



By John Shultz, Ph.D., Robin Hurst, M.S., Ken Lewis, Ph.D., Natalie Betz, Ph.D., and Ray Williams, B.S.
Promega Corporation

はじめに

RNA分解酵素 (RNase) は普遍的に存在する酵素で、オートクレーブによっても不活性化しないため、RNAを取り扱う実験系では細心の注意をはらう必要があります。プロメガのRNasin®はRNaseと1:1で非競合的に結合する阻害剤で、その親和性は 10^{16}M^{-1} にも達します(1)。この親和力は共有結合を除くタンパク質間の相互作用の中で最も強い結合であることが知られています。この阻害剤はRNase A, B, Cおよびヒト胎盤RNase、アンギオゲニンを阻害し、その他のヌクレアーゼや逆転写酵素、ポリメラーゼは阻害しません。

RNasin® Ribonuclease Inhibitorの特長

今回の実験ではより標準的な実験系に即した条件で行うために、一般的に用いられるcCMP加水分解法よりも酵母のTotal RNAをサンプルとしたアッセイ法を採用しました。まず、RNasin®の安定性を確認するために、さまざまな反応条件下で試験を行ないました。4°C、25°C、37°C、50°Cで反応させた結果、どの温度でもRNase Aの活性をほぼ100%抑えました。また、pH5.5~9.0という過酷な条件下でも優れた阻害効果を示しました。プロメガの技術資料では反応にDTTを添加することを記載していますが、還元剤を除き、さらに空气中に35時間曝したRNasin®の実験結果では、還元剤の添加はRNasin®の阻害効果に必須ではないことを示していました。RNasin®はロットごとに2種類のRNase混入試験に加え、DNaseおよびエンドヌクレアーゼ混入試験により厳密な品質管理が行なわれています。

競合品との比較

cDNA合成やRT-PCR、*in vitro*での転写・翻訳などのアプリケーションではインタクトなRNAが要求され、RNase阻害剤によってRNAの分解を抑えることが重要な要素になっています。

RNasin®と最近発売された他社競合品の阻害効果を比較する実験を行ないました。RNase Aによる酵母Total RNAの分解を阻害する実験では、RNasin® 4ユニットで競合品400ユニット分以上の阻害効果が得られました (図1)。この結果の解釈として、競合品とRNaseがゆるやかに結合す

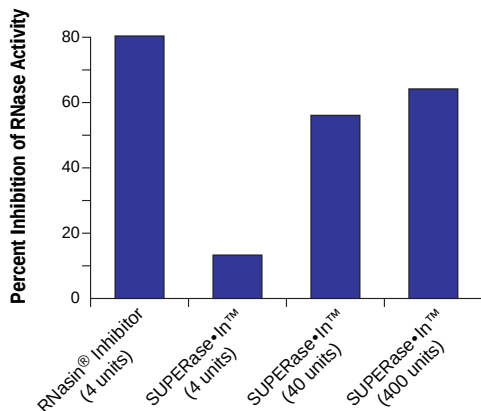


図1. RNasin®と競合品によるRNase Aを用いた酵母Total RNA分解の阻害比較
酵母Total RNAをRNase A反応液 (5ng RNase A, 50mM MOPS, 5mM MgCl_2 [pH6.5]) 0.5ml中で37°C、15分間インキュベートした。インキュベートの後、反応を停止するために0.5mlの10% TCAを加え、分子量の大きいRNAを沈殿させた。TCA溶解画分をOD₂₈₀で計測した。

ることが予想され、実際に競合品とRNaseとのブレインキューベーションにより阻害効果が増加しました。それでもなお8ユニットのRNasin®は、40ユニットの競合品の阻害効果を上回っていました。ブレインキューベーションを必要としないRNasin®は競合品と異なり、RNAがすでに含まれる反応液に直接添加することができます。希釈された溶液の中で、RNase阻害剤とRNaseの結合速度が迅速であることが、効果的なRNase阻害には必須です。

一般的なアプリケーションへの使用

*in vitro*翻訳中に起こる鋳型RNAの分解を阻害する実験を試みました。競合品を翻訳反応に加えると、翻訳産物が27%減少し、翻訳反応におけるRNase Aの阻害実験では低い効率しか得られませんでした。一方、RNasin®の添加では翻訳反応を阻害することは無く、RNase Aをほぼ完全に阻害しました (図2)。その他、*in vitro*転写反応やRNAの電気泳動パターンでもRNasin®を添加したものが優れており、単一細胞からのRT-PCRでも*bcr-abl*の場合は1個の細胞から、β-アクチンでも200個の細胞から検出することができました。

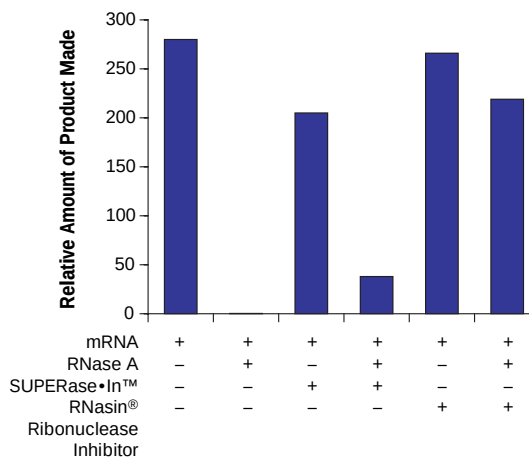


図2. *in vitro*翻訳中におけるRNasin®と競合品によるRNase A阻害の比較
ルシフェラーゼmRNAをRabbit Reticulocyte Lysateを用い、キットに添付のプロトコル (TM232) に従って翻訳した。ルシフェラーゼ活性はTurner Luminometer, TD-20eとLuciferase Assay Systemを用いて測定した。RNase Aは (+) と表記されている場合8ユニットを使用した。

参考文献

1. Lee, F.S. et al. (1998) *Biochemistry* 27, 8545-8553

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
RNasin® Ribonuclease Inhibitor	2500 units	N2111	18,000
	10000 units	N2115	39,000
Recombinant RNasin®	2500 units	N2511	18,000
Ribonuclease Inhibitor	10000 units	N2515	39,000