

Transcription Kit  
GENETECH Co

# ***CUGA*<sup>®</sup> *in vitro* Transcription Kit**

ユーザーズマニュアル

Ver. 3.0

- *CUGA*<sup>®</sup>3 *in vitro* Transcription Kit
- *CUGA*<sup>®</sup>7 *in vitro* Transcription Kit

 株式会社 ニッポンジーンテック

# CUGA<sup>®</sup>3 / CUGA<sup>®</sup>7 *in vitro* Transcription Kit

## ユーザーズマニュアル Ver. 3.0

### 【はじめにお読みください】

この度は、CUGA<sup>®</sup>3 / CUGA<sup>®</sup>7 *in vitro* Transcription Kit をお買い上げいただき、誠にありがとうございます。本キットを使用する前に、以下の事項をご確認ください。

### ご使用上の注意

1. 本キットは、試験研究用です。

医療行為および臨床診断薬としては使用できません。

2. 本キットのご使用は、本ユーザーズマニュアルの記載内容に必ずしたがってください。

記載内容と異なった取り扱いにより発生するトラブルにつきましては責任を負いかねます。

3. 本キットに含まれている化合物および本キットに含まれていない試薬、化合物を併用しての使用は、化合物の危険性に関して十分な知識が必要です。十分な知識がない場合はご使用になれません。

実験中は、白衣、保護メガネ、手袋等で身体を保護し、皮膚に試薬が直接触れないよう注意してください。

4. 本キットは -20℃ に保存してください。

過冷却は避けてください。

5. 購入後、6 ヶ月以内にご使用ください。

6. リボヌクレアーゼおよびその他のヌクレアーゼの混入にご注意ください。

使用する器具、実験台、および試薬類は汚染のないように注意し、実験を行う際は手袋、マスク等を着用してください。

7. 本製品の安全な取り扱いおよび使用方法については、株式会社 ニッポンジーンテクホームページに Material Safety Data Sheet を公開しておりますので、ご参照ください。

URL: <http://www.nippongenetech.com/MSDS.htm>

8. 本ユーザーズマニュアルの記載内容は 2004 年 8 月現在のものです。記載内容や製品仕様、価格に関しては予告なしに変更する場合があります。最新のユーザーズマニュアルは株式会社 ニッポン ジーンテクホームページからダウンロードしてください。なお、本キットに関するお問い合わせは株式会社 ニッポンジーン ( P. 16 ) にて受け付けております。

URL: <http://www.nippongenetech.com/cuga/file.htm>

# 目次

	ページ
1. キットに含まれる試薬	4
2. キット以外に必要な機器、試薬	5
3. 内容説明	6
【 CUGA <sup>®</sup> 3 / CUGA <sup>®</sup> 7 <i>in vitro</i> Transcription Kit の概要 】	
【 CUGA <sup>®</sup> ポリメラーゼ 】	
4. CUGA <sup>®</sup> 3 / CUGA <sup>®</sup> 7 <i>in vitro</i> Transcription Kit プロトコール	
<i>in vitro</i> 転写反応の準備	7
【 鋳型 DNA の準備 】	8
Control DNA について	
鋳型 DNA の調製方法について	
Control DNA について	
直鎖化したプラスミド DNA を使用する場合	
PCR 産物を使用する場合	
化学合成オリゴヌクレオチド DNA を使用する場合	
<i>in vitro</i> 転写反応	11
一般的な <i>in vitro</i> 転写反応	
1. 反応液の調製	
2. <i>in vitro</i> 転写反応	
3. 鋳型 DNA の除去	
4. <i>in vitro</i> 転写反応産物の精製および電気泳動による検出	
短鎖 RNA	
酢酸アンモニウム、エタノールによる精製	
変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動による検出	
長鎖 RNA	
酢酸アンモニウム、イソプロパノールによる精製	
変性アガロースゲル電気泳動による検出	
5. トラブルシューティング	15
6. 参考文献	16

## 1. キットに含まれる試薬

### 【キット内容 (5 反应用キット / 20 反应用キット)】

	5 反应用	20 反应用
ユーザーズマニュアル	1 部	1 部
CUGA <sup>®</sup> 3 / CUGA <sup>®</sup> 7 Enzyme Solution 1	5 $\mu$ L	20 $\mu$ L
5 $\times$ Transcription Buffer	20 $\mu$ L	80 $\mu$ L
0.1 M DTT	10 $\mu$ L	40 $\mu$ L
100 mM CTP	7.5 $\mu$ L	30 $\mu$ L
100 mM UTP	7.5 $\mu$ L	30 $\mu$ L
100 mM GTP	7.5 $\mu$ L	30 $\mu$ L
100 mM ATP	7.5 $\mu$ L	30 $\mu$ L
Control DNA 2	4 $\mu$ L	6 $\mu$ L
DNase Enzyme Solution	10 $\mu$ L	40 $\mu$ L
10 M Ammonium Acetate	250 $\mu$ L	1 mL
Enzyme Dilution Buffer	50 $\mu$ L	200 $\mu$ L

1 CUGA<sup>®</sup>3 *in vitro* Transcription Kit の場合: CUGA<sup>®</sup>3 Enzyme Solution  
CUGA<sup>®</sup>7 *in vitro* Transcription Kit の場合: CUGA<sup>®</sup>7 Enzyme Solution

2 CUGA<sup>®</sup>3 *in vitro* Transcription Kit の場合: pTS1 / *Nsi*I  
CUGA<sup>®</sup>7 *in vitro* Transcription Kit の場合: pTS1 / *Sac*I  
それぞれ、濃度はあらかじめ 25 ng /  $\mu$ L に調整されています。

### ( ご注意 )

- \* 本キット内の試薬は、全て  $-20^{\circ}\text{C}$  で保存し、過冷却は避けてください。
- \* 本キットの保証期間は、受取日から 6 ヶ月です。
- \* 本キットに含まれている酵素の取り扱いの際には、ピペティング操作で泡立ったり、長時間室温あるいは  $4^{\circ}\text{C}$  で放置しないようご注意ください。酵素活性が低下する可能性があります。
- \* 本キットでは RNase 阻害剤の使用を推奨しておりません。

### 【品質管理】

キット添付の Control DNA 2  $\mu$ L を検定用鋳型 DNA として用いた品質管理試験において、20  $\mu$ L ( 1 反応分 ) の容量で *in vitro* 転写反応を行い、 $37^{\circ}\text{C}$ 、2 時間で 1,000 ng 以上の *in vitro* 転写反応産物を調製できることを確認しています。

## 2. キット以外に必要な機器、試薬

---

を付したものに関しては、必ずご用意ください。

### 滅菌蒸留水 (RNase-free)

蒸留した脱イオン水をオートクレーブで 121、40 分間処理したものをご使用ください。

### マイクロピペットおよびピペットチップ

### インキュベーター

37 で一定時間保温できるものがが必要です。反応液の濃縮を避けるため、エアース式インキュベーターのご使用をおすすめします。

### 冷却遠心機

### 鋳型 DNA

滅菌蒸留水 (RNase-free) に溶解したものをご用意ください。

99.5 % エタノール

イソプロパノール

フェノール / クロロホルム / イソアミルアルコール混合液 (25:24:1)

ヒートブロック あるいは サーマルサイクラー

分光光度計

40 % アクリルアミド / ビスアクリルアミド混合液 (19:1 あるいは 39:1)

尿素

アガロース粉末

ホルムアルデヒド

ホルムアミド

TBE 溶液

MOPS 溶液

電気泳動用色素

パワーサプライ

トルイジンブルー O

臭化エチジウム

SYBR<sup>®</sup>Gold あるいは SYBR<sup>®</sup>Green II (Molecular probes, Inc.)

トランスイルミネーター

メタノール

酢酸

各種修飾リボヌクレオチド

用途に応じて各種修飾リボヌクレオチドをご用意ください。修飾リボヌクレオチドの種類によって取り込み効率は異なりますので、反応条件を最適化する必要があります。

#### 塩基修飾:

ビオチン標識

ジゴキシゲニン標識

蛍光標識

#### リン酸基修飾:

放射性同位体標識

キャップアナログ

等

### 3. 内容説明

---

#### 【 CUGA<sup>®</sup> *in vitro* Transcription Kit の概要 】

CUGA<sup>®</sup> *in vitro* Transcription Kit は、株式会社 ニッポンジーンテックが独自に開発した CUGA<sup>®</sup> ポリメラーゼを用いることにより、目的の RNA 産物を大量かつ正確に得ることできる画期的な RNA 調製キットであり、幅広い用途に使用できます。

#### 1. 既存のキットと比較して、約 2～5 倍量の転写産物を調製することが可能

野生型の大腸菌ファージ T3 RNA ポリメラーゼおよび T7 RNA ポリメラーゼ（以下、野生型ポリメラーゼ）の変異体である CUGA<sup>®</sup>3 ポリメラーゼおよび CUGA<sup>®</sup>7 ポリメラーゼ（以下、CUGA<sup>®</sup> ポリメラーゼ）の開発において、野生型ポリメラーゼが本来有する強力な活性には一切変化を加えずに変異導入を行ったことにより（下記【 CUGA<sup>®</sup> ポリメラーゼ】参照）、極めて効率の良い *in vitro* 転写反応系の構築が可能となりました。また、プラスミド DNA や PCR 産物、化学合成オリゴヌクレオチド DNA 等、鋳型 DNA の種類や鎖長を選ばずに大量の RNA を調製できます。CUGA<sup>®</sup> ポリメラーゼおよびリボヌクレオチドを高濃度にて使用しているため、短鎖の RNA の調製にも適しています。

#### 2. 既存のキットと比較して、安定に正確な転写反応を行うことが可能

CUGA<sup>®</sup> ポリメラーゼが獲得した性質（下記【 CUGA<sup>®</sup> ポリメラーゼ】参照）により、野生型ポリメラーゼを用いた既存のキットの欠点が克服され、*in vitro* 転写反応の効率が飛躍的に向上しました。また、CUGA<sup>®</sup> ポリメラーゼの強力なプロモーター認識能は変化しておりませんので、従来の T3 プロモーター、T7 プロモーターをそのままご使用になれます。

#### 3. 既存のキットと比較して、目的とする RNA を安価に得ることが可能

CUGA<sup>®</sup> ポリメラーゼが有する数々の利点により、*in vitro* 転写反応を用いた RNA 調製におけるコストパフォーマンスが大幅に改善されました。

#### 4. 幅広い用途分野

本キットを用いて得られた RNA は以下のように、*in vitro* 転写反応を利用した既存の実験系にそのまま用いることができます。また、4 種類のリボヌクレオチドを個別に分注しているため、修飾ヌクレオチドあるいはキャップアナログ等の使用により、さらに多様な実験系を構築することが可能です。

無細胞タンパク質合成システムへの導入

高感度マイクロアレイ用プローブの調製

各種ハイブリダイゼーション用プローブの調製

RNA 構造解析

機能性 RNA（リボザイム、アンチセンス、siRNA、等）の調製

微量 mRNA の増幅

SELEX 法への利用

等

## 【 CUGA<sup>®</sup> ポリメラーゼ 】

CUGA<sup>®</sup> ポリメラーゼは、*in vitro* 転写反応を利用した株式会社 ニッポンジーンテック独自の塩基配列決定方法である、CUGA<sup>®</sup> シークエンシングシステムに用いるために野生型ポリメラーゼに変異を導入して開発されました。この変異導入により下記のような野生型ポリメラーゼにはない様々な特徴を得ることに成功しています。

### 1. 鋳型 DNA 3' 末端の形状に依存しない転写反応

直鎖化した鋳型 DNA 3' 末端からのランオフによる転写反応の強制終結を用いた従来の *in vitro* 転写反応においては、平滑末端あるいは 3' 突出末端を有する鋳型 DNA から野生型ポリメラーゼが正常にランオフしないために転写の終結が不完全となり、目的鎖長よりも長い RNA が産生されることが知られていました。CUGA<sup>®</sup> ポリメラーゼは鋳型 DNA 3' 末端の形状に依存しない安定な転写反応を行うため、鋳型 DNA を直鎖化するための制限酵素の種類を選ばずに、必要な部位で転写を終結させることが可能です。したがって、逆転写反応産物からの転写反応を行う際にも、正確な結果を得ることができます。

### 2. 転写終結シグナル様配列に依存しない転写反応

野生型ポリメラーゼはいくつかの転写終結シグナル配列を認識し、これが転写終結に直接関与しています。CUGA<sup>®</sup> ポリメラーゼは一部の転写終結シグナル配列を認識しないため、これらの配列を含む鋳型 DNA から目的鎖長の RNA を調製することが可能です。

### 3. 化学合成オリゴヌクレオチド DNA からの正確な転写反応

二本鎖の化学合成オリゴヌクレオチド DNA を用いた *in vitro* 転写反応によって短鎖の RNA を調製する際には数塩基の余分な塩基付加が起こる場合がありますが、CUGA<sup>®</sup> ポリメラーゼを使用することにより、正確な鎖長の短鎖 RNA を得ることが可能です。

## 4. CUGA<sup>®</sup>3 / CUGA<sup>®</sup>7 *in vitro* Transcription Kit プロトコール

### *in vitro* 転写反応の準備

#### [ 鑄型 DNA の準備 ]

Control DNA について

本キットには、キットの性能を確認するための鑄型 DNA として、Control DNA ( 25 ng/μL ) が添付されています。万が一、結果が思わしくなかった場合の原因究明の指標となりますので、トラブルの際にご使用ください。Control DNA は、Cloning Vector pTS1 DNA ( 株式会社 ニッポンジーンテック ) を制限酵素 *Nsi* あるいは *Sac*I により直鎖化し、濃度を調整したものです。

CUGA<sup>®</sup>3 *in vitro* Transcription Kit には、*Nsi* 消化した Cloning Vector pTS1 DNA、CUGA<sup>®</sup>7 *in vitro* Transcription Kit には、*Sac*I 消化した Cloning Vector pTS1 DNA がそれぞれ添付されています。

*Nsi* 部位は T3 プロモーターから、*Sac*I 部位は T7 プロモーターからそれぞれ約 100 bp 下流の位置に存在し、ともに 100 base の RNA をコードしています。

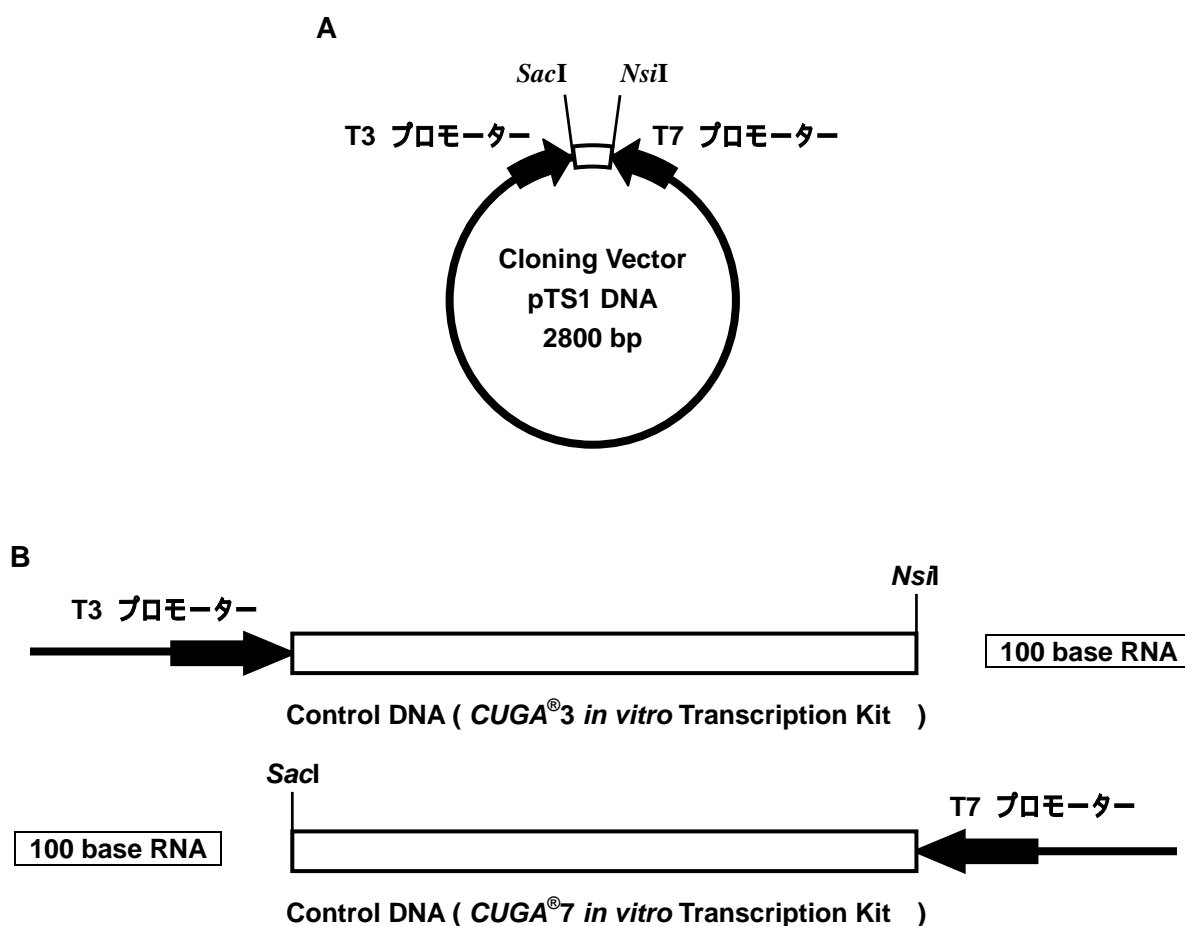


図 1: Control DNA

A: Cloning Vector pTS1 の模式図

B: Cloning Vector pTS1 に含まれるプロモーターの位置と Control DNA の構造模式図



## 鋳型 DNA の調製方法について

*in vitro* 転写反応の鋳型 DNA にはプロモーターを含む A. 直鎖化したプラスミド DNA、B. PCR 産物、C. 化学合成オリゴヌクレオチド DNA のいずれかを用います。野生型ポリメラーゼの強力なプロモーター認識能は変化しておりませんので、従来の T3 プロモーター、T7 プロモーターをそのままご使用になれます。

### A. 直鎖化したプラスミド DNA を使用する場合

本キットではプロモーター依存的な野生型ポリメラーゼの *in vitro* 転写反応を利用していますので、必ず対応したプロモーターが必要です。ご使用のプラスミド DNA に T3 あるいは T7 プロモーター配列が存在することを確認して下さい。

#### プラスミド DNA の直鎖化および精製

本キットでは、CUGA<sup>®</sup> ポリメラーゼを使用しているため、鋳型 DNA の末端形状は転写反応に影響しません。したがって、鋳型 DNA を直鎖化するための制限酵素の種類を選ばずに、必要な部位で転写を終結させることが可能です。

#### 重要

鋳型 DNA の精製度は転写効率に大きく影響しますので、鋳型 DNA は塩化セシウム濃度勾配超遠心分離による精製あるいは RNase 処理後フェノールによる抽出を行ったものをご使用ください。設備上困難な場合は市販のプラスミド DNA 精製キット等を用いると便利です。ただしこの場合、RNase を使用するキットに関しては必ず RNase を除去してください。

制限酵素を用いて鋳型プラスミド DNA の直鎖化を行った場合、電気泳動により消化が完全であることを確認してください。また、フェノールによる抽出を必ず行ってください。

### B. PCR 産物を使用する場合

本キットではプロモーター依存的な *in vitro* 野生型ポリメラーゼの転写反応を利用していますので、必ず対応したプロモーターが必要です。ご使用の PCR 産物に T3 あるいは T7 プロモーター配列が存在することを確認して下さい。

また、PCR 産物の配列中にプロモーターが存在しない場合は、標的配列を増幅するプライマーの 5' 末端に図 2 のようにプロモーター配列を付加して PCR を行ってください。

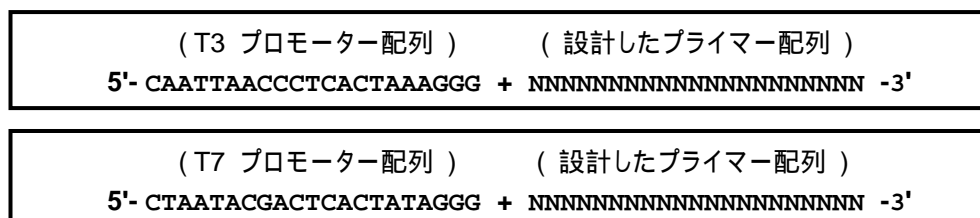


図 2: プロモーター配列を付加するためのプライマー設計

PCR 産物の精製度は転写効率に大きく影響しますので、エタノール沈澱等により精製を行ってください。市販の PCR 産物精製用キット等を用いると便利です。

### C. 化学合成オリゴヌクレオチド DNA を使用する場合

短鎖の RNA の調製を目的とする場合、化学合成オリゴヌクレオチド DNA を鋳型 DNA として利用できます。この際、精製グレードはカートリッジあるいは HPLC を推奨しております。

短鎖の RNA の調製を行う場合には転写の開始効率が重要とされていますが、本キットでは転写反応条件の最適化を行っておりますので、効率よく RNA を調製することが可能です。

#### 化学合成オリゴヌクレオチド DNA からの鋳型 DNA 調製

必ずプロモーター配列部分が完全な二本鎖を形成するように化学合成オリゴヌクレオチド DNA の設計を行ってください。一般的な鋳型 DNA のタイプは図 3 を参照してください。

なお、化学合成オリゴヌクレオチド DNA からの鋳型 DNA 調製は等量モルずつ同一のチューブに加え、この混合液と等量のアニーリングバッファー（20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 200 mM NaCl）と混和した後に 75 °C で 5 分間加熱し、穏やかに室温に戻すことにより調製してください。

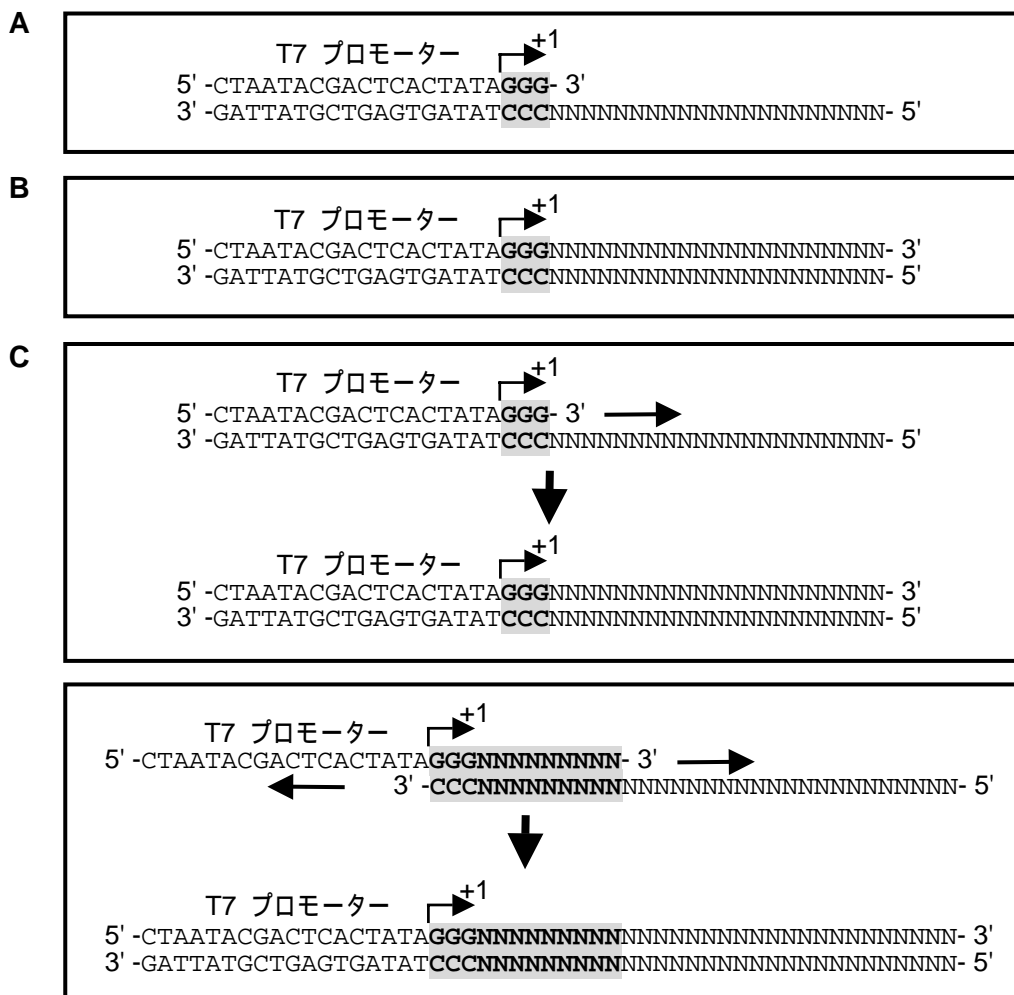
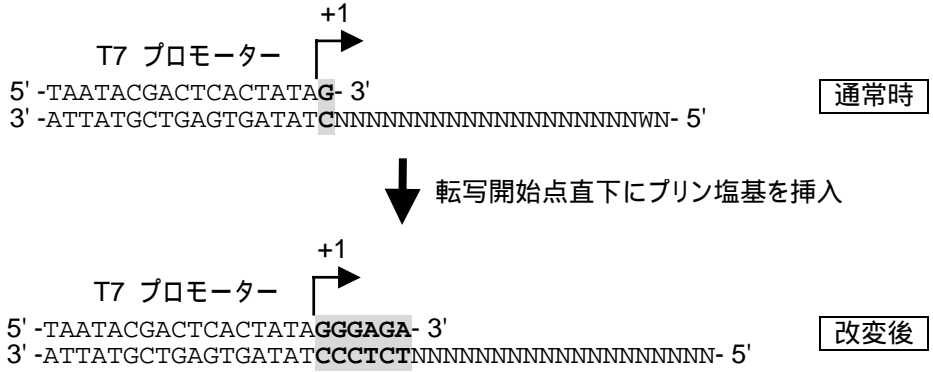


図 3: 化学合成ヌクレオチド DNA からの鋳型 DNA 調製 ( 図は T7 プロモーターを用いた例 )

- A: プロモーター配列のみが二本鎖のもの
- B: プロモーター配列および標的配列が二本鎖のもの
- C: DNA ポリメラーゼ ( Klenow fragment, *Bst* DNA ポリメラーゼ 等 ) を用いて二本鎖を形成させたもの

**重要**

転写反応産物のイニシエーターのグアノシン残基の直下にウリジン残基が連続すると、転写反応産物の配列が GUU--- となり、*in vitro* 転写反応の特性から転写開始効率が著しく低下することが知られています。オリゴヌクレオチド DNA の配列設計時に転写開始点直下にプリン塩基（グアニン、アデニン）を多く配置させると、上記の問題が大幅に改善され安定な転写開始が期待できます。



**図 4: 配列依存的な転写開始効率の変化を回避するための対処方法**  
( 図は T7 プロモーターを用いた例 )

## in vitro 転写反応

### 1. *in vitro* 転写反応

#### 1-1. 転写反应用試薬の融解

キットから以下のチューブを取り出し、室温で完全に融解後、軽く混合して溶液を均一にし、遠心操作により溶液をチューブの底に集めます。5 × Transcription Buffer 内に白い沈澱物（スペルミジン）が見られる場合は、沈澱物が確認されなくなるまでチューブを室温に放置した後、バッファの濃度が均一になるよう、ピペッティングまたはタッピングにより攪拌してください。

5 × Transcription Buffer  
0.1 M DTT  
100 mM CTP  
100 mM UTP  
100 mM GTP  
100 mM ATP

#### 1-2. 転写反応溶液の調製

新しいチューブに以下の試薬を上から順番に加え、よく混和した後、室温に置きます（この溶液を「転写反応溶液」と称します）。液量は 19  $\mu$ L になるように調製してください。

滅菌蒸留水（RNase-free）	y $\mu$ L
5 × Transcription Buffer	4 $\mu$ L
0.1 M DTT	2 $\mu$ L
100 mM CTP	1.5 $\mu$ L
100 mM UTP	1.5 $\mu$ L
100 mM GTP	1.5 $\mu$ L
100 mM ATP	1.5 $\mu$ L
鋳型 DNA 溶液（0.05 ~ 1 pmol）	x $\mu$ L

#### （ご注意）

\* 5 × Transcription Buffer 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、場合によっては不溶物質として沈澱する可能性がありますので、鋳型 DNA は必ず最後に加えてください。沈澱を形成した場合、転写反応の効率が著しく低下します。5 × Transcription Buffer の濃度の不均一化を防ぐため、転写反応溶液の調製操作は必ず室温条件下で行ってください。

#### 1-3. CUGA<sup>®</sup>3 / CUGA<sup>®</sup>7 Enzyme Solution の添加

CUGA<sup>®</sup>3 / CUGA<sup>®</sup>7 Enzyme Solution あるいはその希釈液（下記「酵素の希釈について」参照）1  $\mu$ L を転写反応溶液に加え（全量 20  $\mu$ L）、ピペッティングまたはタッピングにより混合してください。混合する際、気泡が発生すると酵素が失活するおそれがありますので、ご注意ください。

### 酵素の希釈について

非特異的転写反応産物が認められる場合や、鋳型 DNA 量が極端に少ない場合は酵素を添付の Enzyme Dilution Buffer で希釈してください。

#### 1-4. *in vitro* 転写反応

インキュベーターを用いて 37 で 2 時間反応を行います。リボヌクレオチドが枯渇すると転写反応産物への間違ったヌクレオチドの取り込みが発生する可能性がありますので、より精度の高い RNA を必要とされる場合は反応時間を短縮してください。

## 2. RNA の精製

### 2-1. RNA 精製用試薬の融解

キットから以下のチューブを取り出し、室温で完全に融解後、軽く混合して溶液を均一にし、遠心操作により溶液をチューブの底に集めます。

10 M Ammonium Acetate

### 2-2. DNase Enzyme Solution の添加

DNase Enzyme Solution 2  $\mu$ L を転写反応溶液に加え（全量 22  $\mu$ L）、ピペッティングまたはタッピングにより混合してください。

混合する際、気泡が発生すると酵素が失活するおそれがありますので、ご注意ください。

### 2-3. 消化反応

インキュベーターを用いて 37 で 30 分間以上反応を行います。

### 2-4. RNA の精製および電気泳動による検出

未反応のリボヌクレオチドおよび酵素を除去するために、フェノール抽出およびエタノール沈澱を行ってください。市販の RNA 精製用カラムをご使用になると便利です。

以下に、推奨する RNA の精製、検出方法を示します。調製する RNA の鎖長により、精製、検出方法が異なりますので、ご注意ください。本ユーザーズマニュアルでは、1,000 base 以下を短鎖 RNA、1,000 base 以上を長鎖 RNA としています。

#### 精製方法（脱塩、濃縮方法）

短鎖 RNA: エタノール、酢酸アンモニウム

長鎖 RNA: イソプロパノール、酢酸アンモニウム

#### 検出方法

短鎖 RNA: 尿素 / ポリアクリルアミドゲル

長鎖 RNA: ホルムアルデヒド / アガロースゲル

#### 短鎖 RNA の精製: フェノール抽出およびエタノール沈澱

##### **（ ご注意 ）**

\* 短鎖 RNA の場合、イソプロパノールを用いると回収効率が低下します。

- ）反応溶液に滅菌蒸留水 78  $\mu$ L を加えて全量 100  $\mu$ L とし、フェノール / クロロホルム / イソアミルアルコール混合液（25:24:1）を 100  $\mu$ L（等倍量）を加えて転倒混和により混合した後、室温で 13,000  $\times$  g にて 5 分間遠心します。
- ）遠心後、上層（水相）を新しいチューブに移し、再度（ ）の操作を行った後、上層（水相）を新しいチューブに移し、以降の操作に進んでください。
- ）滅菌蒸留水 50  $\mu$ L（2 分の 1 倍量）、10 M Ammonium Acetate 50  $\mu$ L（2 分の 1 倍量）をそれぞれ加えて数回ピペティングを行った後、99.5 % エタノール 400  $\mu$ L（4 倍量）を加えて転倒混和により混合し、室温に 5 分間放置します。
- ）室温で 15,000  $\times$  g にて 10 分間遠心します。
- ）上清を取り除き、70 % エタノール 1 mL を静かに加え、室温で 15,000  $\times$  g にて 5 分間遠心します。
- ）上清を取り除き、沈澱物を風乾により乾燥します。乾燥後は滅菌蒸留水あるいは適当なバッファーに溶解し、すぐに使用しない場合は -20 あるいは -70 で保存してください。

#### 短鎖 RNA の検出: 6 M 尿素 / 24 % ポリアクリルアミドゲル電気泳動の場合

- ）7.2 g の尿素に 40 % アクリルアミド / ビスアクリルアミド混合液（19:1 あるいは 39:1）12 mL、10  $\times$  TBE 4 mL、10 % 過硫酸アンモニウム 300  $\mu$ L を加えてよく混和した後、TEMED 30  $\mu$ L を加えてさらによく混和し、ガラス板に注ぎ込み、適当なコーンを差し込んでゲルを重合させます。
- ）RNA 溶液に等倍量の 8 M 尿素溶液（電気泳動用色素を含む）を加えます。
- ）55 、15 分間熱処理した後、1  $\times$  TBE を電気泳動用緩衝液として、50 - 300 V の定電圧で電気泳動を行います。
- ）電気泳動後、ゲルを 1  $\mu$ g / mL の臭化エチジウム溶液に浸して染色し、紫外線照射下にてバンドの確認および写真撮影を行います。

## 長鎖 RNA の精製: フェノール抽出およびイソプロパノール沈澱

### ( ご注意 )

\* 長鎖 RNA の場合、上記の短鎖 RNA 精製方法を用いることも可能です。

- ) 反応溶液に滅菌蒸留水 73  $\mu$ L、10 M Ammonium Acetate 5  $\mu$ L を加えて全量 100  $\mu$ L とし、フェノール / クロロホルム / イソアミルアルコール混合液 ( 25:24:1 ) を 100  $\mu$ L ( 等倍量 ) 加えて転倒混和により混合した後、室温で 13,000  $\times$  g にて 5 分間遠心します。
- ) 遠心後、上層 ( 水相 ) を新しいチューブに移し、再度 ( ) の操作を行った後、上層 ( 水相 ) を新しいチューブに移し、以降の操作に進んでください。
- ) イソプロパノール 100  $\mu$ L ( 等倍量 ) を加えて転倒混和により混合し、室温に 5 分間放置します。
- ) 室温で 15,000  $\times$  g にて 10 分間遠心します。
- ) 上清を取り除き、70 % エタノール 1 mL を静かに加え、室温で 15,000  $\times$  g にて 5 分間遠心します。
- ) 上清を取り除き、沈澱物を風乾により乾燥します。乾燥後は滅菌蒸留水あるいは適当なバッファーに溶解し、すぐに使用しない場合は -20 あるいは -70 で保存してください。

## 長鎖 RNA の検出: 2.2 M ホルムアルデヒド / 1.5 % アガロースゲル電気泳動の場合

- ) アガロース 1.5 g に、蒸留水 78 mL を加えて加熱、溶解し、25  $\times$  MOPS を 4 mL、ホルムアルデヒドを 18 mL 加えてよく混和した後、型に流し込んでゲルを固化させます。
- ) RNA 溶液 4  $\mu$ L に 25  $\times$  MOPS 1  $\mu$ L、ホルムアルデヒド 4.5  $\mu$ L、ホルムアミド 13.5  $\mu$ L、電気泳動用色素 1  $\mu$ L を加えます。
- ) 55 、15 分間熱処理した後、1  $\times$  MOPS を電気泳動用緩衝液として、50 - 100 V の定電圧で電気泳動を行います。
- ) 電気泳動後、ゲルをイオン交換水に浸し、数時間ゆっくりと震盪してホルムアルデヒドを除去します。
- ) ゲルを 1  $\mu$ g / mL の臭化エチジウム溶液に浸して染色し、紫外線照射下にてバンドの確認および写真撮影を行います。

## 5. トラブルシューティング

本キットの使用において何らかの問題が発生した場合は、以下の項目にしたがって対処してください。また、キット添付の Control DNA を用いて製品のチェックを行ってください。

問題点	原因および対処法
1. 得られる転写産物の量が少ない	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ <u>5× Transcription Buffer の添加不足あるいは過剰添加、温度低下による濃度の不均一化</u></li> <li>・ <u>鋳型 DNA の過剰添加</u></li> <li>・ <u>CUGA<sup>®</sup>3 / CUGA<sup>®</sup>7 Enzyme Solution の過剰添加</u></li> <li>・ <u>鋳型 DNA の精製度が悪い</u>            本キットは <i>in vitro</i> 転写反応を利用しているため、鋳型 DNA の精製度によっては転写効率に差が生じる場合があります。また、高濃度の塩や界面活性剤の持ち込みは転写反応の効率を下げる原因となります。核酸、ヌクレアーゼ、その他の夾雑物の混入にもご注意ください。</li> <li>・ <u>スベルミジンと鋳型 DNA が複合体を形成している</u>            試薬を添加する順序は転写効率に大きく影響しますので、必ず本ユーザーズマニュアルの記載内容にしたがってください。</li> <li>・ <u>転写開始点付近の配列が転写開始効率に影響している</u>            p. 10 をご参照ください。</li> </ul>
2. 非特異的産物が多い	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ <u>制限酵素による鋳型 DNA の消化が不完全である</u>  <i>in vitro</i> 転写反応ではランオフにより反応を終結させます。プラスミド DNA 等を鋳型 DNA に用いる場合に制限酵素消化が不完全であると、目的の領域以降からも続けて転写反応が行われます。鋳型 DNA は制限酵素消化によって完全に直鎖化していることを確認し、可能であればアガロースゲル電気泳動を行い、目的の DNA 断片をゲルから抽出、精製してください。</li> <li>・ <u>PCR の過程において非特異的な DNA が増幅されている</u>            PCR 産物を鋳型 DNA として用いる場合は、非特異的な DNA が増幅されない条件設定で鋳型 DNA の調製を行ってください。また、PCR 産物を鋳型 DNA に使用する場合、アガロースゲル電気泳動を行い、目的の DNA 断片をゲルから抽出、精製することで、さらに正確に目的の転写産物を得ることが出来ます。</li> <li>・ <u>未成熟な転写産物の形成</u>  <i>in vitro</i> 転写反応では、開始反応が律速段階を決定します。本キットでは、これを解決するための最適化を行っておりますが、鋳型配列によっては、NTP 量を最適化することで、未成熟な転写産物の形成が減少する場合があります。</li> <li>・ <u>プロモーターが複数個存在する</u>            プロモーターがコンカテマーを形成しないようご注意ください。</li> </ul>
3. 転写産物が全く得られない	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ <u>鋳型 DNA の上流にプロモーターが存在しない</u>            鋳型 DNA の種類に関わらずプロモーターを確実に導入し、本ユーザーズマニュアルで推奨している配列と一致していることを確認してください。</li> <li>・ <u>鋳型 DNA の精製、鋳型 DNA の制限酵素消化が不完全</u>            上記を参照してください。</li> </ul>



## 6. 参考文献

---

1. He B, Kukarin A, Temiakov D, Chin-Bow STm Lyakhov DL, Rong M, Durbin RK, McAllister WT. ( 1998 ) Characterization of an unusual, sequence-specific termination signal for T7 RNA polymerase. *J Biol Chem.* 273, 18802
2. Triana-Alonso FJ, Dabrowski M, Wadzack J, Nierhaus KH. ( 1995 ) Self-coded 3'-extension of run-off transcripts produces aberrant products during in vitro transcription with T7 RNA polymerase. *J Biol Chem.* 270, 6298
3. Guajardo R, Lopez P, Dreyfus M, Sousa R. ( 1998 ) NTP concentration effects on initial transcription by T7 RNAP indicate that translocation occurs through passive sliding and reveal that divergent promoters have distinct NTP concentration requirements for productive initiation. *J Mol Biol.* 281, 777
4. Korencic D, Soll D, Ambrogelly A. ( 2002 ) A one-step method for *in vitro* production of tRNA transcripts. *Nucl Acids Res.* 30, e105
5. Ling ML, Rismon SS, Klement JF, McGraw N, McAllister WT. ( 1989 ) Abortive initiation by bacteriophage T3 and T7 RNA polymerase under conditions of limiting substrate. *Nucl Acids Res.* 17, 1605
6. Milligan JF, Groebe DR, Witherell GW, Uhlenbeck OC. ( 1987 ) Oligoribonucleotide synthesis using T7 RNA polymerase and synthetic DNA templates. *Nucl Acids Res.* 15, 8783
7. Milligan JF and Uhlenbeck OC. ( 1989 ) Synthesis of small RNAs using T7 RNA polymerase. *Methods Enzymol.* 180, 51
8. Nacheva GA, Berzal-Herranz A. ( 2003 ) Preventing nondisired RNA-primed RNA extension catalyzed by T7 RNA polymerase. *Eur J Biochem.* 270, 1458
9. Shirane D, Sugao K, Namiki S, Tanabe M, Iino M, Hirose K. ( 2004 ) Enzymatic production of RNAi libraries from cDNAs. *Nat Genet.* 36, 190
10. Wyatt JR, Chastain M, Puglisi JD. ( 1991 ) Synthesis and purificaton of large amounts of RNA oligonucleotides. *Biotechniques.* 11, 764

本キットに関するお問い合わせ先

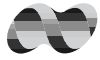
---

---

株式会社 ニッポンジーン  
学術営業部 学術営業課  
TEL: 076-451-6548 / FAX: 076-451-6547  
URL: <http://www.nippongene.jp>  
E-mail: [info@nippongene.jp](mailto:info@nippongene.jp)

---

---



**NIPPON GENETECH CO.,LTD.**

<http://www.nippongenetech.com>

**CUGA<sup>®</sup> in Vitro  
NIPPON**

- ・ CUGA<sup>®</sup>は、株式会社ニッポン ジーンテックの日本における登録商標です。
- ・ 「ニッポンジーン」および「NIPPON GENE」は、株式会社ニッポンジーンの日本における登録商標です。
- ・ その他、製品名等の固有名詞は各社の商標、または登録商標です。

記載内容や製品仕様，価格に関しては予告なしに変更する場合があります。

Copyright © 2002-2004 NIPPON GENETECH CO.,LTD. All Rights Reserved.

**お問い合わせ先**

株式会社ニッポンジーン 学術営業部

TEL 076 (451) 6548

FAX 076 (451) 6547

E-mail [info@nippongene.jp](mailto:info@nippongene.jp)

弊社製品は、(株)ニッポンジーンで取り扱っております  
ので、弊社製品に関しては上記へお問い合わせください。