



## mRNA の合成 & 精製

### 1. mRNA の合成

ここでは、反応時間が短く使い勝手の良い、下記の2つのキットを用いた mRNA 合成例を示します。タンパク質合成反応液量に従って、スケールアップ・ダウンして合成して下さい。100  $\mu$ L 反応スケールで合成した場合、その後の精製を経て、およそ 300-600  $\mu$ g 程度の mRNA が取得可能です。

○ Epicentre 社 AmpliScribe™ T7-Flash™ Transcription Kit (ASF3257)

鋳型 DNA	5 $\mu$ g
10 × Buffer	10 $\mu$ L
ATP	9 $\mu$ L
CTP	9 $\mu$ L
GTP	9 $\mu$ L
UTP	9 $\mu$ L
DTT	10 $\mu$ L
T7 Polymerase	10 $\mu$ L
RNase Free Water	to 100 $\mu$ L
・ 37°C、30 分	

○ Promega 社 T7 RiboMAX™ Express Large Scale RNA Production System (P1320)

鋳型 DNA	5 $\mu$ g
2 × Buffer	50 $\mu$ L
T7 Polymerase	10 $\mu$ L
RNase Free Water	to 100 $\mu$ L
・ 37°C、30 分	

いずれのキットも Buffer が溶解しにくい場合があります。このような場合、完全に溶解させないと著しく反応効率が低下します。溶けにくい場合は、60°C で数分加温すると速やかに溶解しますので、必ず完全に溶解させてからご使用ください。

また、反応時間は厳守して下さい。特に鋳型のサイズが大きい場合、過剰な反応を行うと、反応中に沈殿を生じることがあります。沈殿が生じてしまうと、mRNA は回収できません。このような場合は、①反応時間を 20 分程度まで短縮する、②鋳型 DNA の量を 2-3 割程度減らす、③鋳型を制限酵素処理ではなく、PCR により調製するなど改善が見られますので、これらの方法で対応してください。

### 2. mRNA 精製

mRNA の精製はゲル濾過による塩・未反応 NTP の除去とエタノール沈殿による濃縮を目的に行います。フェノクロ抽出などは特に必要ありません。また、使用する水も滅菌蒸留水で問題ありません。

- ・ Nick カラムの上フタを外し、溶液を捨てる。
- ・ 3mL の滅菌蒸留水でリンスして、再度滅菌蒸留水を捨てます。
- ・ カラム先端のキャップを外し、スタンドに立てます。
- ・ ゲルを平衡化するため 3mL の滅菌蒸留水を加え、完全に流しきります。
- ・ mRNA 溶液をゲル上端にのせ(最大 100  $\mu$ L まで)、完全に流しきります。
- ・ 400  $\mu$ L の滅菌蒸留水を加え、完全に流しきります。
- ・ mRNA 溶液を受けるために、1.5mL 容チューブをカラムの下に配置します。
- ・ 400  $\mu$ L の滅菌蒸留水を加え、mRNA 溶液を回収します(約 400  $\mu$ L 回収できます)。
- ・ 回収した mRNA 溶液に 40  $\mu$ L の 3M 酢酸カリウムと 950  $\mu$ L のエタノールを加え、よく混合し 15,000rpm、4°C で 20 分間遠心します。
- ・ 上清を捨て、70%エタノールでリンスを行い、mRNA の合成スケールに応じて 20~100  $\mu$ L の滅菌蒸留水に溶解します。



このプロトコルにおける注意事項は、エタノール沈殿時に mRNA を乾固させないことです。70%エタノールでリンス後は、ピペットで余分なエタノールを除去する程度で構いません。乾固させてしまうと、mRNA が水に溶解できなくなってしまいます。

mRNA 濃度は 2mg/mL 以上に調整して下さい。

### 3. mRNA の確認

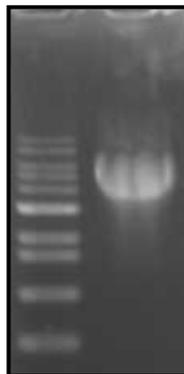
mRNA が正しく合成できたかどうかは、精製後に電気泳動で確認する事が出来ます。

初めて mRNA を合成、精製されたような場合には、精製後に正しく mRNA が合成できたかどうかを電気泳動によって確認してください。

以下にプロトコルと実験結果の一例を示します。

20 × MOPS	1 μL
ホルムアルデヒド	3 μL
ホルムアミド	8 μL
サンプル溶液	8 μg
Total	20 μL

- ・ 65°C、15 分間 加熱処理
- ・ 1%アガロースゲルにて電気泳動
- ・ エチジウムブロマイドにて検出



図のようにバンドが検出されれば問題ありません。逆に、「バンドが見えない」もしくは「スメアになっている」場合は、mRNA の分解が考えられますので、実験過程で RNase のコンタミがなかったか、鋳型 DNA 調製時にフェノール/クロロホルム抽出を行ったかなど、確認してください。

### 4. リンク法によるタンパク質合成

タンパク質合成反応のスケールを大きくスケールアップする時(例えば 10mL)などには、mRNA の精製を省略するリンク法を用いると便利です。

リンク法では転写反応液を直接タンパク質合成に使用しますが、その際、反応液中に EDTA を添加することで過剰に持ち込まれるマグネシウムイオンをキレートし、本来なら阻害されてしまうタンパク質合成を改善した方法です。1.で紹介したキットの場合は、EDTA を最終濃度で 1.5mM 添加することで、精製した mRNA を用いる場合に比べ約 85%の合成量を見込めることが明らかとなっています。

#### リンク反応における反応液組成例

mRNA 合成反応液	2 μL
Reaction Buffer	15 μL
Insect Cell Extract	25 μL
4mM Methionine	1 μL
25mM EDTA	3 μL
滅菌蒸留水	4 μL

詳細は[アプリケーションデータ④](#)を参照ください。

【注意】鋳型となる DNA によって、転写効率に差異が認められるため、まず mRNA 合成反応液の最適な添加量を検討してください。その際は、mRNA 合成反応液の添加量に応じて EDTA の最終濃度を調節してください。

#### <ご注意>

本プロトコルは、他社製試薬キットの使用に関し、いかなる使用許諾を示唆するものではありません。それぞれの製品の取扱説明書等に従い、適切なご使用をお願い致します。