

製品コード 6142

研究用

Takara

**Synthetic siRNA
Quantitation Core Kit**

説明書

v202203Da

動物や細胞に siRNA を投与し RNA 干渉による特定遺伝子のノックダウン効果を検証することにより、医薬品としての siRNA の利用が検討されています。

本製品は合成 siRNA の定量を目的としたコアキットで、リアルタイム PCR 解析と組み合わせることにより、投与した合成 siRNA の残存量を、細胞、組織、血液などから抽出した total RNA をサンプルとして測定することができます。

siRNA を化学合成する際には、一般的に 3' 末端にデオキシチミン (dT) 2 塩基のオーバーハングを付加します。本製品では、この 3' オーバーハングにポリデオキシアデニン (ポリ dA) を付加した後、特別に設計した Oligo dT Primer を用いて逆転写反応を行うことにより、total RNA 存在下でも合成 siRNA 分子から相補的な cDNA を調製することができます。調製された cDNA を鋳型として、TB Green® *Premix Ex Taq*™ II (Tli RNaseH Plus) (製品コード RR820S/A/B) などを用いたインターカレーター法のリアルタイム PCR を行うことにより、合成 siRNA の高感度な定量を行います。

〈注意〉 本製品は、3' オーバーハングがデオキシチミン d (TT) である合成 siRNA の定量に使用できません。3' オーバーハングとして d (TT) 以外の DNA 配列が付加された合成 siRNA の場合、配列を変更した Oligo dT Primer を別途ご用意していただければ、本製品をご使用いただけます。3' オーバーハングの付加がない、または 3' オーバーハングが RNA である合成 siRNA の場合は、本製品をご使用いただけません。

I. 内容 (30 反応分) *1

1. Terminal Transferase Buffer	390 μ l
2. Terminal Transferase	30 μ l
3. dATP	150 μ l
4. Recombinant RNase Inhibitor	30 μ l
5. Oligo dT Primer *2	150 μ l
6. RT Buffer	270 μ l
7. RT Enzyme Mix	30 μ l
8. Universal Primer (10 μ M)	120 μ l
9. EASY Dilution (for Real Time PCR)	1 ml
10. Control siRNA (20 nM)	10 μ l
11. Control Primer (10 μ M)	20 μ l

* 1 : poly dA tailing および逆転写反応 30 反応分、リアルタイム PCR 用 Universal Primer 120 反応分を含みます。

* 2 : 本製品用に設計した Oligo dT Primer です。

本製品以外に必要な試薬、機器 (主なもの)

- リアルタイム PCR 用増幅装置および専用チューブ、専用プレート
 - Thermal Cycler Dice® Real Time System II (製品コード T900/T960 : 終売)
 - CronoSTAR™ 96 Real-Time PCR System (製品コード 640231/640232)
 - CronoSTAR Portable Real-Time PCR System (製品コード 640245/640247/640249)
- リアルタイム PCR 用 siRNA 配列特異的プライマー (VI-2. 参照)
- リアルタイム PCR 試薬
 - 本製品と組み合わせ可能なリアルタイム PCR 関連製品
 - TB Green *Premix Ex Taq* II (Tli RNaseH Plus) (製品コード RR820S/A/B)
 - TB Green *Premix Ex Taq* (Tli RNaseH Plus) (製品コード RR420S/A/B)
- 0.2 ml マイクロチューブ (PCR チューブ)
- マイクロピペットおよびチップ (オートクレーブ処理したもの)
- RNA 抽出キット
 - RNAiso Plus (製品コード 9108/9109) など

II. 保存 - 20°C

III. 原理

III-1. 合成 siRNA からの cDNA 調製

1. poly dA tailing 反応

合成 siRNA を熱変性により一本鎖にし、合成 siRNA の 3' 末端に付加されているデオキシチミン d (TT) にポリ dA を付加します。

合成 siRNA (熱変性済み)

5' - センス鎖 TT - 3'

5' - アンチセンス鎖 TT - 3'

T: デオキシチミン

↓ poly dA tailing 反応

センス鎖 T T A A A A A A A A

アンチセンス鎖 T T A A A A A A A A

2. 逆転写反応

付加されたポリ dA 配列に Oligo dT Primer をアニーリングさせた後、逆転写反応を行います。この Oligo dT Primer には、後のリアルタイム PCR を行う際に利用される Universal 配列が付加されています。



5' センス鎖 T T A A A A A A A A
A A T T T T T T T T Universal 配列 5'

5' アンチセンス鎖 T T A A A A A A A A
A A T T T T T T T T Universal 配列 5'

↓ 逆転写反応

センス鎖 T T A A A A A A A A
— センス鎖 (相補配列) — A A T T T T T T T T Universal 配列

アンチセンス鎖 T T A A A A A A A A
— アンチセンス鎖 (相補配列) — A A T T T T T T T T Universal 配列

<注意> 本製品の Oligo dT Primer は、3' オーバーハングが d (TT) である合成 siRNA 用に設計されたものです。3' オーバーハングとして d (TT) 以外の DNA 配列が付加された siRNA の場合、配列を変更した Oligo dT Primer を別途ご用意していただく必要があります。配列については、弊社テクニカルサポートラインまでお問い合わせください。

III-2. リアルタイム PCR による定量

調製された cDNA を鋳型として、TB Green *Premix Ex Taq* II (Tli RNaseH Plus) (製品コード RR820S/A/B)*¹ を用いてリアルタイム PCR を行います。増幅には Universal Primer*² と siRNA 配列特異的プライマー*¹ を使用します。TB Green *Premix Ex Taq* II (Tli RNaseH Plus) では、Hot Start PCR 用酵素 *TaKaRa Ex Taq*® HS を使用しリアルタイム PCR を行うため、反応液調製時の非特異的増幅による影響の少ない、高感度な定量 PCR が可能です。

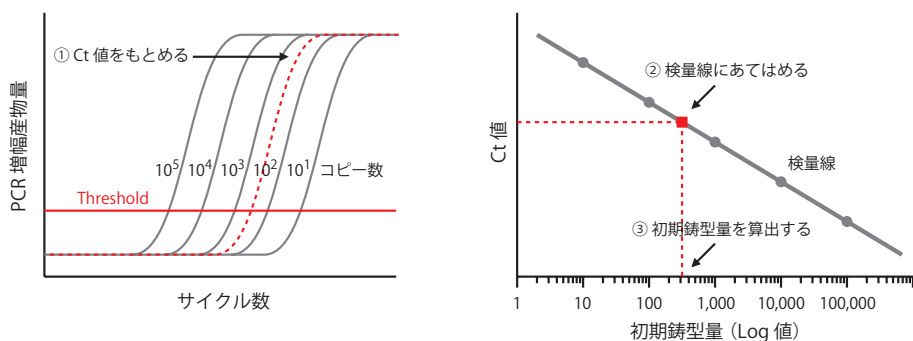
* 1：別途ご用意ください。

* 2：本製品に含まれています。

[リアルタイム PCR による定量の原理]

リアルタイム PCR では、PCR 増幅産物がある一定量に達したときのサイクル数 (Ct 値：Threshold Cycle) により定量解析を行います。Ct 値と初期鋳型量の間には直線関係があり、段階希釈したスタンダードを鋳型として反応すると、図のような検量線を作成することができます。未知サンプルについても同様に Ct 値をもとめ、この検量線にあてはめて初期鋳型量を算出できます。この一連の解析は、リアルタイム PCR 装置付属のソフトウェアで自動的に行われます。

<初期鋳型量が未知のサンプルの定量方法>



IV. 使用上の注意

本製品を使用する場合の注意事項です。使用前に必ずお読みください。

- (1) 反応液は、必要本数 + α のマスターミックス (バッファー、酵素等の混液) をまとめて調製すると便利です。マスターミックスを作ることにより、ピペッティングによるロスや、試薬の分注、攪拌回数が少なくなり、正確な試薬分注を行うことができます。その結果、実験間のデータのばらつきも防げます。
- (2) Terminal Transferase、Recombinant RNase Inhibitor、RT Enzyme Mix は、使用前に軽く遠心して、溶液をチューブの底に落としてください。酵素は 50%グリセロール溶液で粘度が高いため、注意深くゆっくりとピペッティングを行ってください。
- (3) 試薬の分注を行うときは必ず新しいディスポーザブルチップを用い、サンプル間のコンタミネーションを防止してください。
- (4) より良い定量結果を得るために、各温度でのインキュベーションにはあらかじめウォームアップしたサーマルサイクラーを使用してください。

[リアルタイム PCR による定量の注意事項]

(1) 検量線

スタンダードサンプルの希釈系列により得られた検量線は、未知サンプルの定量に適用できるだけでなく、PCR 増幅効率や定量可能範囲など、有用な情報を得ることができます。検量線を評価するポイントは、傾きと直線性です。

- ・ 傾きからは PCR 増幅効率を計算することができ、80 ~ 120% が適正範囲とされています。
- ・ 直線性は、相関係数 (R2) で評価し、その値が 0.98 以上であることがもとめられます。低濃度あるいは高濃度のポイントが直線からはずれる場合には、それらのポイントを除いて相関係数が 0.98 以上になるようにしてください。

PCR 増幅効率および相関係数 (R2) の解析は、リアルタイム PCR 装置付属のソフトウェアで自動的に行われます。

(2) スタンダードサンプルの希釈

標準とする合成 siRNA を適当な希釈率で 5 ~ 7 段階に希釈してください。信頼性が高い検量線作成のためには少なくとも 5 段階の濃度で目的 siRNA を検出できることがもとめられます。

【例：スタンダードサンプルの希釈】

- ・ 1 : 10 の希釈率で 6 段階
例) 2 nM, 200 pM, 20 pM, 2 pM, 200 fM, 20 fM
- ・ 1 : 5 の希釈倍率で 6 段階
例) 2 nM, 400 pM, 80 pM, 16 pM, 3.2 pM, 640 fM

適切な検量線の作成には、合成 siRNA を低濃度まで正確に希釈することが重要です。製品添付の EASY Dilution (for Real Time PCR) を希釈に用いることで低濃度まで正確に希釈でき、幅広いレンジで検量線の作成が行えます。(水や TE バッファーで希釈すると特に低濃度の希釈が不安定となり、利用できる検量線のレンジが狭くなる場合があります。)

(3) siRNA 特異的プライマーの反応性確認

初めて使用するプライマーについてはあらかじめ反応性の確認を行ってください。

- ・ ターゲットとなる合成 siRNA の希釈系列を作製し、本製品により cDNA を調製後リアルタイム PCR を行い、PCR 増幅効率と非特異増幅の有無および定量可能範囲をご確認ください。この時得られる増幅効率は、poly dA tailing 反応、逆転写反応が影響するため、70 ~ 120% が適正範囲になります。
- ・ ターゲットとなる合成 siRNA を用いて、本製品により cDNA を調製後、cDNA の希釈系列を作製し、リアルタイム PCR を行い、PCR 増幅効率と非特異増幅の有無をご確認ください。
- ・ 反応性を確認する際には、必ず No Template Control (NTC) の反応を同時に行い、プライマーダイマーや非特異増幅の有無をご確認ください。
- ・ 合成 siRNA を含まない total RNA を使用し、本製品により cDNA を調製後、リアルタイム PCR を行い、total RNA 由来の増幅が無いことをご確認ください。増幅が起こった場合には、融解曲線分析により、この増幅産物が合成 siRNA から調製した cDNA に由来する増幅産物と区別可能かどうかを確認してください。

[RNA 取扱いの際の一般的な注意事項]

- ・市販の滅菌ディスポーザブルプラスチック器具類は通常 RNase フリーとしてそのまま実験に用いてもさしつかえありませんが、マイクロ遠心チューブやマイクロピペット用チップなどはオートクレーブ処理を行った後使用してください。
- ・ガラス器具、スパーテルなどを用いる場合には、乾熱滅菌 (160°C、2 時間以上) を行ってください。乾熱滅菌できないものは、0.1% ジエチルピロカーボネート (DEPC) 溶液で 37°C、12 時間処理した後、オートクレーブ処理を行ってから用いてください (DEPC による RNA のカルボキシメチル化の防止のため)。
- RNA 実験用の器具類は他と明確に区別しておく必要があります。
- ・RNase が混入する最も大きな要因は、実験者からの持ち込みです。RNA を用いた実験を行う際には必ず使い捨てのプラスチック手袋とマスクを着用してください。

V. 操作

V-1. RNA の抽出・精製

合成 siRNA 投与後の細胞、組織、血液などから、RNAiso Plus (製品コード 9108/9109) などの RNA 抽出キットを用いて、total RNA を抽出・精製する。^{*1}

* 1 : small RNA を精製可能な RNA 調製試薬を使用してください。

V-2. 熱変性

1) 下記に示すサンプルを氷上で調製する。

dATP を 5 μ l ずつ必要本数の反応チューブに分注した後、合成 siRNA サンプル (V-1. で調製した total RNA ^{*2}、合成 siRNA 希釈液など) を 5 μ l 添加する。

試薬	使用量
dATP	5 μ l
合成 siRNA サンプル	5 μ l
Total	10 μ l

* 2 : total RNA の持ち込み量は ~ 200 ng までとする。

2) 1) の反応液を 75°C、5 分^{*3} インキュベートした後、氷上で急冷する。熱変性後は速やかに poly dA tailing 反応を行う。^{*4}

* 3 : 熱処理の温度条件は、siRNA の配列により異なるため、良好な定量結果が得られない場合、70 ~ 80°C の範囲でお試してください。

* 4 : 熱変性した siRNA の再アニーリングを防ぐため、氷上放置は 15 分間以内とし、速やかに次の poly dA tailing 反応を行ってください。

V-3. poly dA tailing 反応

- 1) 下記に示す反応液を氷上で調製する。

「熱変性済みサンプル」以外のコンポーネントを(必要本数+ α)分調製し、マスターミックス 15 μ l ずつを「熱変性済みサンプル」10 μ l に添加する。サンプル間のコンタミネーションに注意する。

試薬	使用量
Terminal Transferase Buffer	13 μ l
Recombinant RNase Inhibitor	1 μ l
Terminal Transferase	1 μ l
熱変性済みサンプル	10 μ l
Total	25 μ l

- 2) 反応液を軽く攪拌して均一にした後、反応を行う。

37°C 30分
4°C

V-4. Oligo dT Primer のアニーリング

- 1) 下記に示す反応液を氷上で調製する。

Oligo dT Primer を 5 μ l ずつ反応チューブに分注した後、V-3. で調製した poly dA tailing 反応液を 5 μ l 添加する。

試薬	使用量
Oligo dT Primer	5 μ l
poly dA tailing 反応液	5 μ l
Total	10 μ l

- 2) 75°C、5分インキュベートした後、氷上で急冷する。アニーリング反応後は速やかに逆転写反応を行う。

V-5. 逆転写反応

- 1) 下記に示す反応液を氷上で調製する。

「アニーリング反応液」以外のコンポーネントを(必要本数+ α)分調製し、マスターミックス 10 μ l ずつを「アニーリング反応液」に添加する。サンプル間のコンタミネーションに注意する。

試薬	使用量
RT Buffer	9 μ l
RT Enzyme Mix	1 μ l
アニーリング反応液	10 μ l
Total	20 μ l

- 2) 反応液を軽く攪拌し均一にした後、逆転写反応を行う。

42°C 15分(逆転写反応)
85°C 5秒(逆転写酵素の失活)
4°C

V-6. リアルタイム PCR を行う。(VI. Appendix 参照)

VI. Appendix

VI-1. TB Green *Premix Ex Taq* II (Tli RNaseH Plus) (製品コード RR820S/A/B) を用いたリアルタイム PCR 反応の例 (Thermal Cycler Dice Real Time System II (終売) を用いる場合)

- 1) 下記に示す反応液を氷上で調製する。

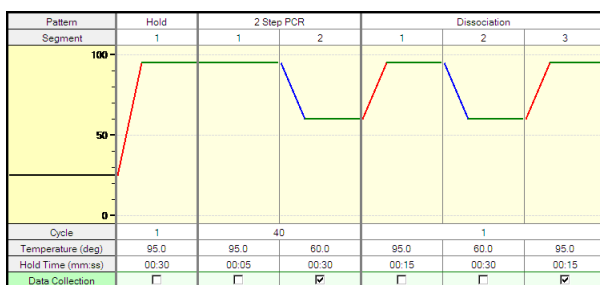
< 1 反応あたり >

試薬	使用量	最終濃度
TB Green <i>Premix Ex Taq</i> II (2 ×)	12.5 μl	1 ×
Universal Primer (10 μM)	1.0 μl	0.4 μM *1
siRNA qPCR Primer*2 (10 μM)	1.0 μl	0.4 μM *1
逆転写反応液	2.0 μl *3	
滅菌精製水	8.5 μl	
Total	25 μl *4	

- * 1 : 最終プライマー濃度は 0.4 μM で良い結果が得られることが多いが、反応性に問題があるときは 0.2 ~ 1.0 μM の範囲で最適な濃度を検討すると良い。
- * 2 : 定量する合成 siRNA に特異的なプライマーをご用意ください。プライマーの設計方法は VI-2. を参照してください。Control siRNA より調製した cDNA を鋳型とする場合は Control Primer を使用してください。
- * 3 : 逆転写反応液の持ち込みは、PCR 反応液容量の 10% 以下としてください。
- * 4 : 反応液量は 25 μl を推奨。

- 2) 上記の反応液をよく混合し、反応チューブまたはプレートを遠心機で軽く遠心後、Thermal Cycler Dice Real Time System II (終売) にセットし、反応を開始する。*5

- * 5 : PCR 反応は、下記のシャトル PCR 標準プロトコールで行うことをお勧めします。まずはこのプロトコールを試し、必要に応じて PCR 条件を至適化してください。至適化する場合は、TB Green *Premix Ex Taq* II の説明書に記載されている「実験条件の選び方」をご確認ください。



シャトル PCR 標準プロトコール

Pattern 1 : (初期変性)

Hold
95°C 30 秒

Pattern 2 : PCR 反応

Cycles : 40
95°C 5 秒

60°C 30~60 秒

Pattern 3 : Dissociation

※使用上の注意

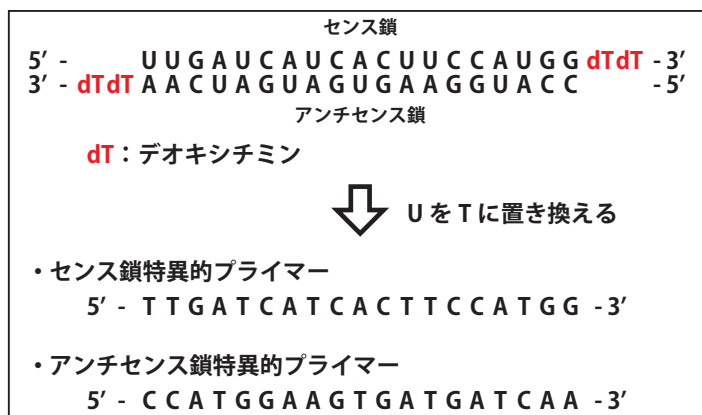
TaKaRa *Ex Taq* HS はポリメラーゼ活性を抑制する抗 *Taq* 抗体を利用したホットスタート PCR 用酵素です。他社の化学修飾タイプのホットスタート PCR 酵素で必要な PCR 反応前の 95°C、(5 ~) 15 分の活性化ステップは行わないでください。必要以上の熱処理を加えると酵素活性が低下し、増幅効率、定量精度に影響を及ぼす傾向があります。PCR 反応前に鋳型の初期変性を行なうには、通常 95°C 30 秒で十分です。

- 3) 反応終了後、増幅曲線と融解曲線を確認し、定量を行う場合は検量線を作成する。*6

- * 6 : 解析方法の詳細は、Thermal Cycler Dice Real Time System II (終売) の取扱説明書を参照してください。

VI-2. リアルタイム PCR 用 siRNA 配列特異的プライマーの設計方法

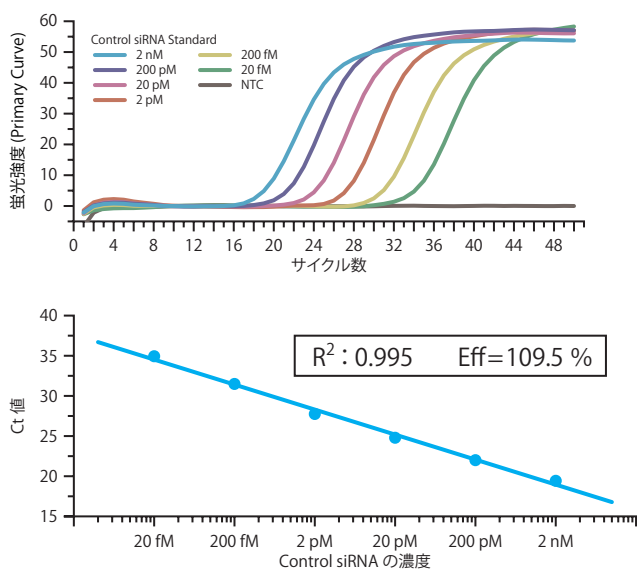
3' オーバーハングを除いた siRNA 配列で、ウラシル (U) をチミン (T) に置き換えた配列をリアルタイム PCR 用プライマーとして使用します (下図参照)。アンチセンス鎖特異的プライマーまたはセンス鎖特異的プライマーを設計します。設計したプライマーを用いて、あらかじめリアルタイム PCR を行なって検量線を確認し、非特異的増幅が見られず、十分な定量範囲が得られることをご確認ください。



リアルタイム PCR 用プライマーの設計例

VI-3. Control siRNA の検量線作成例

EASY Dilution (for Real Time) を用いて、Control siRNA の 2 nM から 20 fM までの 10 倍希釈系列を作製し、本製品の操作例に従って cDNA を調製しました。調製した cDNA を鋳型に TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) を使用してリアルタイム PCR を行い、検量線を作成しました。



VI-4. Synthetic siRNA Quantitation Core Kit による合成 siRNA 定量操作フロー

dATP を 5 μ l ずつ反応チューブに分注し、1 反応あたり 5 μ l の合成 siRNA サンプル (total RNA、合成 siRNA 希釈液など) を添加する

75 $^{\circ}$ C 5 分 (サンプル熱変性)

氷上で急冷

【 Master Mix 】

< 1 反応あたり >

- Terminal Transferase Buffer 13 μ l
- Recombinant RNase Inhibitor 1 μ l
- Terminal Transferase 1 μ l

1 反応あたり Master Mix を 15 μ l ずつ熱変性済みサンプルに添加する
(サンプル間のコンタミネーションに気をつける)

37 $^{\circ}$ C 30 分 (poly dA tailing 反応)
4 $^{\circ}$ C

Oligo dT Primer を 5 μ l ずつ反応チューブに分注し、1 反応あたり 5 μ l の poly dA tailing 反応液を添加する

75 $^{\circ}$ C 5 分 (Oligo dT Primer アニール)

【 Master Mix 】

< 1 反応あたり >

- RT Buffer 9 μ l
- RT Enzyme Mix 1 μ l

1 反応あたり Master Mix を 10 μ l ずつアニール反応液に添加する
(サンプル間のコンタミネーションに気をつける)

42 $^{\circ}$ C 15 分 (逆転写反応)

85 $^{\circ}$ C 5 秒 (逆転写酵素を熱失活させる)
4 $^{\circ}$ C

鋳型 DNA

リアルタイム PCR

(Thermal Cycler Dice Real Time System II: 終売)

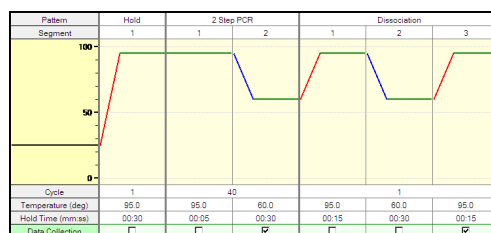
TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus)

【 Master Mix 】

< 1 反応あたり >

- 滅菌精製水 8.5 μ l
- Universal Primer (10 μ M) 1 μ l
- siRNA qPCR Primer (10 μ M) 1 μ l
- TB Green Premix Ex Taq II (2 \times) 12.5 μ l

Master Mix を 23 μ l ずつ反応チューブに分注し、1 反応あたり 2 μ l の逆転写反応液を添加する



反応を開始する

Pattern 1 : (初期変性)

Hold
95 $^{\circ}$ C 30 秒

Pattern 2 : PCR 反応

Cycles : 40
95 $^{\circ}$ C 5 秒
60 $^{\circ}$ C 30 ~ 60 秒

Pattern 3 : Dissociation

反応終了後、解析を行う

VII. 実験例

VII-1. マウス血液中の合成 siRNA 定量モデル実験

【方法】

マウス全血 50 μ l (抗凝固剤：クエン酸ナトリウム) に 10 amol、1 fmol、100 fmol の Control siRNA を添加した後、RNAiso Plus (製品コード 9108) および Gen とるくん™ エタ沈キャリア (製品コード 9094) を用いて total RNA を調製した (ペレットは 50 μ l に溶解)。本製品および TB Green Premix Ex Taq II (Perfect Real Time)*¹ を用いてリアルタイム PCR を行い、Control siRNA を定量した。

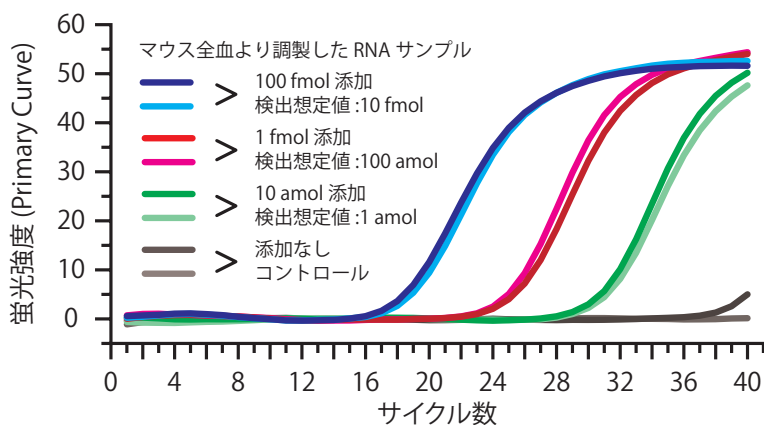
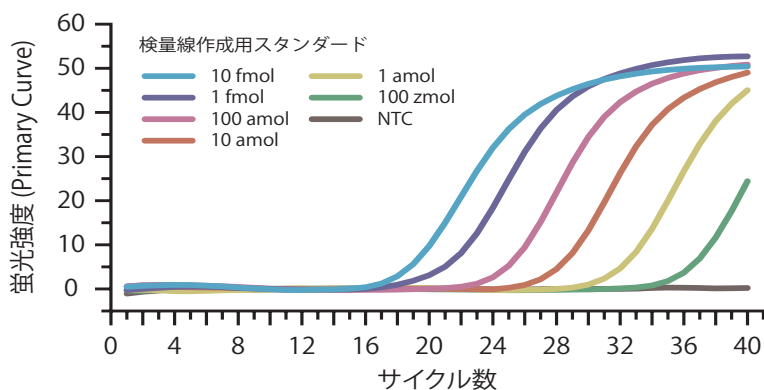
* 1：本実験では製品コード RR081A を使用。

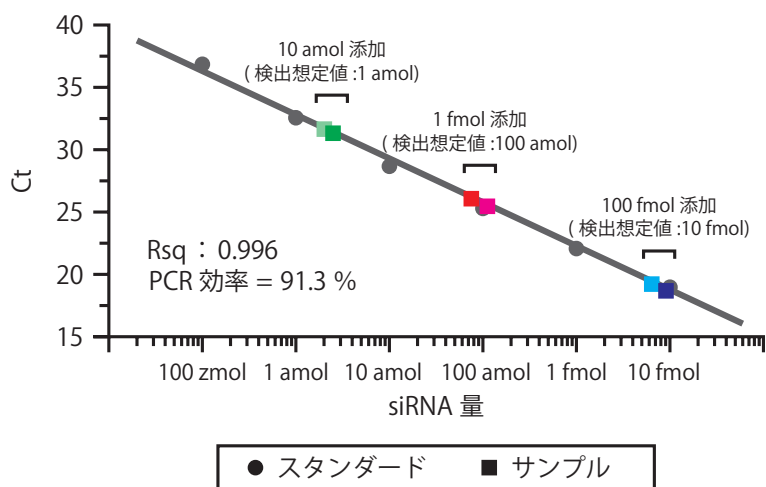
現在は、RR081A/B のバージョンアップ製品である RR820S/A/B の使用を推奨しています。

※ 血液からの total RNA 抽出操作の詳細は弊社ウェブカタログをご参照ください。

【結果】

添加量に対応した定量結果が得られました。





添加量	検出想定値	全血サンプル	
		Ct	定量結果
100 fmol	10 fmol	18.68	9.07 fmol
		19.22	6.39 fmol
1 fmol	100 amol	26.07	75.2 amol
		25.46	111.2 amol
10 amol	1 amol	31.32	2.50 amol
		31.65	2.02 amol

VII-2. 培養細胞にトランスフェクションした合成 siRNA の定量

培養細胞に合成 siRNA をトランスフェクションし、RNAi 効果を確認しました。さらにトランスフェクションした培養細胞から total RNA を調製し、本製品を用いて合成 siRNA 残存量を定量しました。

【方法】

24 ウェルプレートに HEK293 細胞を 1×10^5 cells/ウェルで播種し、約 24 時間培養した後、TransIT-LT1 により分泌型ルシフェラーゼ (MetLuc2) 発現ベクター pMetLuc2-Control (500 ng) を、TransIT-TKO により MetLuc2 遺伝子の発現をノックダウンする MetLuc2 siRNA (7.5 pmol) を Co-transfection した (2 連で実施)。

24 時間後、培養上清を回収して分泌されたルシフェラーゼの発光を測定し、各細胞より RNA サンプルを 50 μ l 調製した。^{*1}

その後、EASY Dilution (for Real Time) により 100 倍希釈し、測定サンプルとして 5 μ l を使用し、本製品の操作に従って cDNA を調製した。調製した cDNA を鋳型に、TB Green Premix Ex Taq II (Perfect Real Time)^{*2} およびアンチセンス鎖特異的なプライマーを使用してリアルタイム PCR を行い、MetLuc2 siRNA の定量を行った。

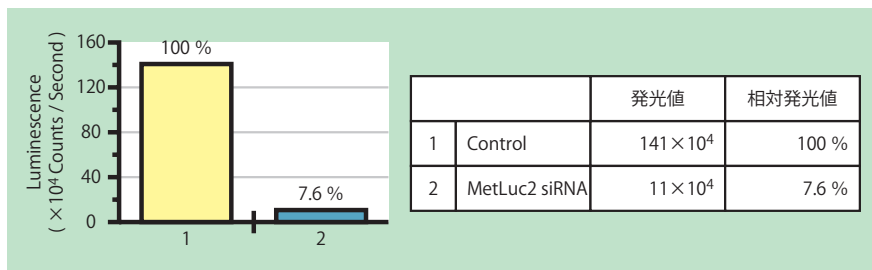
* 1 : RNA 抽出時の siRNA の回収率を求めるため、ホモジナイズした細胞に既知量の内部標準 siRNA (1 pmol) を添加した。

* 2 : 製品コード RR081A (終売) を使用。

【結果】

・ノックダウン効果の確認（発光測定）

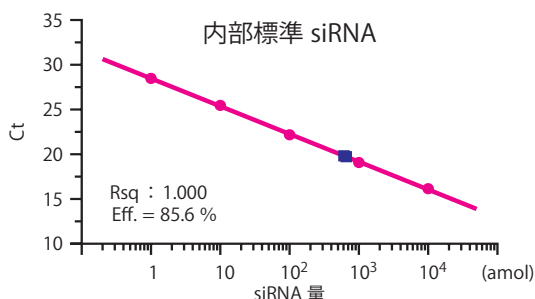
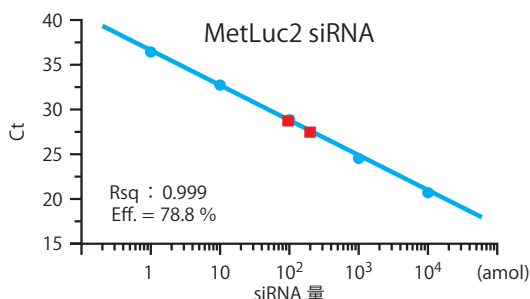
Control には非特異的な配列を持つ合成 siRNA をトランスフェクションした細胞を使用しました。MetLuc2 siRNA をトランスフェクションした細胞の発光値は Control の発光値と比較して、平均 7.6%（ウェル 1：7.8%、ウェル 2：7.4%）となり、RNAi によるノックダウン効果を確認することができました。



・MetLuc2 siRNA の定量（リアルタイム PCR の結果）

MetLuc2 siRNA および内部標準 siRNA の 10 倍希釈系列を使用して検量線を作成し、MetLuc2 siRNA および内部標準 siRNA を定量したところ、以下の結果が得られました。

	既知量	MetLuc2 siRNA		内部標準 siRNA	
		Ct	定量結果	Ct	定量結果
スタンダード 1	10 fmol	20.71	—	17.38	—
スタンダード 2	1 fmol	24.53	—	20.89	—
スタンダード 3	100 amol	28.85	—	24.61	—
スタンダード 4	10 amol	32.73	—	28.55	—
スタンダード 5	1 amol	36.43	—	32.17	—
サンプル (ウェル1)	—	28.73	96 amol	21.79	610 amol
サンプル (ウェル2)	—	27.47	199 amol	21.67	657 amol



● スタンダード ■ サンプル

RNA 調製時に添加した内部標準 siRNA の定量値から、以下の計算式に従って、siRNA の回収率をもとめました。

サンプル (ウェル 1) の場合：

$$\begin{array}{c}
 \begin{array}{l} \text{リアルタイム PCR により} \\ \text{得られた内部標準 siRNA の定量値} \end{array} & \begin{array}{l} \text{RNA サンプル} \\ \text{の希釈倍率} \end{array} & \begin{array}{l} \text{細胞より} \\ \text{調製した RNA 量} \end{array} \\
 \swarrow & \swarrow & \swarrow \\
 \boxed{\text{siRNA}} & = & \frac{610 \text{ amol} \times 100 \times 50}{5 \times 1 \text{ pmol}} \times 100 = 61.0 (\%) \\
 \text{の回収率} & & \\
 \begin{array}{l} \text{本製品に使用した} \\ \text{RNA サンプル量} \end{array} & \begin{array}{l} \text{内部標準 siRNA} \\ \text{の添加量} \end{array}
 \end{array}$$

リアルタイム PCR により得られた MetLuc2 siRNA の定量値および siRNA の回収率 (上記より、培養細胞に残存している MetLuc2 siRNA の量をもとめました。

サンプル (ウェル 1) の場合：

$$\begin{array}{c}
 \begin{array}{l} \text{リアルタイム PCR により} \\ \text{得られた MetLuc2 siRNA の定量値} \end{array} & \begin{array}{l} \text{RNA サンプル} \\ \text{の希釈倍率} \end{array} & \begin{array}{l} \text{細胞より} \\ \text{調製した RNA 量} \end{array} \\
 \swarrow & \swarrow & \swarrow \\
 \boxed{\text{MetLuc2 siRNA}} & = & \frac{96 \text{ amol} \times 100 \times 50}{5 \times 61.0/100} = 157 \text{ fmol} \\
 \text{定量結果} & & \\
 \begin{array}{l} \text{本製品に使用した} \\ \text{RNA サンプル量} \end{array} & \begin{array}{l} \text{siRNA の回収率} \end{array}
 \end{array}$$

これらの結果より、MetLuc2 siRNA 残存量はサンプル (ウェル 1) では 157 fmol、サンプル (ウェル 2) では 303 fmol となりました。

IX. トラブルシューティング

1. リアルタイム PCR で増幅が見られない
 - 3' 末端にデオキシチミンのオーバーハング d (TT) が付加された合成 siRNA であることを確認してください。
 - サンプル RNA の調製法に問題がないか確認してください。
一般的なスピニングカラムを利用した total RNA 調製キットなどは、通常、合成 siRNA のような低分子 RNA の回収には不向きです。合成 siRNA の回収を目的とした RNA 調製は、RNAiso Plus あるいは NucleoSpin miRNA など市販の small RNA 精製キットをご使用ください。
 - リアルタイム PCR 用プライマーの配列を確認してください。
VI-2. を参照し、プライマーが正しく設計されているかご確認ください。
2. PCR 増幅効率が悪い
 - 良好な定量結果を得るためには、poly dA tailing 反応前のサンプル熱変性は必ず行ってください。サンプル熱変性の温度条件は siRNA の配列により異なるため 70 ~ 80°C の範囲でお試してください。また、熱変性した siRNA の再アニーリングを防ぐため、氷上放置は 15 分までとし、すみやかに次の poly dA tailing 反応に進んでください。
 - ターゲットとなる合成 siRNA で希釈系列を作製し、本製品により cDNA を調製後、リアルタイム PCR を行い、十分な PCR 増幅効率が得られることを確認してください。この時に得られる増幅効率は、poly dA tailing 反応、逆転写反応が影響するため、70 ~ 120% が適正範囲になります。
 - ターゲットとなる合成 siRNA から、本製品により cDNA を調製後、cDNA の希釈系列を作製し、リアルタイム PCR を行い、十分な PCR 増幅効率が得られることを確認してください。この時得られる増幅効率は 80 ~ 120% が適正範囲になります。
 - リアルタイム PCR 試薬として、増幅効率と反応特異性のバランスが取れた汎用性の高い TB Green *Premix Ex Taq* II (Tli RNaseH Plus) (製品コード RR820S/A/B) をお勧めします。やや増幅しにくい配列では TB Green *Premix Ex Taq* (Tli RNaseH Plus) (製品コード RR420S/A/B) を使用することにより増幅効率が向上する場合があります。
3. 非特異増幅がおこる
 - 合成 siRNA や cDNA を添加しない No Template Control によるリアルタイム PCR を実施し、非特異増幅がおこらないことを確認してください。
 - 合成 siRNA の濃度が低いサンプルから試薬を添加するなどの工夫により、サンプル間のコンタミネーションをできるだけ防ぐことが重要です。
 - 合成 siRNA の配列によっては、非特異増幅が生じやすい場合があります。

X. 参考文献

- 1) 吉崎美和、向井博之 (2005) 実験医学別冊 バイオ実験で失敗しない! 「検出と定量のコツ」 第3章 核酸の検出と定量のコツ 4. リアルタイム定量 PCR のコツ p120-126
- 2) 吉崎美和、向井博之 (2008) 実験医学別冊 原理からよくわかる「リアルタイム PCR 実験ガイド」[3] 1) リアルタイム RT-PCR 法による遺伝子発現解析 p39-43

XI. 関連製品

< RNA 抽出試薬など >

NucleoSpin miRNA (製品コード 740971.10/.50/.250)

RNAiso Plus (製品コード 9108/9109)

Gen とるくん™ エタ沈キャリア (製品コード 9094)

< リアルタイム PCR 試薬・装置 >

TB Green® *Premix Ex Taq*™ II (Tli RNaseH Plus) (製品コード RR820S/A/B)

TB Green® *Premix Ex Taq*™ (Tli RNaseH Plus) (製品コード RR420S/A/B)

CronoSTAR™ 96 Real-Time PCR System (製品コード 640231/640232)

CronoSTAR™ Portable Real-Time PCR System (製品コード 640245/640247/640249)

< 本製品 (製品コード 6142) と RR820A のセット品 >

Synthetic siRNA Quantitation Kit (with TB Green® *Premix Ex Taq*™ II Tli)

(製品コード RR861A)

< siRNA 導入試薬 >

TransIT-TKO Transfection Reagent (製品コード MIR2150)

XII. 注意

- ・本製品は研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断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。
- ・ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- ・TB Green、Thermal Cycler Dice、*TaKaRa Ex Taq* はタカラバイオ株式会社の登録商標です。*Premix Ex Taq*、Gen とるくん、CronoSTAR はタカラバイオ株式会社の商標です。その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先

テクニカルサポートライン

Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995

ウェブサイト <https://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社