

製品コード 2430A

TAKARA

si-RNAse III[®]
(*Shewanella* strain Ac.10)

説明書

I. はじめに

RNAi (RNA interference) とは、siRNA (short interfering RNA) と呼ばれる 21 ~ 23 mer の 2 本鎖 RNA により配列特異的に遺伝子発現が抑制される現象です。このプロセスでは、はじめに長鎖の dsRNA (double stranded RNA) がリボヌクレアーゼ活性を有する Dicer によって 21 ~ 23 mer の短い siRNA にプロセッシングされます。生成された siRNA は、RNA-induced silencing complex (RISC) によって取り込まれ、この複合体が標的 mRNA の切断を行うことが知られています。

RNAi 実験においては、siRNA を細胞内に存在させることが必要ですが、主な手法として、

1. 予め作製しておいた 2 本鎖 RNA を細胞内にトランスフェクションする方法
2. siRNA 発現ベクターを構築してトランスフェクションし、細胞内で 2 本鎖 RNA を発現させる方法

が用いられています。

1. の手法のうち、siRNA を合成により作製し、トランスフェクションする方法は非常に簡便に行えますが、標的配列の選択や siRNA 配列によって RNAi 効果が異なるため、確実に効果を得るためには、より高度な経験と予測が必要になります。

一方で、大腸菌由来の RNase III を用いて、長鎖の dsRNA を切断し、簡単に siRNA の混合物 (siRNA カクテル) を得る方法が開発されています。しかしながら、大腸菌由来の RNase III の場合、10 数 mer 程度の低分子分解物が生じやすいため、部分分解を行い、さらには約 21 mer の分解産物を分画する必要があります。

本製品 si-RNase III[®] は低温菌 (*Shewanella* strain Ac.10) 由来で、従来の大腸菌由来の RNase III とは異なり、長鎖 dsRNA を切断する際の分解が緩やかで、かつ、10 数 mer 程度の低分子 siRNA が生じにくいという特長を持つ酵素です。すなわち、本酵素を用いることで、300 ~ 1,000 bp の長鎖 dsRNA を切断し、RNAi に使用するために適した長さの siRNA 混合物を効率よく作製することが可能となります。さらに切断産物の分画が不要であるなどのメリットもあります (図 1, 2 参照)。

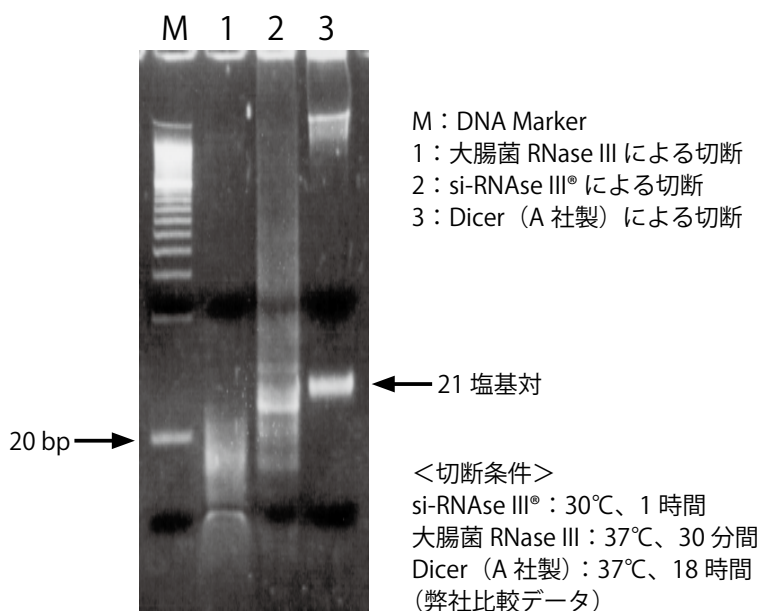


図 1. si-RNase III[®] による長鎖 dsRNA (約 700 bp) の切断結果

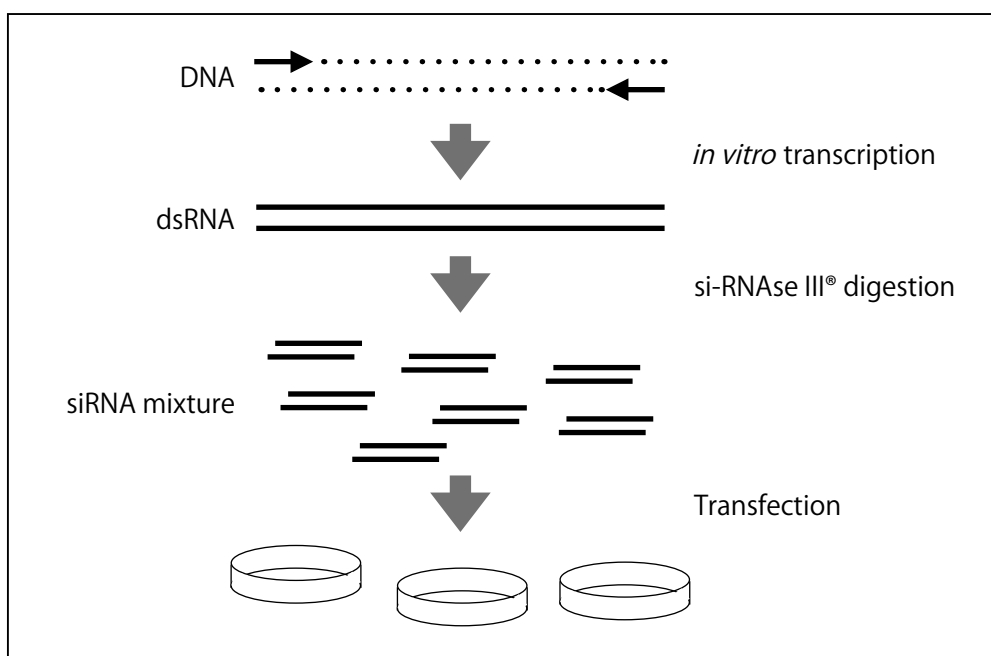


図 2. si-RNase III[®] 分解物を用いた RNAi

II. 保存

- 80℃（輸送、保存ともに）
 不必要な凍結融解の繰り返しは避けてください。

III. 使用上の注意

- 基質となる dsRNA や、反応に使用するチューブ、マイクロピペット用チップなどに RNase が混入した場合、切断産物の純度が低下する場合があります。反応に使用するチューブ、マイクロピペット用チップは専用のものとし、反応を行うときにはディスポーザブル手袋を着用し、RNase が混入しないように注意してください。またプラスミド調製などの RNase を使用する区画での反応は避けてください。
- 本製品は – 80℃ 保存品です。使用時には氷冷し、使用後は速やかに – 80℃ 保存を行うようにしてください。

IV. 使用例

【1】基質 dsRNA の調製

dsRNA の調製方法は、特に限定されませんが、ここでは一例として以下の方法をご紹介します

以下の基質 dsRNA 合成には *in vitro* Transcription T7 Kit (for siRNA Synthesis)（製品コード 6140）を使用することができます（詳細は添付の取り扱い説明書をご参照ください）。

<鋳型 DNA の調製について>

両端に T7 プロモーター配列*を有する PCR 増幅産物を鋳型として使用します。
[ここでは PCR 増幅産物を鋳型とした dsRNA 合成例を示していますが、プラスミドを鋳型とした合成方法もあります。くわしくは *in vitro* Transcription T7 Kit (for siRNA Synthesis) をご参照ください]。

* T7 プロモーター配列

TAATACGACTCACTATA**G**GGAGA

↑
矢印が示す太文字の G より transcript RNA が合成されていきます。

(1) PCR による鋳型 DNA の調製

1) 下記のプライマーを合成する。

[センスプライマー]

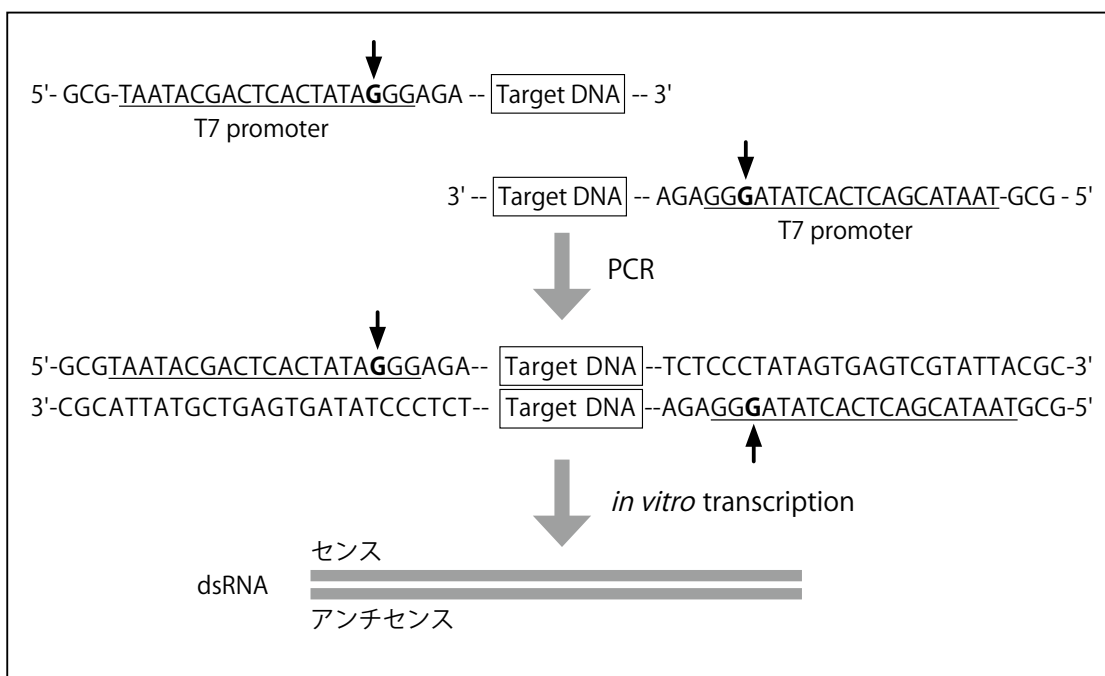
5'- GCG-TAATACGACTCACTATA**G**GGAGA-NNNNNNNNNN-3'
leader T7 promoter sequence Target DNA (~ 20 bases)

[アンチセンスプライマー]

5'- GCG-TAATACGACTCACTATA**G**GGAGA-NNNNNNNNNN-3'
leader T7 promoter sequence Target DNA (~ 20 bases)

2) PCR を行い、両端に T7 プロモーターを有する二本鎖 DNA を増幅する。

3) エタノール沈殿により精製した後、RNase-free の蒸留水に溶解し、転写反応の鋳型に用いる。



(2) *in vitro* transcription 反応

詳細は *in vitro* Transcription T7 Kit (for siRNA Synthesis) の説明書をご参照ください。

1) 以下の反応液を調製する。

10 × Transcription Buffer	2 μl
ATP Solution	2 μl
GTP Solution	2 μl
CTP Solution	2 μl
UTP Solution	2 μl
RNase Inhibitor	0.5 μl
T7 RNA Polymerase	2 μl
RNase free water	x μl
linear template DNA	20 ng ~ 1 μg
	20 μl

2) 42°Cで1～2時間反応を行う。

(3) アニール操作

1) transcription 反応後、75°Cで5分間加熱したのち室温まで徐冷する。

(4) DNase 処理

- 1) アニール操作後、10～20 U/20 μl 反応液となるように RNase free DNase I を加え混和する。
- 2) 37°Cで30分間反応を行う。

(5) dsRNA の精製

(A) フェノール/クロロホルム抽出、イソプロパノール沈殿により精製する場合

- 1) 等量の酸性フェノール (pH4.5) /クロロホルム/イソアミルアルコール (25:24:1) を加えて vortex によりよく撹拌し、12,000 rpm で2分間室温で遠心する。
- 2) 上層 (水層) を新しいチューブに移し、クロロホルム/イソアミルアルコール (24:1) を等量加えて vortex によりよく撹拌し、12,000 rpm で2分間室温で遠心する。
- 3) 上層 (水層) を新しいチューブに移し、1/10量の3M酢酸ナトリウム、等量のイソプロピルアルコールを加えてよく撹拌する。
- 4) 室温で5分おいた後、15,000 rpm で5分間室温で遠心する。
- 5) 注意深く上清を取り除き、80%エタノールで沈殿を洗浄する。
- 6) 減圧下で軽く乾燥させた後、RNase-free の蒸留水もしくは TE buffer に溶解する。
- 7) 必要に応じて小分けし、-20°C～-70°Cで保存する。

(B) 市販キットを使用する場合

下記のキット等が使用可能;

- Transcript RNA CleanUp Kit (製品コード 9097)
- MEGAclean (Ambion 社 Cat.#1908)
- スピンカラム -NucAway Spin Columns (Ambion 社 Cat.#10070)
- QIAGEN RNA/DNA Mini Kit (QIAGEN 社 Cat.#14123)

【2】 siRNA 混合物の調製

(1) si-RNase III[®] による切断反応

1) 以下の反応液を調製する。

5 × si-RNase III [®] buffer	2 μ l
30 mM MgCl ₂	1 μ l
dsRNA	1 μ g
si-RNase III [®]	1 μ l
RNase free water	up to 10 μ l

注) 上記反応液調製は 10 μ l 反応容量ですが、基質量によって、スケールアップもしくはスケールダウンが可能です。例えば、10 μ g の dsRNA を切断する場合、上記反応液を全て 10 倍にスケールアップして反応を行ってください。

2) 30℃、1 時間インキュベーションする。

3) Stop Solution (120 mM EDTA) を 2 μ l 添加し、反応を停止する。

4) 反応液の一部を 15% ポリアクリルアミドゲル電気泳動により確認する*。

* : 基質の種類、長さ、および量によって切断パターンが異なる場合があります (VI. トラブルシューティング参照)。

(2) 切断産物の精製

切断産物は、フェノール/クロロホルム処理、エタノール沈殿による精製を行ってください。

または、GTS 社製の RNAPurification Column1 (GTS 社 Code T510004) および RNA Purification Column2 (GTS 社 Code T510005) を用いた精製も可能です。その場合は添付のプロトコールに従ってください。

1) RNase-free dH₂O を加えて total volume を 100 μ l にした後、フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25 : 24 : 1) を等量加え、vortex によりよく混合する。

2) 4℃で 15,000 rpm、5 分間遠心し、室温で遠心する。

3) 上層 (水層) を新しいチューブに移し、クロロホルム/イソプロパノール (24:1) を等量加えて vortex によりよく攪拌し、15,000 rpm で 5 分間、室温で遠心する。

4) 上層 (水層) を新しいチューブに移し、等量の 5 M 酢酸アンモニウム (pH5.2) と 4 倍量の 100% エタノールを加えて転倒混和し、室温で 5 分間静置する。その後、室温で 15,000 rpm、10 分間遠心する。

5) 上清を取り除いた後、80% エタノール 100 μ l を加え、室温で 15,000 rpm、5 分間遠心する。80% エタノールをとり除いて乾燥させた後、RNase free water 10 μ l に溶解する。

6) OD_{260 nm} 測定*、15% ポリアクリルアミドゲル電気泳動による確認を行う。

* : OD_{260 nm} = 1.0 で 40 μ g/ml

<参考資料> RNAi 効果の確認

○ 293 細胞を用いてルシフェラーゼをターゲットとした RNAi 効果を調べた。なお、対照には A 社製 Dicer 分解物と合成 siRNA を用いた (図 3)。

ホタルルシフェラーゼ発現プラスミド、およびウミシイタケルシフェラーゼ発現プラスミドと共に、ホタルルシフェラーゼをターゲットとして調製した siRNA を、GeneJuice Transfection Reagent と RiboJuice siRNA Transfection Reagent を用いて、同時に 293 細胞にトランスフェクションした後、24 時間培養した。この細胞内で発現しているホタルルシフェラーゼの発現量を測定したものを以下に示す。プラスミド導入効率はウミシイタケルシフェラーゼの発現量で補正した。

なお、各サンプル濃度は、siRNA を細胞に添加した際の終濃度である (siRNA 1 分子 \div 22 bp \div mw 15,884 として計算)。

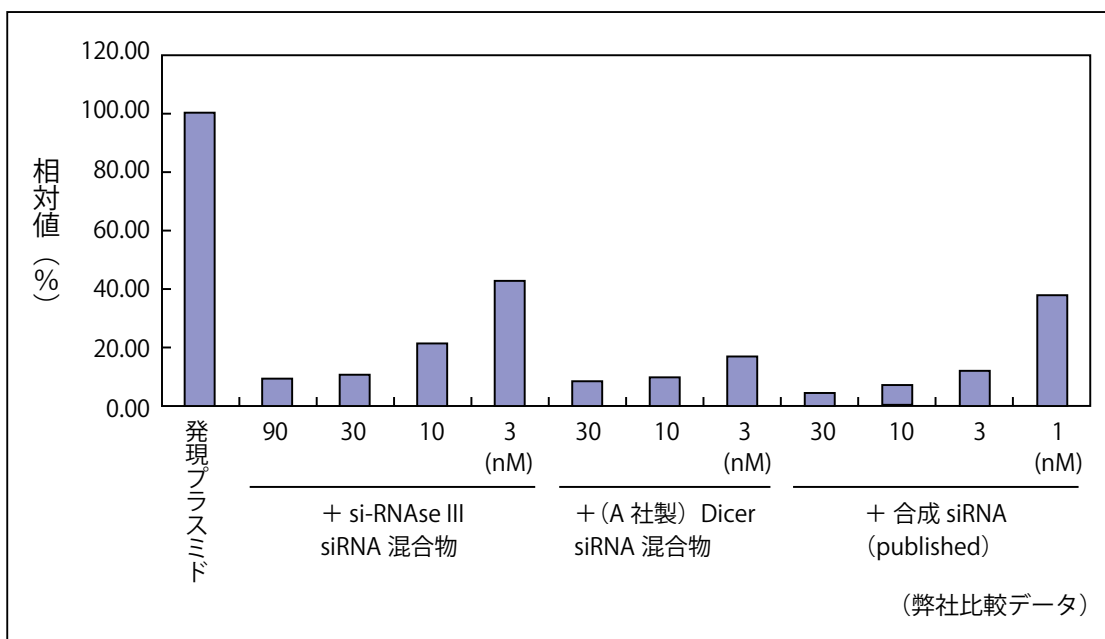


図 3. si-RNase III® 分解物のホタルルシフェラーゼ発現量に与える影響 (Dicer (A社製) 分解物、合成 siRNA との比較)

V. トラブルシューティング

1. 切断産物のサイズが小さい (10 bp 程度の切断産物の割合が高い)、または切断産物のサイズが大きい (50 bp 以上の切断産物の割合が高い)

- (1) 基質の配列や長さによっては、切断されにくい場合 (場合によっては、切断されやすい場合) が考えられます。この場合、切断時間を調整して条件設定を行ってください。例えば、切断産物のサイズが大きい (50 bp 以上の割合が高い) 場合、30°C で 2、3 時間反応、切断産物が小さい (10 bp 程度の割合が高い) 場合、30 分程度反応させてください。
- (2) 切断に用いた基質の純度が低く、本酵素以外の要因で dsRNA が切断された可能性があります。再度 dsRNA を合成し、電気泳動、吸光度で純度を確認した後、再度切断反応を行ってみてください。

2. 回収される siRNA の収量が少ない

- (1) 基質として用いた dsRNA が少ない可能性があります。吸光度による測定と電気泳動を行い、RNA 量を再確認してください。
- (2) 操作中の RNA 分解が考えられます。RNase free の環境下で操作を行うようにしてください (プラスミド調製など大量の RNase を使用する区画では行わないことをお勧めします)。

3. RNAi 効果が低い

- (1) siRNA の量が少ない可能性があります。吸光度による測定と電気泳動を行い、RNA 量を再確認してください。
- (2) 調製した siRNA の大きさの分布が RNAi に適していないことが考えられます。電気泳動による切断パターンの確認を行ない、50 bp 以上の高分子分解物の割合が高くないか、もしくは 10 bp 程度の低分子分解物の割合が高くないか確認してください。偏りが見られる場合、1. に従ってください。

VI. 参考文献

- 1) Milligan J.F., Groebe D.R., Witherell G.W., and Uhlenbeck O.C. (1987) *Nucl. Acids Res.*, **15**, 8783-8798.
- 2) Sun W. and Nicholson A.W. (2001) *Biochemistry*, **40**, 5102-5110.
- 3) Yang D., Buchholz F., Huang Z., Goga A., Chen C.Y., Brodsky F.M. and Bishop J.M. (2002) *Proc Natl Acad Sci USA*, **99**, 9942-9947.
- 4) Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K and Tuschl T. (2001) *Nature*, **411**, 494-498.

VII. 関連製品

ColdShock-DICER® (TmCspB and fragment of h-Dicer) (製品コード 2440A/B)
TaKaRa siRNA Cocktail Kit (ColdShock-DICER) (製品コード 6147)
in vitro Transcription T7 Kit (for siRNA Synthesis) (製品コード 6140)
Transcript RNA Clean Up Kit (製品コード 9097)

< dsRNA 電気泳動用サイズマーカー >
siRNA Ladder Marker (製品コード 3430)

< siRNA の transfection 用 >
TransIT-TKO® Transfection Reagent (製品コード MIR2150)
RiboJuice™ siRNA Transfection Reagent (製品コード 71115-3/71115-4)

TransIT®-TKO® は Mirus 社の製品です。
RiboJuice® は メルク社の製品です。

VIII. 注意

- ・本製品は研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- ・タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。

NOTICE TO PURCHASER: LIMITED LICENSE

[L17] His-Tag Sequence

This product is covered by the claims of U.S. Patent No. 4,877,830, 5,047,513, 5,284,933, 5,310,663 and their foreign counterpart patent claims.

[M23] si-RNase III

This product is the subject of the pending U.S. patent application and its foreign counterparts.

製品についての技術的なお問い合わせ先

TaKaRa テクニカルサポートライン

Tel 077-543-6116 Fax 077-543-1977

ホームページアドレス <http://www.takara-bio.co.jp/>

タカラバイオ株式会社