

Template Vector (*BspQ I*) for T7 mRNA Synthesis

Code No. 6146

Size:

10 μ l

Description:

Template Vector (*BspQ I*) for T7 mRNA Synthesis is used for the construction of template plasmid for *in vitro* transcription (IVT) using cap analogs [CleanCap Reagent AG or CleanCap Reagent AG (3' OMe)] from TriLink BioTechnologies. The pre-linearized vector contains a T7 promoter, transcription start sequence (AGG), 5'-UTR (untranslated region), 3'-UTR, and a 141-base Poly(A) sequence, simply allowing the construction of a IVT template plasmid just by cloning a desired gene (coding sequence; CDS) with In-Fusion® (Figure. 1, 2). Followed by a digestion with Type IIS restriction enzyme, *BspQ I*, the resulting linearized template plasmid makes it possible to provide a scarless mRNA after the Poly(A) sequence, to be used for human, murine, or other mammalian cells. The linearized template plasmid can then be used to produce the desired mRNA by performing high-yield *in vitro* transcription using Takara IVTpro™ T7 mRNA Synthesis Kit (Cat. #6144).

<In-Fusion cloning>

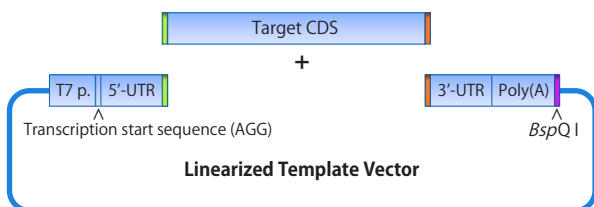


Fig. 1. IVT template plasmid construction by In-Fusion cloning

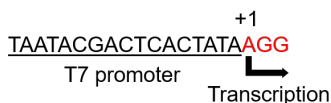


Fig. 2. Transcription start sequence (AGG) of IVT template when CleanCap Reagent AG is used

Components:

Linearized Template Vector (<i>BspQ I</i>) (50 ng/ μ l)	10 μ l
FLuc Control Fragment (<i>BspQ I</i>) (100 ng/ μ l)	10 μ l

Storage: -20°C

DNA Length:

2,962 bp [Linearized Template Vector (*BspQ I*)]
1,683 bp [FLuc Control Fragment (*BspQ I*)]

* For more information on the sequences, please see our website.

Quality Control Data:

Please see the Certificate of Analysis (CoA) for each lot. You can download the CoA on Takara Bio website.

Usage:

Preparation of linearized template plasmid for mRNA with scarless sequence after Poly(A)

Precautions for Use:

1. A cloning reagent for In-Fusion cloning is required for the IVT template plasmid construction. Please purchase In-Fusion Snap Assembly Master Mix separately (Cat. #638943/638944/638947 - 638949).
2. Please refer to the user manual of Cloning Kit for mRNA Template (Cat. #6143) for more detailed information on the design of template plasmid and procedures. Confirm that the *BspQ I* restriction site used for linearizing the IVT template plasmid is not present in the CDS of the desired gene. If the restriction site *BspQ I* is present in the CDS, change the DNA sequence by changing the codon in the recognition sequence while keeping the amino acid sequence the same (e.g., switch from alanine codon "GCU" to "GCC").
3. RNase contamination of the double-stranded DNA template, reagents, tubes, micropipette tips, or other materials used in the reaction can significantly decrease or digest RNA obtained with the kit. Use dedicated tubes and micropipette tips in the reaction and wear new disposable gloves to prevent RNase contamination.

References:

- 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.

Related Products:

In-Fusion® Snap Assembly Master Mix

(Cat. #638943/638944/638947 - 638949)

BspQ I (Cat. #1227A/B)

PrimeSTAR® Max DNA Polymerase (Cat. #R045A/B)

TaKaRa Ex Premier™ DNA Polymerase (Cat. #RR370S/A/B)

TaKaRa Ex Premier™ DNA Polymerase Dye plus (Cat. #RR371S/A/B)

NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Cat. #740609.10/50/.250)*

NucleoSpin Plasmid (Cat. #740588.10/50/.250)*

Takara IVTpro™ mRNA Synthesis System (Cat. #6141)

Cloning Kit for mRNA Template (Cat. #6143)

Takara IVTpro™ T7 mRNA Synthesis Kit (Cat. #6144)

RNase-free Water (Cat. #9012)

T7 RNA Polymerase ver.2.0 (Cat. #2541A)

T7 RNA Polymerase, HQ (Cat. #2542A)

Pyrophosphatase (inorganic) (Cat. #2450A/B)

*: Not available in all geographic locations. Check for availability in your area.

PrimeSTAR is a registered trademark of Takara Bio Inc.

In-Fusion is a registered trademark of Takara Bio USA, Inc.

IVTpro and Ex Premier are trademarks of Takara Bio Inc.

Note

This product is for research use only. It is not intended for use in therapeutic or diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc. Takara products may not be resold or transferred, modified for resale or transfer, or used to manufacture commercial products without written approval from Takara Bio Inc.

If you require licenses for other use, please contact us by phone at +81 77 565 6972 or from our website at www.takarabio.com.

Your use of this product is also subject to compliance with any applicable licensing requirements described on the product web page. It is your responsibility to review, understand and adhere to any restrictions imposed by such statements.

All trademarks are the property of their respective owners. Certain trademarks may not be registered in all jurisdictions.

Template Vector (*BspQ* I) for T7 mRNA Synthesis

Code No. 6146

容量： 10 μ l

● 製品説明

Template Vector (*BspQ* I) for T7 mRNA Synthesis 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ベクターです。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 (141 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、2)。構築したプラスミドは、Poly(A) 配列直後に導入した Type IIS 制限酵素・*BspQ* I サイトで線状化することにより、Poly(A) 配列後に余分な配列を持たない mRNA の合成鋳型となります。線状化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 (IVT) により、簡便に目的 mRNA を高収量に調製することが可能です。

<In-Fusion クローニング>



図 1. In-Fusion クローニングによる IVT 鋳型プラスミド構築

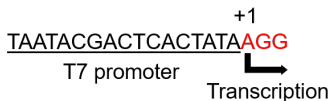


図 2. CleanCap Reagent AG を用いる際の DNA 鋳型の転写開始配列 (AGG)

● 内容

Linearized Template Vector (*BspQ* I) (50 ng/ μ l) 10 μ l
FLuc Control Fragment (*BspQ* I) (100 ng/ μ l) 10 μ l

● 保存

− 20°C

● DNA 鎖長

2,962 bp [Linearized Template Vector (*BspQ* I)]
1,683 bp [FLuc Control Fragment (*BspQ* I)]

※ 配列は弊社ウェブサイトをご参照ください。

● 品質管理データ

性能試験結果については、各ロットの Certificate of Analysis (CoA) をご覧ください。CoA はタカラバイオウェブサイトからダウンロードできます。

● 用途

Poly(A) 配列後に余分な配列を持たない mRNA 鋳型プラスミドの調製

● 使用上の注意

1. 鋳型プラスミドの構築には、In-Fusion クローニング試薬が必要です。In-Fusion Snap Assembly Master Mix (製品コード 638943/638944/638947~638949) をご購入ください。
2. 鋳型プラスミドの設計やプロトコルの詳細は、Cloning Kit for mRNA Template (製品コード 6143) の取扱説明書をご参照ください。その際に、*BspQ* I サイト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してください。*BspQ* I 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：アラニンコドンの “GCU” から “GCC” など) を利用して DNA 配列を変更してください。
3. 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ボア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。

● 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.

● 関連製品

In-Fusion® Snap Assembly Master Mix (製品コード 638943/638944/638947~638949)
BspQ I (製品コード 1227A/B)
PrimeSTAR® Max DNA Polymerase (製品コード R045A/B)
TaKaRa Ex Premier™ DNA Polymerase (製品コード RR3705/A/B)
TaKaRa Ex Premier™ DNA Polymerase Dye plus (製品コード RR3715/A/B)
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)
Takara IVTpro™ mRNA Synthesis System (製品コード 6141)
Cloning Kit for mRNA Template (製品コード 6143)
Takara IVTpro™ T7 mRNA Synthesis Kit (製品コード 6144)
RNase-free Water (製品コード 9012)
T7 RNA Polymerase ver.2.0 (製品コード 2541A)
T7 RNA Polymerase, HQ (製品コード 2542A)
Pyrophosphatase (inorganic) (製品コード 2450A/B)

● 注意

本製品は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。ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。本データシー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。

v202307Da

タカラバイオ株式会社

ウェブサイト <https://www.takara-bio.co.jp>

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