

RNA工学分野の研究に最適。 ユニークな切断酵素とマーカーが登場!!

mRNA Interferase™-MazF

製品コード 2415A 1,000 U ¥50,000

14-30 ssRNA Ladder Marker

製品コード 3416 62.5 µl(25レーン分) ¥25,000

▶配列特異的に一本鎖 RNA のみを切断する酵素

mRNA Interferase™-MazF

一本鎖 RNA 中の ACA 配列の 5 側を特異的に切断するエンド型リボヌクレアーゼです。
二本鎖 RNA、二本鎖 DNA および一本鎖 DNA を切断しません。

mRNA Interferase™-MazF は、大腸菌のトキシン・アンチトキシンモジュールのトキシンタンパク質 MazF を大腸菌シャペロンのトリガーファクターと融合させ、発現させた酵素です。一本鎖 RNA 中の ACA 配列のみを特異的に認識し、切断するリボヌクレアーゼ活性を有しています^{1, 2)}。ユニークな特徴をもつ本酵素は、RNA 干渉による遺伝子発現制御法などの RNA 工学分野において新しい応用が期待されます。以下に本酵素の実験例と反応性を紹介します。

製品の内容

mRNA Interferase™-MazF	1,000 U(20 U/µl)
5 × MazF Buffer	1 ml
(200 mM リン酸ナトリウム緩衝液 pH7.5、0.05% Tween 20)	

実験例：mRNA Interferase™-MazF によるオリゴ RNA 切断の確認

30 base のオリゴ RNA (ACA 配列を 1 カ所含む) を mRNA Interferase™-MazF で切断し、電気泳動により切断バンドを検出しました。

【方法】

(1) PCR チューブに以下の反応液を調製し、37 °C、10 分間反応させました。

オリゴ RNA* (100 pmol/µl)	1.0 µl
mRNA Interferase™-MazF (20 U/µl)	1.0 µl
5 × MazF Buffer	2.0 µl
DEPC 処理水	6.0 µl
全量	10.0 µl

* : オリゴ RNA : 5'-UAAGAAGGAGAUUAUACAUAUGAAUCAAUC-3'

(2) 反応後、サンプルと等量の RNA Loading Buffer*¹ と混合液の 1/5 量の 6 × Dye*¹ を加え、変性ポリアクリルアミドゲル*² 電気泳動を行いました。

*¹ : 14-30 ssRNA Ladder Marker (製品コード 3416) に添付

*² : 15% アクリルアミド : ビスアクリルアミド (19 : 1) 7M Urea、0.5 × TBE

(3) SYBR® Green II Nucleic Acid Gel Stain で染色し、蛍光イメージアナライザー FMBIO® II で解析しました。

【結果】

ACA 配列を 1 カ所含む 30 base のオリゴ RNA は、mRNA Interferase™-MazF により ACA 配列の 5 側で分解され、16 base と 14 base のバンドが検出されました。

mRNA Interferase™-MazF による切断反応により得られた 14 base ssRNA Oligo と ssRNA Ladder Marker の 14 base の位置がずれていますが、これは、それぞれのオリゴの塩基組成が大きく異なること、および、切断した 14 base ssRNA Oligo が 2, 3-環状リン酸の構造をとることに起因します。

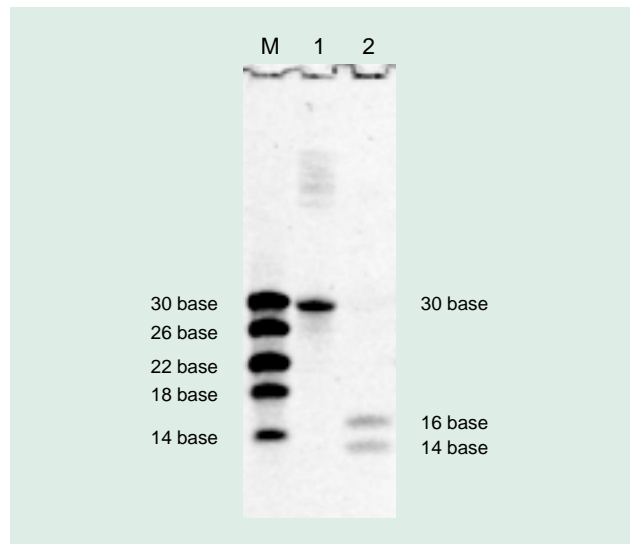


図1 mRNA Interferase™-MazF によるオリゴ RNA の切断反応

M : 14-30 ssRNA Ladder Marker (2.5 µl)

1 : 反応前 ssRNA Oligo (30 base)

2 : 反応後 ssRNA Oligo (16 base、14 base)

mRNA Interferase™-MazF の反応性について

1. 反応 pH について

本酵素は pH7.5 から 8.5 において高い反応性を示しました。Buffer のイオン種の影響は特に認められませんでした。

2. 反応温度について

反応温度について検討したところ、15 から 40 において高い反応性を示しました。

3. 反応に影響を与える添加物について

NaCl などの塩類は本酵素の反応を阻害し、特に MgCl₂ は 5 mM でも大きく阻害しました。DTT の影響は受けませんでした。

4. その他の注意事項

- (1) 本酵素は一本鎖 RNA 中の ACA 配列を特異的に切断する酵素ですが、周辺配列によっては AC 配列でも切断する場合がありますことが報告されています³⁾。
- (2) 本酵素は二本鎖 RNA を切断しないため、RNA の高次構造の影響等により、一本鎖 RNA 中であってもすべての ACA 配列を切断できない場合もあります。
- (3) 本酵素による切断末端は 2',3'-環状リン酸および 5'-OH となるため、そのまま RNA Ligase でライゲーションすることはできません。

【参考文献】

- 1) Zhang, Y. et al. (2005) *J. Biol. Chem.*, 280, 3143-3150.
- 2) Zhang, Y. et al. (2003) *Molecular Cell.*, 12, 913-923.
- 3) Munoz-Gomez, A. J. et al. (2004) *FEBS Letters*, 567, 316-320.

▶ ssRNA MW Standard Marker

14-30 ssRNA Ladder Marker

14 ~ 30 base の一本鎖 RNA 断片で構成される変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動用 RNA マーカーです。miRNA をはじめとする低分子 RNA のサイズ推定に最適です。

変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動用のローディングバッファーが添付されているため、サンプル調製が容易です。

製品の内容

14-30 ssRNA Ladder Marker	62.5 μl (25 レーン分)
RNA Loading Buffer	1 ml
6 × Dye (Orange G を含む)	1 ml

* Marker に等量の Loading Buffer と混合液の 1/5 量の 6 × Dye を添加してご使用ください。

実験例：培養細胞株の small RNA の検出

培養細胞株由来 total RNA 5 μl (25 μg) と等量の RNA Loading Buffer および 2 μl の 6 × Dye を添加し、15% アクリルアミド：ビスアクリルアミド (19 : 1) / 7 M Urea / 0.5 × TBE ゲルで電気泳動を行い、SYBR® Green II Nucleic Acid Gel Stain で染色した後、FMBIO® II にて検出しました。18 base から 26 base の small RNA の位置が確認できました。

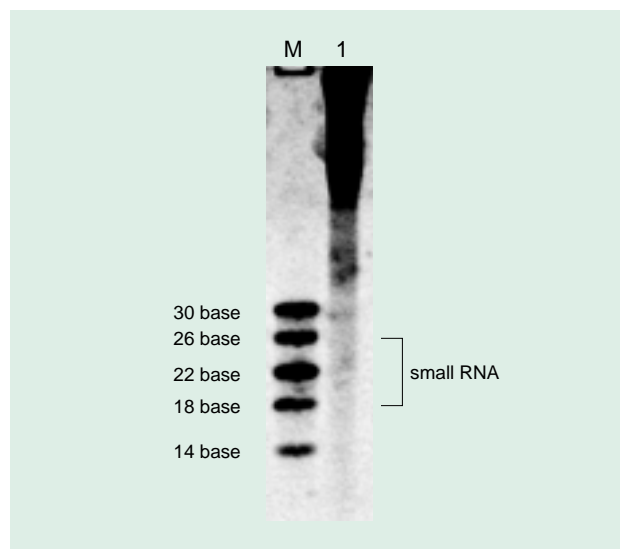


図2 培養細胞株由来の small RNA の検出

M : 14-30 ssRNA Ladder Marker (2.5 μl)

1 : total RNA (25 μg)

関連製品

- ・ RNA Preparation Water
製品コード 9011
- ・ SYBR® Green II Nucleic Acid Gel Stain
製品コード 50522 / 50523 (Cambrex 社の製品です)
- ・ Perfect RNA™ Markers, 0.1-1 kb
製品コード 69924-3 (Novagen 社の製品です)
- ・ FMBIO® II システム
製品コード HT212 (日立ソフトウェアエンジニアリング社の製品です)

本文中の製品に該当するライセンス確認事項は 43 ページをご覧ください。¹⁹⁾ なお、mRNA Interferase™-MazF のご購入に際してはライセンス同意書が必要です (詳細はタカラバイオホームページをご覧ください)。