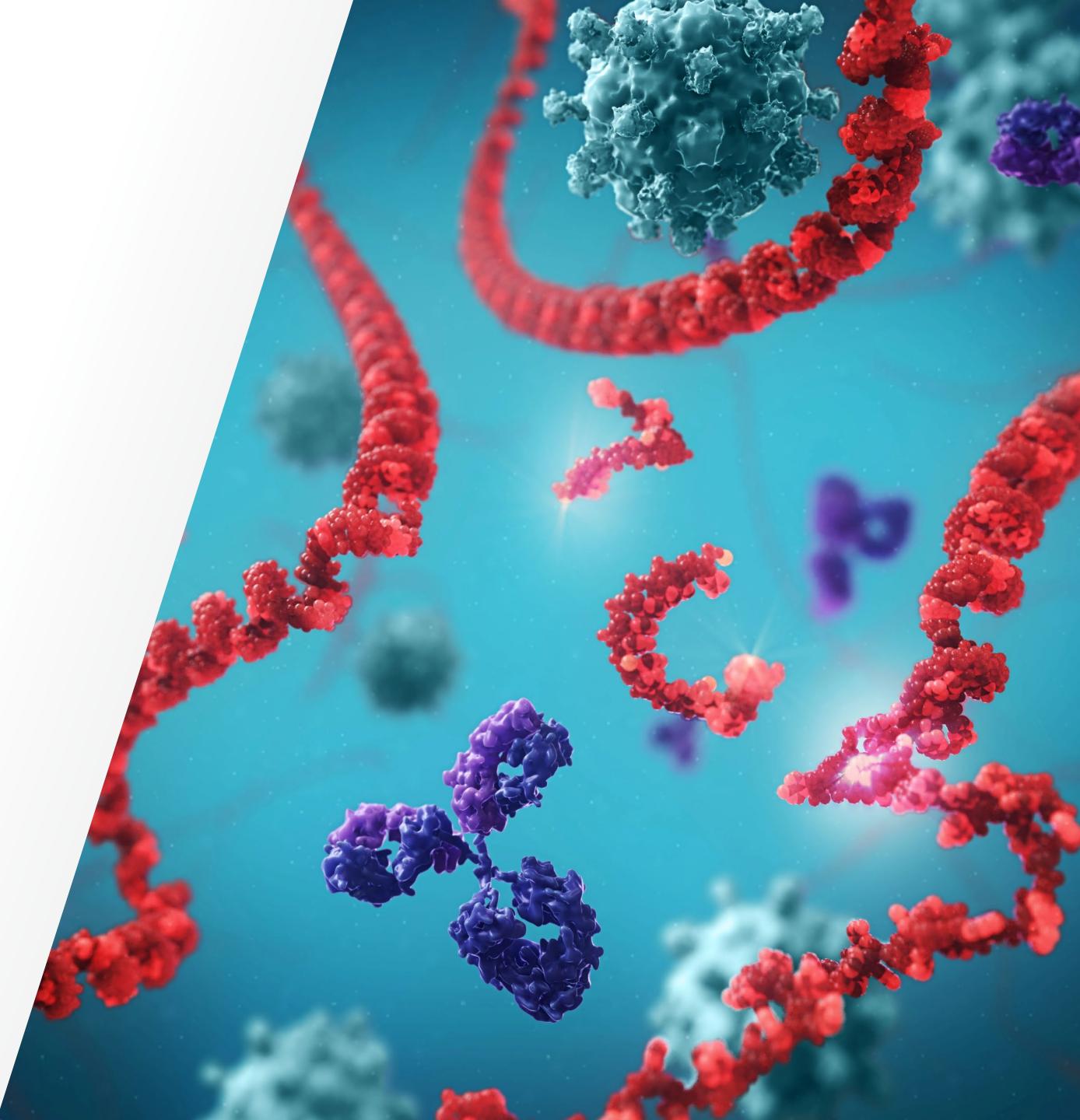


# IVT (*in vitro*転写)用 PCRテンプレートの注文方法

## GeneArt 遺伝子合成 編

■ The world leader in serving science

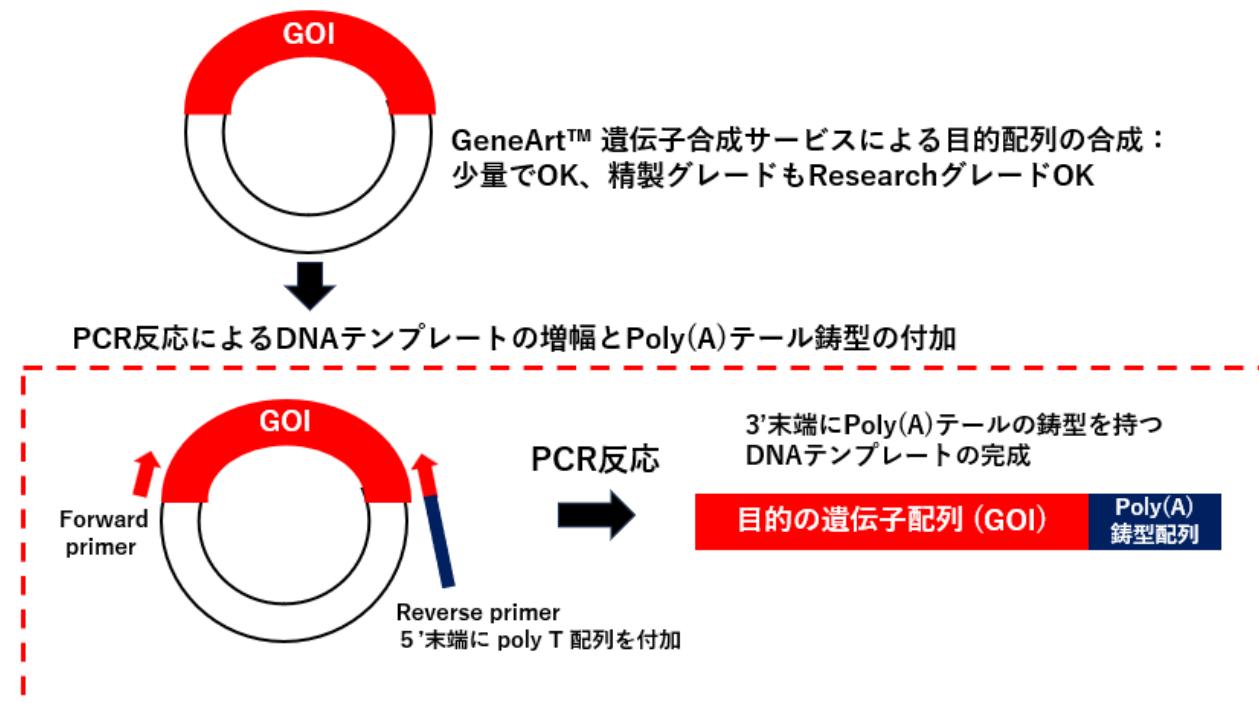


# GeneArt 遺伝子合成サービスによる IVT (*in vitro* 転写)用 PCR テンプレートの注文方法

IVT (*in vitro* 転写)では直鎖状のプラミドDNAがテンプレートとして多く利用されていますが、IVTに利用可能な高純度のプラスミドDNAを大腸菌ホストから回収する操作は煩雑で時間が掛かります。一方、PCRを利用することで大量のテンプレートDNAを簡単に調製できます。またプラスミドDNAにPoly(A) 鎏型配列を付加することは合成技術上難しいのですが、PCR反応を介することで簡単に付加できます。

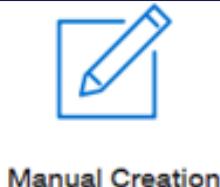
## 『Invitrogen™ GeneArt™遺伝子合成の特徴と注意点』

- ・ 合成サイズ: 100 bp ~ 12 kbまで合成可能
- ・ 合成量／純度 : 5 µgから最大15 mgスケールまで選択可能。5 µgスケールのみResearchグレード、その他のスケールは高純度なTransfectionグレード
- ・ Poly(A)テール鎔型配列は付加は特別注文と、インターネットオーダーはできません※。DNAテンプレート量の増幅、Poly(A)テール鎔型配列の付加はPCRによって行えます（右図参照）
- ・ 合成が難しい配列(高／低GCなど)にも対応



※ メールにてご注文を承っています。

## 注文手順

1	<p>GeneArt 遺伝子合成サービスの注文サイトへアクセスし、『GeneArt Dashboard』の『注文する』のリンクをクリックします。</p>	<p><a href="https://www.thermofisher.com/jp/ja/home/life-science/cloning/gene-synthesis/geneart-gene-synthesis.html">https://www.thermofisher.com/jp/ja/home/life-science/cloning/gene-synthesis/geneart-gene-synthesis.html</a></p>  <p>注文する</p> 
2	<p>サインインの画面が表示されます。 『thermofisher.comアカウント』にログインします。</p>	<p>アカウントをお持ちでない方は以下でご登録お願いします： <a href="https://www.thermofisher.com/identity/account/registration/">https://www.thermofisher.com/identity/account/registration/</a></p>
3	<p>『Cloned Genes』のメニューの『Start New Project』をクリックします。</p>	 <p>Cloned Genes</p>  <p>Start New Project</p> 
4	<p>『Manual Creation』のメニューをクリックします。画面が切り替わり、配列を入力するリストが表示されます。</p>	 <p>Manual Creation</p>  <p>以下の画面が表示されます：</p> 

## 注文手順

5 『Sequence Name』の空白の列をダブルクリックしてから、配列名を入力します。

Sequence Name ⓘ

Click to enter Sequence name

空白のままにすると適当な名前が振られてしまうので注意してください。配列名は アルファベット、ハイフン( - )、アンダーバー( \_ )が利用できます。スペースはNGです。

6 『DNA or Protein Sequence』の空白の列をダブルクリックしてから、合成する遺伝子の CDS 配列を入力(コピー／ペースト)します。開始コドン(ATG)から終止コドンまでの配列を入力します。

DNA or Protein Sequence

Important information on Protein sequence(s) ⓘ

ATGCACAGCTCAGCACTGCTCTGTTGCCTGGTCCCTGACTGGGGTGAGGGGCCAGCCCAGGC...

7 『5' Region (Optional)』の空白の列をダブルクリックしてから、合成する遺伝子の **T7プロモーター + 5'UTR + Kozak 配列**を入力(コピー／ペースト)します。

5' Region (Optional) ⓘ

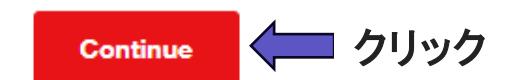
TAATACGACTCACTATAAG...

8 『3' Region (Optional)』の空白の列をダブルクリックしてから、合成する遺伝子の **3'UTR 配列 + (オプション:制限酵素認識配列)**を入力(コピー／ペースト)します。  
注: Poly(A)配列は合成できません。

3' Region (Optional) ⓘ

GCTGGAGCCTCGGTGGC...

9 リスト右上にある『Continue』ボタンをクリックします。



クリック

## 注文手順

10

ポップアップ画面で『**Everything looks good!**』が表示された場合、『**Continue to configure**』をクリックします。

Everything looks good!

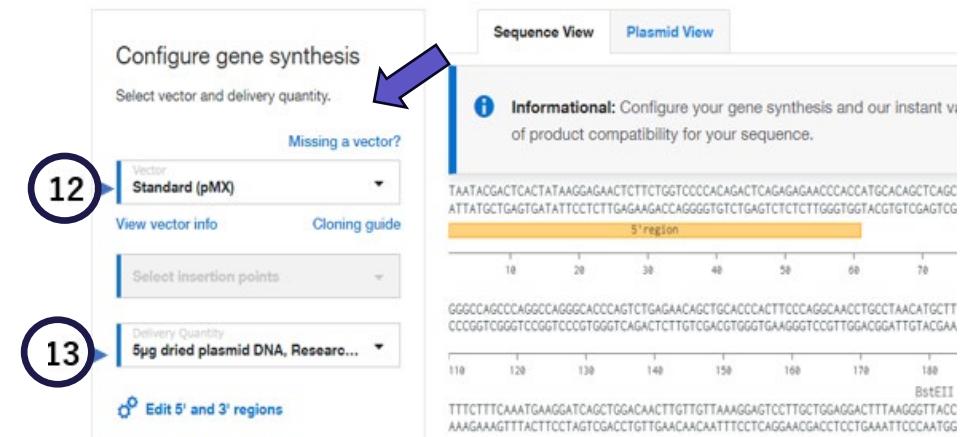
**Continue to configure**

← クリック

11

切り替わった画面中の『**Configure gene synthesis**』のメニューからプラスミドDNAの指定と、合成スケール/純度の指定を行います：

- ・ プラスミドDNAの指定 → ステップ12へ
- ・ 合成スケール／純度の指定 → ステップ13へ



12

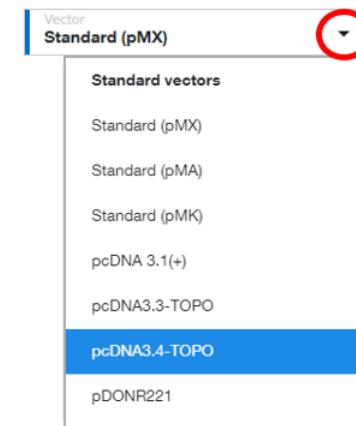
**プラスミドDNAの指定(重要)** :

T7 RNA polymeraseによるIVTを行う場合、バックボーンにT7プロモーター配列が存在しないベクターを選択します。

注：ディホルトで指定されている pMXのベクターはバックボーンにT7プロモーター配列が存在しているため 適しません。

参考：以下ベクターなどが利用できます。

- ・Invitrogen™pcDNA™3.4 TOPO™ベクター (pcDNA™3.4 TOPO™ TA Cloning Kit : 製品番号 A14697)
- ・Invitrogen™ pBAD/His Kit (製品番号 V43001)



▼をクリックすると ベクターのリストが表示されます。  
希望するベクターを選択してクリックします。

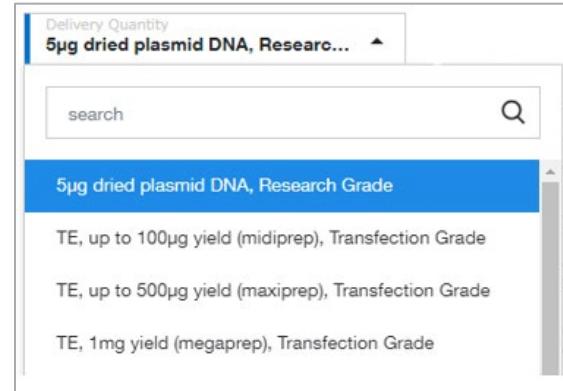
## 注文手順

13

## 合成スケール／純度の指定：

PCRテンプレートとして使用する場合、安価な“5µg dried Plasmid DNA, Research Grade”で十分です。

注) PCRを行わず直鎖状DNAテンプレートとして利用を検討する場合は、Transfection Gradeを選択してください。合成スケールは使用量に応じて選択します(参考: 20 µLのIVT反応では1 µg程度使用します)。



▼をクリックするとベクターの合成スケールと純度のリストが表示されます。希望する合成スケール／純度を選択し、クリックします。

14

『Apply & Analyze』をクリックします。

## 『Error』が表示されなかった場合：

最適化を行う場合 → ステップ15へ  
そのまま合成する場合 → ステップ16へ

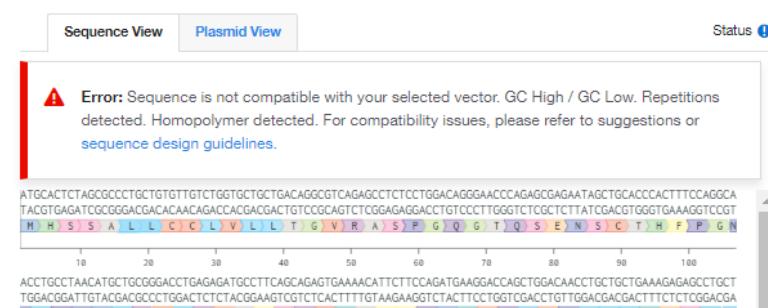
## 『Error』が表示された場合：

Errorメッセージを確認し問題に対処します。  
最適化で対処する場合 → ステップ15へ



クリック

## Error表示の例：

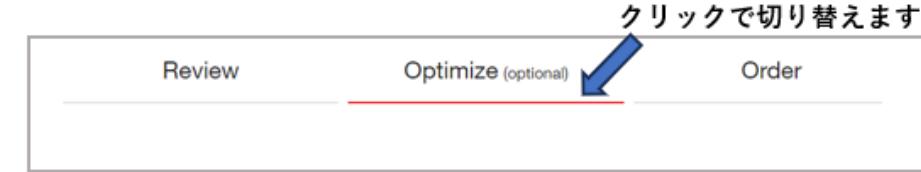


Errorの理由が表示されます。改善できるか否かを確認し、対処します。  
最適化を行うことで改善する場合があります。

15

## 配列の最適化：

画面を『Optimize』に切り替えます。



## 注文手順

15  
つづき

『Optimize sequences』のメニューが表示されます。

### ① 生物種の選択

“Host Organism”のボックスがディホルトでは『No optimization』になっています。右横の▼をクリックすると生物種のリストが表示されます。合成する遺伝子の生物種、またはIVTで合成したmRNAを導入する細胞/生体の生物種を選択します。

### ② ORFの選択

生物種を選択すると『Select ORF』のボックスがアクティブになります。右横の▼をクリックし ORF ( CDSの領域 ) を選択します。

③『Optimize Sequence』をクリックします。  
『Success』が表示されたら、ステップ16へ進みます。

Success: Sequence is optimized.



## 注文手順

16

注文 :

画面左上のタグを『Order』に切り替えます。

注文リスト中の『Choose add-on and fast delivery』をクリックします。納期やその他のオプションを選択できます。

『Add-on Service』の画面が表示されます。  
合成日数(Standard / Express)を選択し、  
その他のオプションも必要に応じて✓を入れ、  
『Save』をクリックします。

注 : オプションには追加料金が発生します。

購入する人工遺伝子合成にチェックを入れ、『Add to Cart』ボタンをクリックし、注文を進めます。

Review      Optimize (optional)      Order ← クリックで切り替えます

Test      714 bp      Price not available  
pcDNA3.4-TOPO  
TE, up to 100µg yield (midiprep), Transfection Grade  
+ Choose add-on and fast delivery ←

Add-on Services ×

Choose the add-on services for your cloned gene.

Production Time ⓘ  
Standard  
Standard (selected)  
Express  
Super Speed

Sanger Sequencing ⓘ  
 TSE-Free ⓘ  
 Glycerol Stock ⓘ  
 Stock Agar ⓘ

Express: 合成日数が Standard より1日短縮できます

Cancel      Save ← クリック

Test      714 bp  
pcDNA3.4-TOPO  
TE, up to 100µg yield (midiprep), Transfection Grade

Add to Cart ← クリック



研究用にのみ使用できます。診断用には使用いただけません。

© 2024 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved.

All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified.

実際の価格は、弊社販売代理店までお問い合わせください。

価格、製品の仕様、外観、記載内容は予告なしに変更する場合がありますのであらかじめご了承ください。

標準販売条件はこちらをご覧ください。[thermofisher.com/jp-tc](http://thermofisher.com/jp-tc)