

ルシフェラーゼアッセイにもとづいた新しい Poly(A) mRNAの特異的かつ高感度な定量法： The Poly(A) mRNA Detection System



Promega

By Donna Leippe, Ph.D., Ken Lewis, Ph.D., John Shannonhouse, M.S., John Shultz, Ph.D., and Scott Weatherbee, Ph.D.
Promega Corporation

はじめに

核酸定量は分子生物学における多くのテクノロジーで重要です。テクノロジーにより、より少ないサンプルが生成されるようになり、必要とされるサンプル量が減少するにつれて、高感度な定量法の必要性が増してきます。プロメガではそのようなニーズに応えようと高感度かつ特異的な核酸定量技術を開発してきました。Poly(A) mRNA Detection Systemは、ピコグラムからナノグラムのレベルのポリアデニル化された mRNA の定量に適しています。このシステムは、吸光分析法あるいはゲル電気泳動解析と比較してより高い感度を持ちます。感度が高められたため、定量に必要なサンプル量は少なく済みます。

このアッセイではpoly(A) mRNA が oligo(dT)プライマーへのハイブリダイゼーションを介して特異的にターゲットにされます。分光測光法と対照的に、このシステムはmRNA をRNAプレップ中に存在している他のRNA種、例えばrRNAやtRNAから区別します。ゲル電気泳動解析は、これらの種を区別することはできませんが、長さ500-3,000塩基の多数のバンドとして現われるmRNA分子の混成の集団の濃度を決定するには限界があります(1,2)。このシステムは、poly(A) mRNAに特異的であるので、得られた値はすべてのRNA種を測定する吸光度あるいは染色技術によって推定された量と大きく異なるかもしれません。

Poly(A) mRNA Detection Systemは、少量あるいは希釈されたサンプルを開始サンプルとする場合の mRNA の定量に理想的です。mRNAの濃度と品質がわかれば、RT-PCRあるいはcDNA構築に役立てられます。これはまた、遺伝子アレイ用にcDNAプローブを生成する前のmRNAレベルの標準化を容易にします。

Poly(A) mRNA Detection Systemは どのように機能するか

Poly(A) mRNA Detection Systemに適用されているテクノロジーは、一連の酵素反応に基づいており、2本鎖の核酸を検出します。このテクノロジーでは、2本鎖の核酸の脱重合を行うポリメラーゼのピロリン酸化活性を利用します(3)。ポリメラーゼと反応条件を変えることによって、異なった核酸分子が特異的に検出されます(4)。Poly(A) mRNA Detection Systemでは、Klenow Fragment, Exonuclease Minusが過剰量のrRNAとtRNAの存在下でpoly(A) RNAを検出するために使われます。DNA Polymerase I (Klenow Fragment) のピロリン酸化活性は、dsDNA(3)とDNA:RNA ハイブリッドのDNA鎖の脱重合を可能にします。ピロリン酸化反応の前のpoly(A) RNAとアンカー-oligo(dT) のハイブリダイゼーション

は、RNA の poly(A) 分画の特異的な検出を可能にします。oligo(dT) プライマーは、3' 末端にひとつのデオキシグアニン、デオキシチジンあるいはデオキシアデニン塩基を持つ18mer です。3' 末端のこの塩基はpoly(A)テールの始めにオリゴヌクレオチドを誘導し、「固定する」役割を担います。Klenow Fragment, Exonuclease Minusは、5'→3' と 3'→5' エキソヌクレアーゼ活性に欠けており、3'末端が完全にマッチするDNA鎖のみをピロリン酸化します。

ハイブリダイゼーションステップに続いて、2組の酵素反応（ピロリン酸化とリン酸基転移反応）のインキュベーション（図1）が行われます。第1の反応は、mRNA のpoly(A) の部分にハイブリダイズされ、固定されたoligo(dT) のピロリン酸化です。このピロリン酸化反応の産物はフリーのヌクレオシド三リン酸（dNTPs）で、生産されたフリーのヌクレオチドの量はハイブリダイズされ、固定した oligo(dT) の量に依存します。2番目の反応では、dNTP から末端のリン酸がATPを作るためにADP に転移されます。この反応はヌクレオシド三リン酸キナーゼ(NDPK, 5)によって触媒されます。これらの2つの反応により最終的にサンプル中のpoly(A)テールの数に比例する量のATPが生成されます。ATPはルシフェラーゼ酵素の基質であり(6)、非常に高感度なルシフェラーゼ/ルシフェリン試薬による3番目の反応で測定されます。反応を妨げる主な物質は、ATPと他のヌクレオシドとデオキシヌクレオシド三リン酸、ATPases、ヌクレアーゼおよびdsDNA です。

上記のとおり、DNA Polymerase I (Klenow) Fragment, Exonuclease Minusは、フリーのoligo(dT) あるいは3' 末端がミスマッチして結合したオリゴヌクレオチドなどには反応せず、ハイブリダイズし、適切に固定したoligo(dT) だけをピロリン酸化します（表1のデータをご覧ください）。poly(A) 部位の開始前にシトシン（C）を持つ合成の1.2kb カナマイシン mRNA が、全3種のオリゴヌクレオチドのそれぞれに、または3種類の等モル比のミックスに、ハイブリダイズされました。2種類のミスマッチしているoligo(dT) プライマーからのシグナルは、マッチしているoligo(dT) プライマーのわずか1.8%と4.6%でした。3つすべてのオリゴヌクレオチドミックスによるハイブリダイゼーションからのシグナルは、（最も可能性の高い理由としてハイブリダイゼーションサイトの競合のために、）oligo(dT) - デオキシグアニン（dG）プライマーだけによるハイブリダイゼーションと比較して減少していました。アンカー-oligo(dT) プライマーの使用により、Poly(A) mRNA Detection Systemはサンプル中のpoly(A) テールの数に依存し、poly(A) テールの量や長さには依存しません。表2は、異なったmRNAsが定量されたときの結果を示します。このように光のシグナルは存在するmRNAの量ではなく、mRNA 分子の数に依存します。

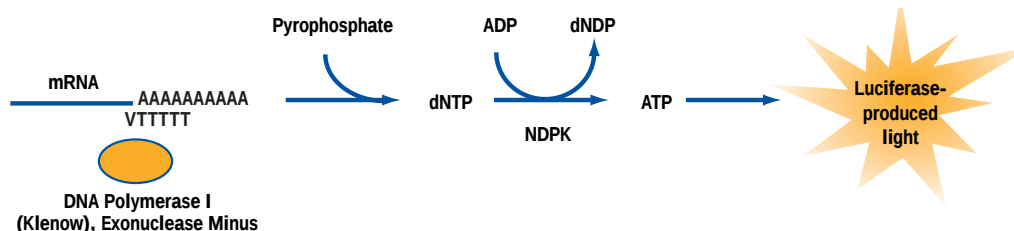


図1. Poly(A) mRNA Detection Systemを使った核酸定量。
UUUUUUは18塩基のオリゴヌクレオチドを表す（U = A, GあるいはC）。

表1. 個々のオリゴヌクレオチドとカナマイシンmRNA のハイブリダイゼーションからのシグナル

oligo	Light Units	%of Signal with oligo(dT)-dG
Oligo(dT)-dC	3.605	1.8
Oligo(dT)-dA	9.220	4.6
Oligo(dT)-dG	199.0	100
All Oligo(dT)-s	130.0	65.3

表2. 種々のmRNAs の等モルからのシグナル¹

mRNA	Light Units ² (LU)	%Kanamycin Signal	LU/amol ³	LU/pg
Kanamycin	130.0	100	0.13	0.33
Luciferase	110.5	85	0.11	0.19
Globin	180.7	139	0.18	0.88
All mRNAs ⁴	122.2	94	0.12	-

¹ それぞれのmRNA の1fmolが、1回のピロリン酸化/リン酸基転移反応に使われた。重量濃度は、40μg/ml = 1 O.D. unit の換算率を使って A₂₆₀ の値によって決定された。既知か、あるいは推定されたメッセージの長さが公式：ヌクレオチド数 × 330を使って grams/mole を計算するために使われた。RNA の1 fmol は、396pg の合成のカナマイシン mRNA (1.2kb、カタログ番号C1381)、580pgの合成ルシフェラーゼmRNA (1.75 kb、カタログ番号L4561)、206pgのウサギα-およびβ-グロビンmRNA (推定平均625塩基、GibcoBRL) に対応する。

² 光ユニットの値は、3つのピロリン酸化/リン酸基転移反応の平均である。

³ 1 attomole = 10⁻¹⁸mol.

⁴ カナマイシン、ルシフェラーゼとグロビンmRNAは、モル比1 : 1 : 1。

直線性と感度

このシステムは存在する mRNA 分子の数に依存しているため、既知量のスタンダードmRNA によって合成された光ユニットの値と比較することでサンプル中に存在しているmRNA 分子の数を推定できます。精製された1.2kb 合成カナマイシン転写産物はシステムの付属品として供給され、mRNA スタンダードとして使用されます。図2は、この1.2kb カナマイシンmRNAがPoly(A) mRNA Detection System を使って試験されたときの直線性と感度を示します。サンプルが2-4ng/μlまで (あるいはおよそ5-10 fmol/μlまで) のカナマイシン mRNAを含んでいるときに、アッセイは直線性を示します。これより高濃度においては、シグナルは横ばいになり始めます (パネルB)。さらにカナマイシン mRNA を希釈することによって、アッセイ感度が決定されました。検出の限界はカナマイシンmRNAで40pg/μl未満 (あるいは0.1fmol/μl; パネルC) です。プロメガでは40pg/μlから2ng/μlのサンプル濃度で直線となる範囲でシステムを使用することをお勧めします。

未知のmRNAサンプルを1.2kb カナマイシンmRNA スタンダードのシグナルと比較することにより、サンプル中のpoly(A)テールの数とポリアダデニル化されたmRNA 分子の数を推定します。代わりに、平均のmRNAの長さが1.2kb カナマイシンmRNA あるいは他の長さと同じと仮定することによって、ポリアダデニル化された mRNA の濃度は重量でも推定することができます。

特異性

Poly(A) mRNA Detection System を使うと、吸光分析法では区別できない tRNA 種を識別することができます。次の実験では、mRNA、Total RNA およびtRNAを、吸光分析法による測定で結果が信頼できる最も低い濃度、4ng/μl に希釈しました。mRNA とTotal RNA の1対1の混合液も準備しました。期待されたように、4つのサンプルすべては260nmにおいて類似の吸光度を示しましたが (図3) Poly(A) mRNA Detection System の結果は全く異なっていました。tRNA からのシグナルは、等量のmRNAのわずか0.7%でした。Total RNA サンプルでは、Total RNA 中のmRNAのパーセントを示すと考えられる4.6%のシグナルを示しました。同様に、1対1のミ

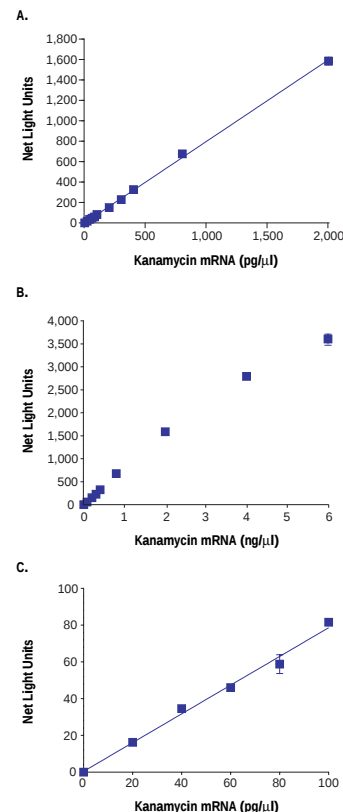


図2. Poly(A) mRNA Detection Systemの直線性 (実験プロトコールについてはPN77を参照)

ックスは、mRNAサンプルのシグナルのおよそ50% のシグナルを示しました。これはこのテクノロジーがrRNA が混入している可能性のあるmRNA 精製サンプル中のmRNA レベルを測るために有用であることを示します。

さらに rRNA によって生成されたシグナルを調べるために、rRNA に富み、mRNA が比較的除かれたサンプルを、2度 PolyATtract® mRNA Isolation System を通して通過したTotal RNA を集めることにより準備しました。結果として生じた上清をPoly(A) mRNA Detection System で試験しました。上清からのシグナルは、Total RNA からのシグナルと比較して減少しており、Total RNA サンプルからのシグナルがmRNA分子によって生成されたものであることが示唆されました。上清から生成されたシグナルは、同量のmRNAのわずか0.5%でした。

mRNA とTotal RNA による濃度勾配曲線

Total RNA とカナマイシンmRNAサンプルを使って濃度勾配曲線を図4のように作製しました。mRNA サンプルとカナマイシン mRNA からのシグナルは一致しています (パネルA)。これは、異種の mRNAs の集団を測る際の標準としての1.2kb mRNA の有用性を示しています。Total RNA のサンプルも同じくテストしました (パネルB)。Total RNA サンプルではRNAの大多数 (80-85%) が rRNAですが (1,2) このシステムでは rRNA と tRNA サンプルでほとんどシグナルが生じず、これらのRNA種の存在下でもmRNA の測定を可能にします。シグナルは mRNA であると予測される1-3%のRNAにより生成されます。

mRNA 濃度の定量の再現性

mRNA 定量の再現性を決定するために、ネズミ肝臓 mRNAを調製しました。試料を40と400pg/μlに希釈し、それぞれの希釈の分画を作り、-20において保存しました。実験は複数回行いました。それぞれの希釈の分画を実験毎に使い、カナマイシン mRNA 標準曲線を用いるPoly(A) mRNA Detection System を使って濃度を決定しました (表3)。

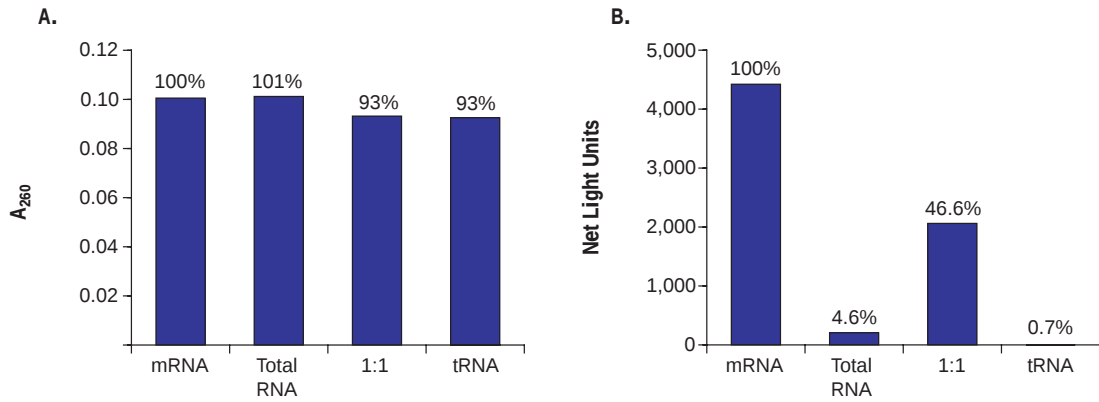


図3. RNA 種の識別

Total RNAは、SV Total RNA Isolation System (カタログ番号Z3100) を使ってネズミ肝臓から精製された。mRNA は、PolyATtract® mRNA Isolation System III (カタログ番号Z5300) を使ってこのTotal RNA の一部から調製された。tRNA は仔ウシ肝臓から単離された。調製したRNAの濃度を吸光分析法で決定し、4 ng/mlに希釈した。50% : 50%混合液を形成するようにmRNA とTotal RNAを等量混ぜた。

パネルA : 核酸の濃度は吸光分析法で確認された。

パネルB : サンプル中のmRNA の濃度は、Poly(A) mRNA Detection System を使って決定された。それぞれのバーの上のパーセンテージは、ネズミ肝臓mRNA を使ったときのシグナルのパーセントを表します。

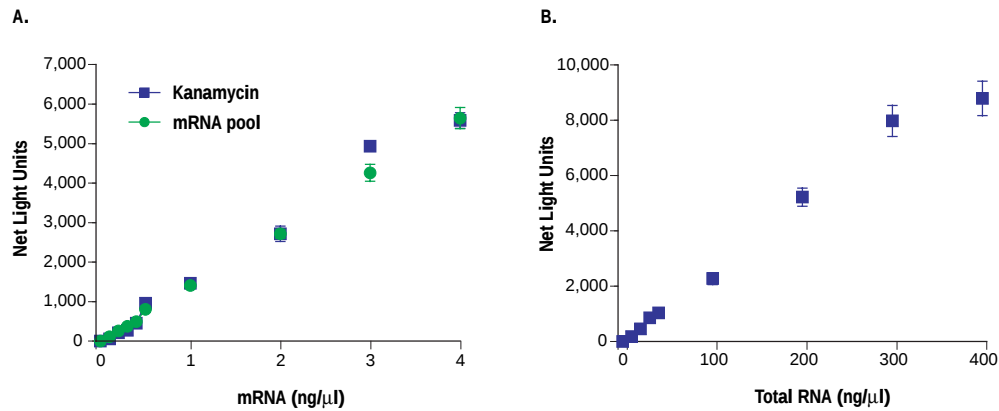


図4. mRNA とTotal RNA について濃度勾配曲線

パネルA : Total RNA は、RNAagents® Total RNA Isolation System (カタログ番号Z5110) を使ってネズミ腎臓から精製した。mRNA は、PolyATtract® mRNA Isolation System III (カタログ番号 Z5300) を使ってTotal RNA から精製した。mRNAサンプルの濃度は260nmにおける吸光度、1ユニットあたり40μg/mlの換算率によって吸光度から121ng/μl であると決定された。mRNAを5ng/μl に希釈し、次にX軸の上に示された濃度に希釈した。プロトコールにしたがって、ハイブリダイゼーション反応をトリPLICATEで実施した。比較のために同一反応を1.2kb カナマイシンmRNA を使って実施し、このデータも同様にプロットした。

パネルB : Total RNA は、SV Total RNA Isolation System(カタログ番号Z3100) を使ってネズミ肝臓から精製し、その1.86 mg/ml のRNAをX軸に示された濃度に水で希釈した。2つのパネル間の単位の相違に気を付けてください。

まとめ

Poly(A) mRNA Detection System はピコグラムからナノグラムレベルのmRNA の検出のための新しいシステムです。このテクノロジーは、一連の酵素反応によるATP 生成に依存し、合成されたATPはルシフェラーゼ発光反応を使って測定されます。このシステムはmRNA を検出する一般に使われる他の方法よりいっそう高感度で、選択的です。

O.D.による mRNA濃度(pg/μl)	平均濃度 (pg/μl) ²	S.D.	%C.V.
400	377.6	92.6	24.5
40	35.5	6.4	17.9

表3. Poly(A) mRNA Detection System の再現性¹

¹ Total RNAは、SV Total RNA Isolation System (カタログ番号Z3100) を使ってネズミ肝臓から精製し、そのTotal RNAから、PolyATtract® mRNA Isolation System III (カタログ番号Z5300) を使って mRNA を精製した。rRNA はゲル電気泳動では観察されなかった(データは示しません)。mRNAサンプルの濃度は、40μg/μl のA₂₆₀による換算率を使うと19ng/μl だった。平均の長さを1.2kb と仮定してモル数から重量単位に濃度を変えた。

² Poly(A) mRNA Detection System を使って2人のオペレーターが6日間にわたって実施した8つの実験からの平均濃度。

参考文献

1. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
2. Lewin, B. (1997) *Genes VI*, Oxford University Press.
3. Deuschler, M.P. and Kornberg, A. (1973) *J. Biol. Chem.* **244**, 3019-3028.
4. Kinney, J. et al. (1999) *Promega Notes* **73**, 3-7.
5. Parks, R.E. and Agarwal, R.P. (1973) *The Enzymes: Nucleoside Diphosphokinases*, Vol. 8, 3rd ed.
6. Moyer, J.D. and Henderson, J.F. (1983) *Anal. Biochem.* **131**, 187-189.

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
Poly(A)mRNA Detection System	100回分	K4040	35,000
RNAagents® Total RNA Isolation System	1システム	Z5110	23,000
SV Total RNA Isolation System	50回分	Z3100	28,000
1.2kb Kanamycin Positive Control RNA	5μg	C1381	8,500
Luciferase Control RNA	20μl	L4561	13,000
DNA Quantitation System	100回分	K4000	29,000