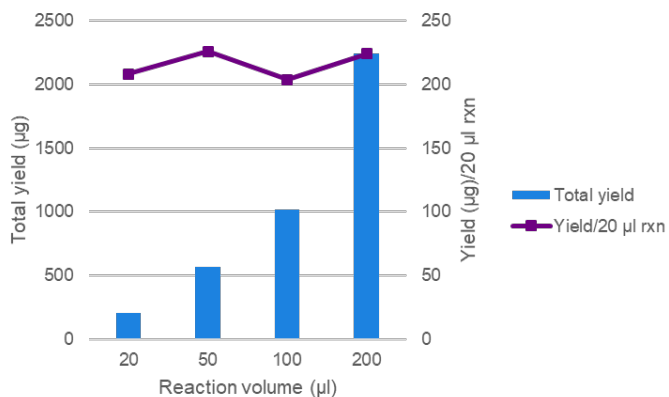


図 5 A. IVT 反応液スケールと RNA 収量の関係

<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】

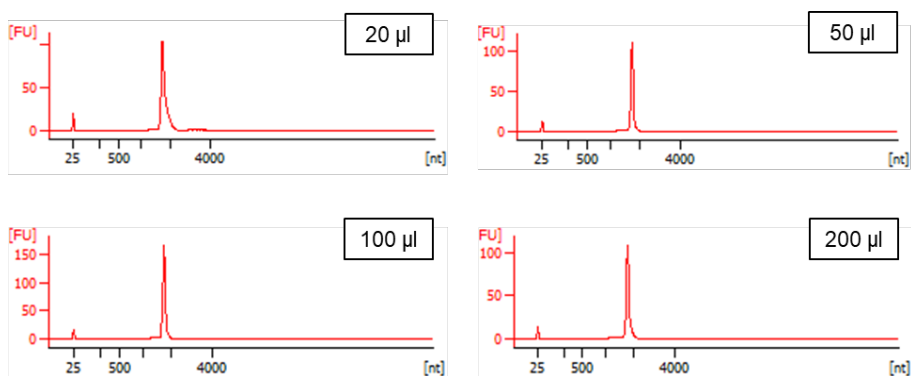


図 5 B. RNA 産物の Bioanalyzer による解析

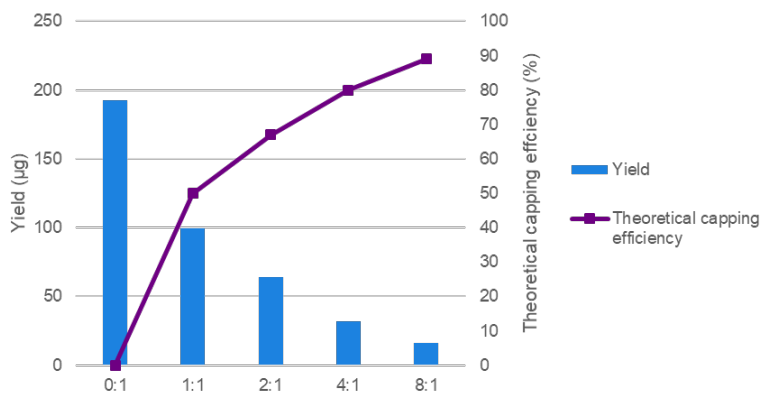
<方法>

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】



No.	Sample	RNA yield (µg/20 µl rxn)	Theoretical capping efficiency
1	ARCA:GTP=0:1	192.4	0%
2	ARCA:GTP=1:1	99.3	50%
3	ARCA:GTP=2:1	64.1	67%
4	ARCA:GTP=4:1	31.8	80%
5	ARCA:GTP=8:1	16.2	89%

図 6. ARCA 使用時の RNA 収量と理論的 Cap 付加効率

<方法>

ARCA と GTP のモル濃度の和は変えずに (10 mM)、モル濃度比のみを変えて IVT 反応を行い、約 2 kb の transcript を合成した。

<結果>

RNA 収量は ARCA の濃度が高くなるにつれ大きく減少しました。ARCA と GTP の 1 塩基めの取り込み効率に違いはないとされていることから、ARCA の濃度を上げて Cap 付加効率の高い mRNA を準備する場合は、収量が大きく抑制されると考えられます。

【実験例 5-A】

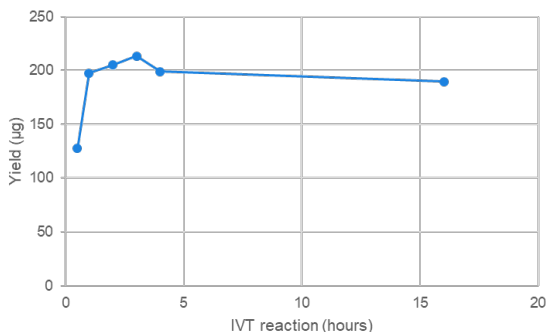


図 7 A. IVT 反応時間と RNA 収量の関係

<方法>

Positive Control Template (FLuc) を鋳型として、CleanCap Reagent AG (3' OMe) および N¹-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 5-B】

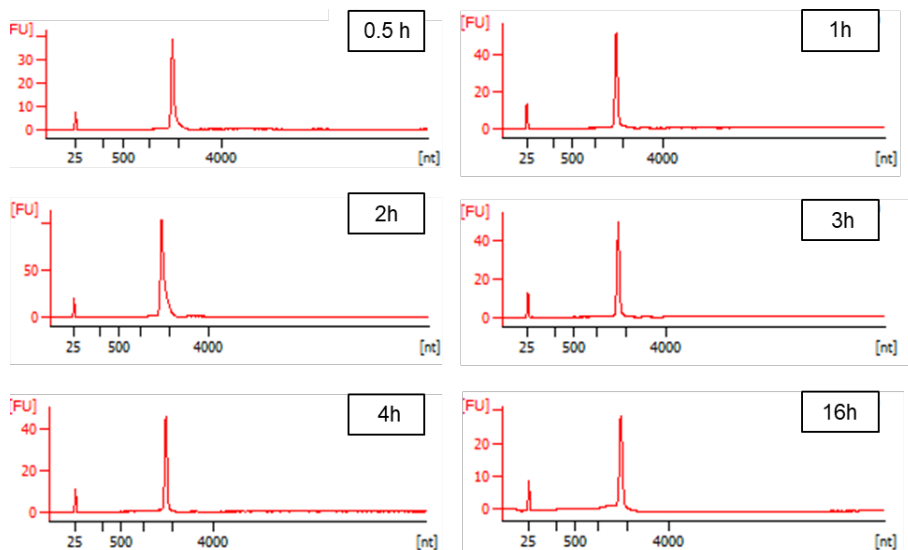


図 7 B. RNA 産物の Bioanalyzer による解析

<方法>

実験例 5-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 6-A】

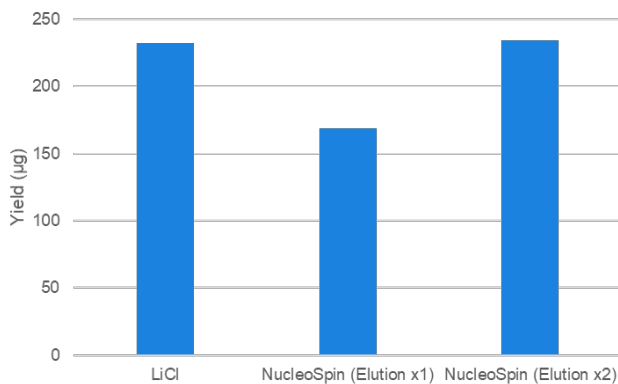


図 8 A. LiCl 沈殿法とスピнкаラム法による RNA 簡易精製

<方法>

CleanCap Reagent AG (3' OMe) および N¹-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 6-B】

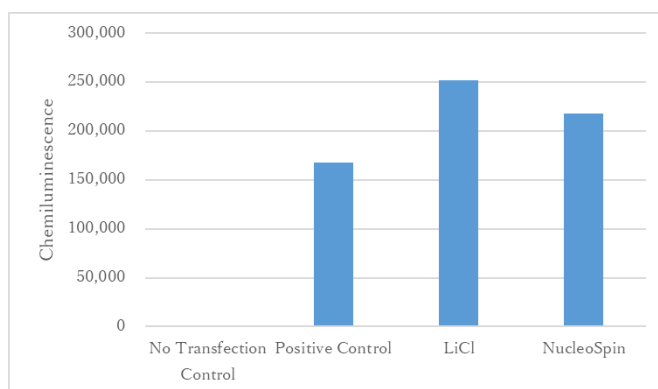


図 8 B. 簡易精製法により得られた FLuc mRNA の HEK293T 細胞での発現

<方法>

実験例 6-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。

X. トラブルシューティング

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、スピンカ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、スピンカ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。
目的サイズより大きい RNA が見られる	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 μg 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。
	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。
目的サイズより小さい RNA が見られる	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。
目的サイズ以下に断片化した 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。

XI. 参考文献

- 1) Mignone, F. *et al.* Untranslated regions of mRNAs. *Genome Biol.* (2002) **3**: reviews0004.1–0004.10.
- 2) Orlandini von Niessen, A. G. *et al.* Improving mRNA-based therapeutic gene delivery by expression-augmenting 3' UTRs identified by cellular library screening. *Mol Ther.* (2019) **27**: 824–836.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) Xia, X. Detailed Dissection and Critical Evaluation of the Pfizer/BioNTech and Moderna mRNA Vaccines. *Vaccines (Basel).* (2021) **9**: 734.
- 6) 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.

XII. 関連製品

Takara IVTpro™ mRNA Synthesis System (製品コード 6141)
Cloning Kit for mRNA Template (製品コード 6143)
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)

XIII. 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。
- ・IVTpro 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