

CUGA[®]7 *in vitro* Transcription Kit

本書は、CUGA[®]7 *in vitro* Transcription Kit のキット内容およびプロトコールの概要を紹介した簡易マニュアルです。本キットをはじめてご使用になる場合は、別途「ユーザーズマニュアル」に記載の注意事項とプロトコールをご確認ください。
ユーザーズマニュアルは (株)ニッポンジーン のホームページからダウンロードできます。

<https://www.nippongene.com/siyaku/list.html>

Code No. 307-13531 (20 反応用)

キット内容

本キットには、1 反応あたり 20 μ l の容量で *in vitro* 転写反応を 20 回行える試薬が含まれております。

内容	容量
CUGA [®] 7 Enzyme Solution	20 μ l
5 × Transcription Buffer	80 μ l
0.1M DTT	40 μ l
100mM CTP	30 μ l
100mM UTP	30 μ l
100mM GTP	30 μ l
100mM ATP	30 μ l
Control DNA (pTS1/Sac I)	6 μ l
DNase Enzyme Solution	40 μ l
10M Ammonium Acetate	1 ml
Enzyme Dilution Buffer	200 μ l

※ 本キットにはユーザーズマニュアルの代わりに簡易マニュアルを添付しています。

保存： -20°C に保管し、過度の冷却はお避けください。
納品後 6 ヶ月以内のご利用をお勧めいたします。

プロトコール (操作の流れ)

1 鋳型 DNA の調整

in vitro 転写反応では、転写開始点から下流のアンチセンス鎖を鋳型 DNA として、RNA を合成する。プロモーター配列部分は完全に二本鎖を形成する必要がある。

鋳型 DNA には、T7 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** のいずれかを用いる。

A. 直鎖化したプラスミド DNA

鋳型 DNA の純度は転写効率に大きく影響するので、鋳型プラスミド 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 処理後にフェノールによる抽出を行ったものを使用する。

市販のプラスミド DNA 精製キットなども使用できるが、RNase を使用するキットに関しては必ず RNase を除去する。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する。また、フェノールによる抽出を必ず行う。

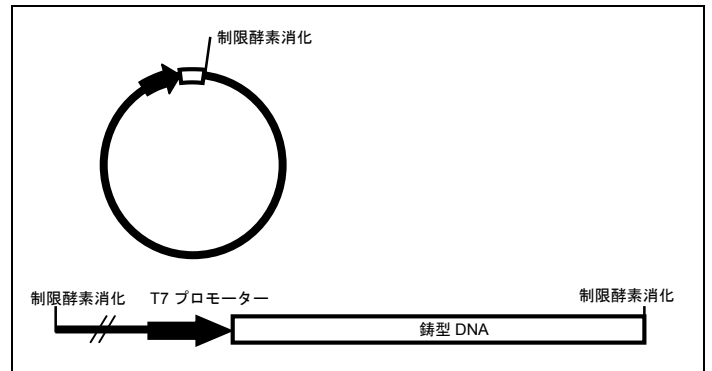


図 1: 直鎖化したプラスミド DNA

B. PCR 産物

PCR 産物はエタノール沈澱または市販の PCR 産物精製用キット (MinElute[®] PCR Purification Kit 等) で精製したものを用いる。

PCR 産物の配列中に T7 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 を行うことで鋳型へのプロモーター導入が可能である。



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

C. 化学合成オリゴヌクレオチド DNA

オリゴヌクレオチドの精製グレードは、カートリッジあるいは HPLC を推奨する。図 3 のように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 の設計を行う。

