

ScriptMAX[®]
Thermo T7 Transcription Kit

取扱説明書

Code No. : TSK-101

TOYOBO CO., LTD. Life Science Department

OSAKA JAPAN

A3292K

－ 目 次 －

[1] はじめに	1
[2] キットに含まれるもの	2
[3] キットのほかに必要なもの	2
[4] 鋳型 DNA の調製	3
[5] RNA 合成プロトコール	3
[6] 精製プロトコール	5
[7] 精製 RNA の分析	7
[8] トラブルシューティング	8
[9] 関連商品	9

ご注意

本キットに含まれる試薬は、すべて研究用試薬です。商業の目的や、診断・臨床用試薬として決して使用しないでください。本キットの使用にあたっては、実験室での一般の注意事項を厳守し、安全に留意してください。

[1] はじめに

ScriptMAX[®] Thermo T7 Transcription Kitは、Thermo T7 RNAポリメラーゼをベースに開発された、高いRNA合成能力を持つ転写キットです。RNAの合成反応に必要な、RNAポリメラーゼと反応バッファー、Accelerator solution、リボヌクレオチド混合液、RNase阻害剤から成り、様々な用途にご使用いただけます。

■キットの特長■

1:用途に応じたRNAの合成が可能

直鎖状・環状DNA鑄型に最適化したプロトコールを設定しています。Accelerator solutionを添加することにより従来法に比べ、2~4倍の高濃度なRNAの調製も可能です。

2:反応に必要なパーツを含有

酵素液のほか、バッファー、rNTPs、RNase inhibitor、Nuclease-free waterなど反応に必要な試薬が添付されており、使いやすくなっています。

[2] キットに含まれるもの

本キット(20 µl 反応 x 60 回用)には、以下の試薬¹⁾が含まれています。

試薬名	容量	チューブ数
Thermo T7 RNA polymerase (50U/µl)	60 µl	1
10x Basal reaction buffer ²⁾³⁾	400 µl	1
5x Accelerator solution	400 µl	1
25 mM rNTPs mixture	280 µl	1
RNase inhibitor (40U/µl)	30 µl	1
Nuclease-free water (not DEPC-treated)	1 ml	1

- 1) すべての試薬は-20°Cで保存してください。
- 2) 白い沈殿が生じることがありますが品質には問題ありません。37°Cで5分程度インキュベートし、強く攪拌して完全に溶解させてからご使用ください。
- 3) 本キットに添付されている10x Basal reaction bufferは、弊社Thermo T7 RNA polymerase(TRL-201)に添付されているものとは組成が異なります。

[3] キットのほかに必要なもの

キットのご使用にあたって、以下の試薬・サンプルが必要です。

- ・**鋳型 DNA(環状または直鎖状)**: 鋳型 DNA は、転写する領域の直前に T7 プロモータ部位を持つものをご用意ください。また、鋳型 DNA は RNase-free グレードのものをご用意ください。
- ・**Nuclease-free water**: キットに添付されていますが、サンプルの希釈に大量に使用する際には別途をご用意ください(ほとんどの場合、通常の滅菌水を使用することができます)。
- ・**RI ラベルヌクレオチド**: [α -³²P]UTP などを用いて RNA 合成量の定量を行う場合は、別途をご用意ください。またその際は、本キットに添付されているヌクレオチドはあらかじめ混合されておりますので、未混合の rATP、rCTP、rGTP、rUTP([9]関連商品の項を参照)を別途をご用意ください。
- ・**RNase-free DNase I**: 転写反応液中に含まれる鋳型 DNA は、反応により生成された RNA に比べて濃度が非常に低いため、多くの検討に用いる RNA サンプルの鋳型 DNA 除去は必須ではありませんが、必要に応じてご注意ください。

[4] 鋳型 DNA の調製

鋳型 DNA は RNase-free グレードのものをご用意ください。特にプラスミド鋳型を用いる際は、菌体からのプラスミド抽出時に用いた RNase が高濃度で混入している場合がありますので、フェノール・クロロホルム処理等により RNase を除去してください。

[5] RNA 合成プロトコール

(1) プロトコール A

以下のような用途の際に用いてください。

- ・mRNA、tRNA、rRNA、リボザイム、アンチセンス RNA 等の大量合成
- ・RNAi 用の二本鎖 RNA 合成

1. 以下の組成で反応液を調製し、静かに混合します¹⁾。

10x Basal reaction buffer	2 μ l
5x Accelerator solution	4 μ l
25mM rNTPs mixture	4.5 μ l
RNase inhibitor	0.5 μ l
Template DNA	100 ng - 1 μ g
Thermo T7 RNA polymerase	1 μ l
Nuclease-free water	up to 20 μ l
total	20 μ l

2. 37-42°C で 2 時間インキュベートします²⁾。

- 1) 反応液の調製は、室温にて行ってください。氷上で行うと、バッファー中に含まれるスペルミジンと DNA とが不溶性沈殿を形成し、反応効率が低下する場合があります。
- 2) 本キットに添付の RNA ポリメラーゼは、耐熱型酵素“Thermo T7 RNA Polymerase <<TT7>>”を用いています。野生型酵素に比べて高温域での安定性が向上しており、幅広い温度領域での反応が可能です(次頁掲載の図を参照)。

(2) プロトコール B

以下のような用途の際に用いてください。

- ・環状 DNA からのコムギ胚芽無細胞タンパク質合成用 mRNA 合成
- ・リボプローブなど、特異性の高い RNA の少量合成

1. 以下の組成で反応液を調製し、静かに混合します¹⁾。

10x Basal reaction buffer	2 μ l
25mM rNTPs mixture	2 μ l
RNase inhibitor	0.5 μ l
Template DNA	1-2 μ g
Thermo T7 RNA polymerase	1 μ l
Nuclease-free water	up to 20 μ l
total	20 μ l

2. 37-42°C で 2-4 時間インキュベートします²⁾。

- 1) 反応液の調製は、室温にて行ってください。氷上で行うと、バッファー中に含まれるスペルミジンと DNA とが不溶性沈殿を形成し、反応効率が低下する場合があります。
- 2) 本キットに添付の RNA ポリメラーゼは、耐熱型酵素 “Thermo T7 RNA Polymerase <<TT7>>” を用いています。野生型酵素に比べて高温域での安定性が向上しており、幅広い温度領域での反応が可能です。

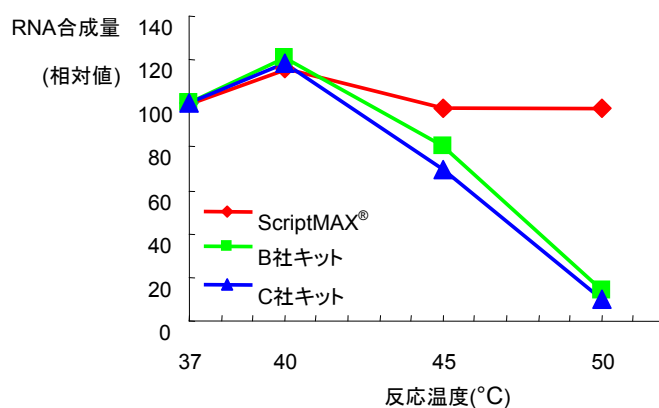


図: 反応温度による RNA 合成量の比較

プロトコール A に従い、2 時間反応を行いました。ScriptMAX®は、野生型酵素を用いた他社製キットに比べて、高温域での収量が安定しています。

[6] 精製プロトコール

合成した RNA は、用途に応じてそれぞれに適した方法で精製を行ってください。ここでは、*in vitro* translation に用いる mRNA の標準的な精製法を紹介します。この方法は、他の用途で使用する RNA の精製にも応用できます。

(1) ゲル濾過法を用いる場合

1. G-25 スピнкаラム(GE Healthcare 社製 MicroSpin™ G-25 Columns 等)のゲル担体をボルテックスなどにより均一に懸濁し¹⁾、1.5ml マイクロチューブにセット後、3,000rpm で 1 分間遠心し、保存液を除去します。
 2. スピнкаラムに 200 μ l のバッファー(20mM HEPES-KOH(pH7.6)など)を添加し、3,000rpm で 2 分間遠心した後、溶出液を除去します。
 3. 2.をもう一度繰り返します。
 4. 転写済みの反応液を 12,000rpm で 2 分間遠心分離します。
 5. 4.の上清をスピнкаラムにアプライします(リザーバを新しいチューブに交換します)。
 6. 3,000rpm で 2 分間遠心し、RNA を溶出します。
- 1) RNA 合成の反応液量が 50 μ l に満たない場合、G-25 ゲル担体を懸濁した後、適量を抜き取るか、もしくは反応液に水を添加して液量を 50 μ l にフィルアップしてください。少ない液量のまま精製を行うと、収量が低下する場合があります。

(2) エタノール沈殿法を用いる場合

1. 転写済みの反応液に、必要に応じて滅菌水(または Nuclease-free water)を添加して液量を 100 μ l にします。
2. TE 飽和フェノール(pH 8.0)を 100 μ l 添加し、5 分間室温で混和します。
3. 12,000rpm で 5 分間(4°C)遠心します。
4. 中間の変性タンパク質の層を吸わないように注意しながら上清を新しいマイクロチューブに移します。
5. クロロホルムを 100 μ l 添加し、混和します。
6. 12,000rpm で 5 分間(4°C)遠心します。
7. 上清を新しいマイクロチューブに移します。
8. 滅菌水 250 μ l と 7.5M 酢酸アンモニウム 55 μ l を添加します。
9. エタノールを 875 μ l 添加し、よく混和します。
10. 2-3 分間室温に静置します。
11. 12,000rpm で 15 分間(4°C)遠心分離します。
12. 上清を廃棄します。
13. 70-80%エタノール(室温)を 1 ml 添加し、静かに 2-3 回転倒混和します。
14. 12,000rpm で 5 分間(4°C)遠心します。
15. 上清を廃棄します。
16. スピンドアウンし、完全にピペットでエタノールを除去します。
17. 適量のバッファー(20mM HEPES-KOH(pH7.6)など)を添加し、ピペッティングにより沈殿を溶解します。

[7] 精製 RNA の分析

精製を行った RNA は、次のステップに進む前に必要に応じて分析・定量を行ってください。

(1) アガロースゲル電気泳動による分析

合成された RNA の正確な鎖長や合成量を確認したい場合は、RNA を変性させた条件で電気泳動を行ってください。以下に RNA の簡易変性法を示します。

1. RNA 変性バッファーを調製します。組成は以下の通りです(調製したバッファーは冷蔵保存してください)。
 - 64 % ホルムアミド
 - 26 mM MOPS, pH 7.0
 - 6.45 mM 酢酸ナトリウム
 - 0.6 mM EDTA, pH 8.0
2. RNA 反応液 2 μ l、RNA 変性バッファー 20 μ l、電気泳動用 Dye 5 μ l を混合し、65°C で 15 分間熱処理し、氷上で急速冷却します。
3. 1% TAE アガロースゲル¹⁾で電気泳動を行います。

1) 強い変性条件下で電気泳動を行う際は、MOPS ゲルを使用してください。

(2) 吸光度測定による濃度分析

吸光度計等を用いて、合成された RNA 量を測定してください。精製 RNA 溶液には、鋳型 DNA が残留していますが、RNA 量は鋳型 DNA などに比べて多いため、吸光度は精製した RNA 濃度を反映しているとして算出します。RNA 濃度(μ g/ml)は 260nm の吸光度に希釈率(通常:50~100 倍)および係数 40 を掛けることにより算出します。

$$\text{RNA 濃度}(\mu\text{g/ml}) = (A_{260} - \text{ブランク値}) \times \text{希釈倍率} \times 40$$

測定時のブランクには、必ず、精製 RNA の希釈に使用したバッファーを同倍率で希釈したものをご使用ください。

[8] トラブルシューティング

RNA が合成できない、あるいは収量が低い場合にご参考ください。

原因	対策
RNase が混入している。	<ul style="list-style-type: none">• 合成された RNA が分解されている可能性があります。鋳型 DNA サンプルをフェノール・クロロホルム処理し、RNase を除去してください。
鋳型にプロモータが含まれない。もしくはプロモータの種類が異なる。	<ul style="list-style-type: none">• キットに含まれる RNA ポリメラーゼのプロモータ配列認識は厳密で他の配列をほとんど認識しません。正しいプロモータ配列を含む鋳型 DNA をご用意ください。
鋳型 DNA に塩などの夾雑物が混入している	<ul style="list-style-type: none">• フェノール抽出、およびエタノール沈澱を 2 回以上繰り返して精製してください。
遺伝子の構造に起因している	<ul style="list-style-type: none">• 塩化セシウム密度勾配遠心を用いて鋳型 DNA を精製することにより緩和できることがあります。
プラスミド調製用大腸菌の培養に問題がある	<ul style="list-style-type: none">• プラスミド調製する際に増菌に使用する培地によっては、分離されたプラスミドが RNA の合成に適さない場合があります。LB 培地を使用して培養することをお奨めします。

[9] 関連商品

品名および内容	包装	保存温度	Code No.
Thermo T7 RNA Polymerase 《TT7》	7,500Ux1 本 (7,500Ux1 本) × 5	-20°C	TRL-201 TRL-201X5
rATP (100mM)	0.5mlx1 本	-20°C	ATP-111
RNase Inhibitor, recombinant	2,500Ux1 本 (2,500Ux1 本) × 5	-20°C	SIN-201 SIN-201X5



【製造・販売元】

－納期・注文に関するお問い合わせ－

東洋紡株式会社 ライフサイエンス事業部 (大阪)
〒530-8230 大阪市北区堂島浜二丁目 2 番 8 号
TEL 06-6348-3786 FAX 06-6348-3833
E-mail : order_lifescience@toyobo.jp

東洋紡株式会社 ライフサイエンス事業部 (東京)
〒104-8345 東京都中央区京橋一丁目 17 番 10 号 住友商事京橋ビル
TEL 03-6887-8819 FAX 03-6887-8951
E-mail : order_lifescience@toyobo.jp

－製品の内容・技術に関するお問い合わせ－

テクニカルライン
TEL 06-6348-3888 FAX 06-6348-3833
開設時間 9:00～12:00 , 13:00～17:00 (土、日、祝を除く)
E-mail : tech_osaka@toyobo.jp
[URL] <http://www.toyobo.co.jp/bio>