

研究用

---

**TaKaRa**

**ColdShock-DICER<sup>®</sup>**  
(TmCspB and fragment of h-Dicer)

---

説明書

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。ヒト由来の Dicer は、既にクローニングと発現が行われており、組換え体を用いた酵素特性についても解析が進行中です。また、組換え体 Dicer 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。この siRNA 混合物には多種類の siRNA が含まれており、特定の siRNA 配列をデザインする必要もなく、より簡便に、しかも効率よく RNAi 実験を行うことができます。タカラバイオが開発した ColdShock-DICER は、ヒト由来 Dicer の変異体タンパク質と、dsRNA 切断時の効率を上昇させるコールドショックタンパク質 (*Thermotoga maritima* 由来) を混合したもので、300 ～ 1,000 bp の長鎖 dsRNA を効率よく分解し、RNAi 実験に適した約 21 mer の siRNA 混合物を作製することが可能です (図 1、2 参照)。

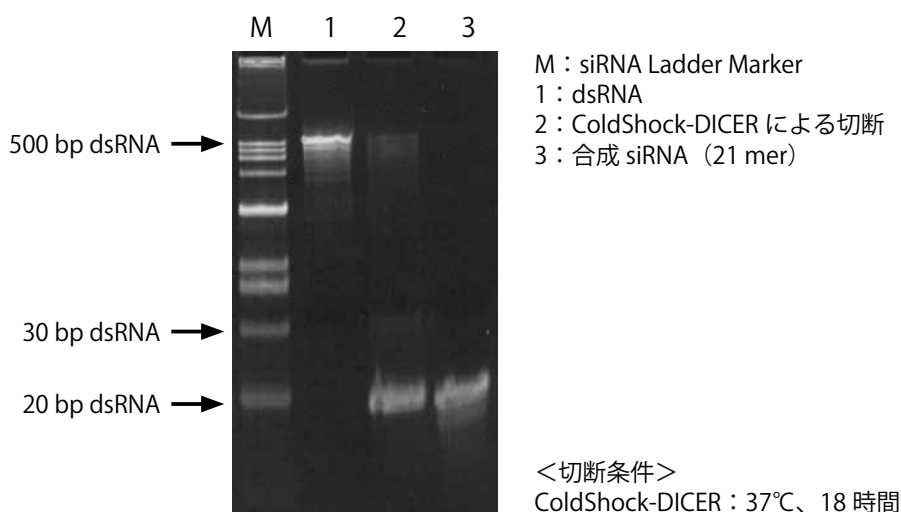


図 1. ColdShock-DICER による長鎖 dsRNA (約 500 bp) の切断結果

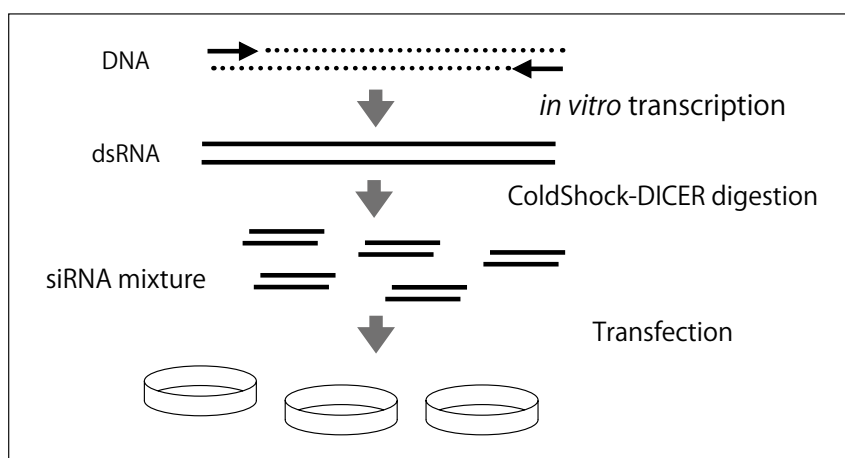


図 2. ColdShock-DICER 分解物を用いた RNAi

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

## II. 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℃凍結保存品です。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。

## III. 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 *in vitro* Transcription T7 Kit (for siRNA Synthesis)（製品コード 6140）を使用した一例を紹介します（詳細は添付の取扱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。

\*： T7 プロモーター配列：矢印が示す太文字の G より transcript RNA が合成されていきます。

TAATACGACTCACTATA**G**GGAGA



#### (1) PCR による鋳型 DNA の調製（図 3）

- 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。

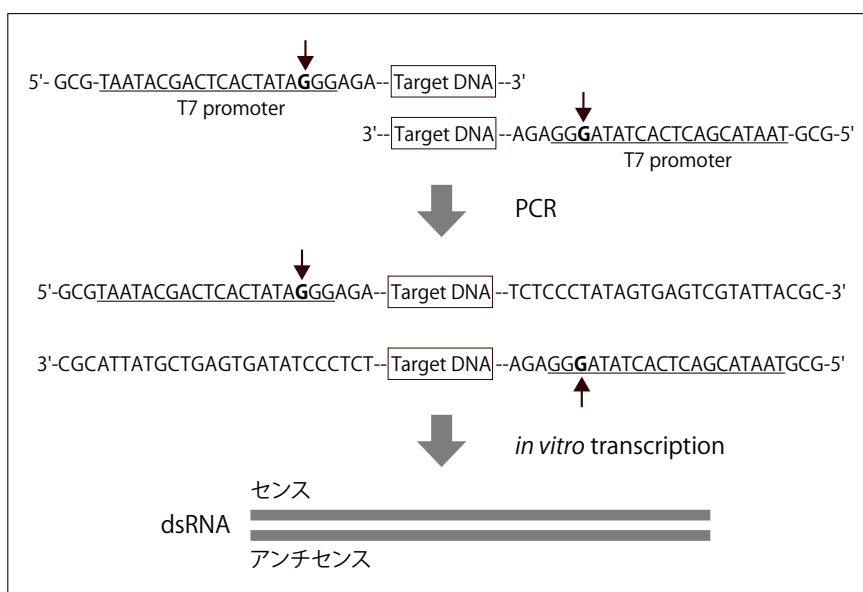


図 3. PCR による鋳型 DNA の調製

(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
linear template DNA	20 ng ~ 1 μg
RNase free dH <sub>2</sub> O	up to 20 μl

2) 42℃で 1 ~ 2 時間反応を行う。

(3) アニーリング操作

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

(4) DNase 処理

- 1) アニーリング操作後、10 ~ 20 U/20 μl 反応液となるように RNase freeDNase I を加え混和する。
- 2) 37℃で 30 分間反応を行う。

---

## 【2】 dsRNA の精製

- (1) 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（反応液の volume が 100  $\mu$ l より少ない場合、RNase free dH<sub>2</sub>O を加えて、全量を 100  $\mu$ l とすると取り扱いが容易になる）
  - 1) 等量の酸性フェノール／クロロホルム／イソアミルアルコール（25：24：1）を加えて vortex によりよく攪拌し、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／イソプロパノール（24：1）を等量加えて vortex によりよく攪拌し、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 3 M 酢酸ナトリウム（pH5.2）、等量のイソプロパノールを加えてよく攪拌する。
  - 4) 室温で 5 分間おいた後、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 TEbuffer）に溶解する。
  - 7) OD<sub>260 nm</sub> 測定\*、アガロースゲル電気泳動による確認を行う。  
\*：OD<sub>260 nm</sub> = 1.0 で 40  $\mu$ g/ml
  - 8) 必要に応じて小分けし、－20℃～－70℃で保存する。
- (2) 市販キットを使用する場合、下記のキット等が使用可能；
  - ・ MEGAclean™ Kit（Applied Biosystems 社 Cat. #AM1908）
  - ・ スピンカラム -NucAway™ Spin Columns（Applied Biosystems 社 Cat. #AM10070）など

## 【3】 siRNA 混合物の調製

- (1) ColdShock-DICER による切断反応
  - 1) 以下の反応液を調製する。

5 × ColdShock-DICER Buffer	10 $\mu$ l
dsRNA	5 $\mu$ g
ColdShock-DICER（1 U/ $\mu$ l）	5 $\mu$ l
RNase free dH <sub>2</sub> O	up to 50 $\mu$ l
  - 注）上記反応液調製は 50  $\mu$ 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  $\mu$ g の dsRNA を切断する場合、上記反応液を全て 2 倍にスケールアップして反応を行ってください（添加する比率は変えないでください）。
  - 2) 37℃、18 時間\* インキュベーションする。  
\*：反応時間は 18 時間を推奨（18 時間を越える反応を行なわない）。
  - 3) Stop Solution（120 mM EDTA）を 10  $\mu$ 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。

## (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 dH<sub>2</sub>O を加えて total volume を 100  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ l に溶解する。
- 6) OD<sub>260 nm</sub> 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<sub>260 nm</sub> = 1.0 で 40  $\mu$ 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 4)。

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 (メルク社) と RiboJuice™ siRNA Transfection Reagent (メルク社) 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 (siRNA1 分子  $\approx$  22 bp  $\approx$  mw 15,884 として計算)。

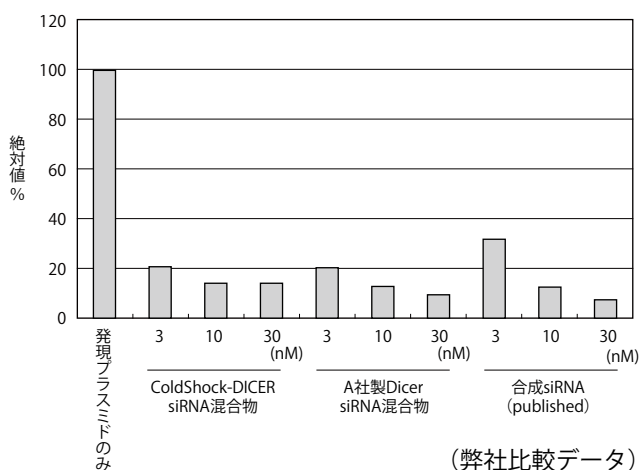


図 4. ColdShock-DICER 分解物のホタルルシフェラーゼ発現量に与える影響 (A 社製 Dicer 分解物、合成 siRNA との比較)

## IV. トラブルシューティング

### 1. 回収される siRNA 混合物の収量が少ない

- (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。また、基質となる dsRNA 溶液の凍結、融解を避けるようにしてください。小分けして  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存することをお勧めします。
- (2) 過剰量の酵素液を使用している可能性があります。1  $\mu\text{g}$  の基質 dsRNA に対して、1 U の酵素を用いるよう反応系を調整してください。スケールアップあるいはスケールダウンする場合も、反応液中の基質量、バッファー量、酵素量の比率を本文中 (IV- [3]) に示した比率に合わせてください。

[例]; 20  $\mu\text{l}$  反応系に基質 dsRNA 2  $\mu\text{g}$ 、5×ColdShock-DICER Buffer 4  $\mu\text{l}$ 、ColdShock-DICER 2  $\mu\text{l}$  (2 U) を加える。

- (3) 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)。
- (4) 反応時間が長すぎる可能性があります。18 時間を越える設定は避けてください。
- (5) 基質が一本鎖 (ssRNA) 状態である可能性があります。dsRNA 作製時にセンス鎖とアンチセンス鎖を別々に合成する場合には、センス鎖とアンチセンス鎖を確実にアニールさせ dsRNA を基質として使用してください。

### 2. RNAi 効果が低い

- (1) siRNA 混合物の量が少ない、あるいは純度が低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、siRNA 混合物量を再確認してください (siRNA 混合物の添加量を検討する必要があります)。また、siRNA 混合物の凍結、融解を避けるようにしてください。小分けして  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存することをお勧めします。
- (2) トランスフェクション条件が適切でないことが考えられます。トランスフェクション試薬量などの検討が必要です。
- (3) ターゲット配列の長さが短い、またはターゲット配列が他の遺伝子と相同性が高い場合が考えられます。ターゲット配列を伸ばす (1 kb 程度まで)、または異なるターゲット領域を探す必要があります。
- (4) 細胞数が少ない場合が考えられます。細胞の種類にもよりますが、細胞数を上げてトランスフェクションを行う必要があります (50 ~ 70% コンフルエント状態がよい場合もあります)。
- (5) ターゲット遺伝子が生育に必須である場合、細胞死も考えられます。

### 3. ColdShock-DICER 分解後の反応液中に沈殿が見られる。

遠心 (10,000 rpm、3 分間程度) により沈殿を除去し、上清を用いて精製操作を行ってください。

## V. 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) Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mello C.C. (1998) *Nature*, **391**, 806-811.
- 3) Hamilton A.J., Baulcombe D.C. (1999) *Science*, **286**, 950-952.
- 4) Sanchez A.A., Newmark P.A. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 5049-54.
- 5) Zamore P.D., Tuschl T., Sharp P.A., Bartel DP (2000) *Cell*, **101**, 25-33.
- 6) Knight S.W., Bass B.L. (2001) *Science*, **293**, 2269-2271.
- 7) Sun W., Nicholson A.W. (2001) *Biochemistry*, **40**, 5102-5110.
- 8) Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. (2001) *Nature*, **411**, 494-498.
- 9) Kawasaki H., Eigo S., Iyo M., Taira K. (2003) *Nucl. Acids Res.*, **31**, 981-987

## VI. 関連製品

si-RNase III™ (製品コード 2430A/B)  
*in vitro* Transcription T7 Kit (for siRNA Synthesis) (製品コード 6140)

< siRNA の transfection 用 >

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

< プラスミドの transfection 用 >

*TransIT*® Transfection Reagents シリーズ

*TransIT*®-2020 Transfection Reagent (製品コード MIR5404)

*TransIT*®-LT1 (製品コード MIR2304)

*TransIT*®-293 (製品コード MIR2700) など

< dsRNA 電気泳動用サイズマーカー >

siRNA Ladder Marker (製品コード 3430)

*TransIT*® シリーズは Mirus 社の製品です。

## VII. 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.

### [M24] ColdShock-DICER®

This product is the subject of the pending Japanese patent application.

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**