

T7 RiboMAX™ Express Large Scale RNA Production System

By Julie Adams, B.S., Bill Patterson, Ph.D., and Mandy Wautlet, B.S., Promega Corporation

要約

このシステムは、高濃度のRNAを迅速に調製するためにデザインされた新しい *in vitro* 転写システムです。この新しいシステムは標準的な RiboMAX™ Large Scale Production System に比べ、操作・反応時間が短縮化されており、しかもrNTPがRiboMAX™ Express T7 2X Bufferに含まれるために操作がより簡便になりました。

はじめに

現在、*in vitro*転写は、生物学的な活性を持つRNAを大量に合成するために欠くことのできない技術になりました。転写と翻訳を組合せたシステムも汎用されていますが、RNAを修飾する場合は*in vitro*転写が用いられています。例えば、リボゾームディスプレイでは、翻訳タンパク質をRNAに固定するために3' 末端の修飾を行います。このようなアプリケーションでは、サイクル時間の短縮化が重要です。

転写効率

1.1kbおよび2.3kbのRNA合成用の鋳型であるpGEM® Express Positive Control Template (カタログ番号 P2561)を用いた*in vitro*転写実験を行いました。37 °Cで転写反応を行い、1時間中、10分ごとに反応を停止させ、RNA濃度を測定しました。図1では、全合成量の50%以上が最初の10分間で合成されていることが示されました。30分後にアガロースゲル分析法で測定した結果、合成RNA濃度は8mg/mlにまで達していました。このシステムは、50 µg/ml の鋳型DNAを用いた場合、30分間という短時間でRNAを合成するためにデザインされていますが、少量の鋳型からでもインキュベーション時間を延長することにより高濃度RNAの合成が可能です。

試薬の安定性

分子生物学で用いられる試薬の長期安定性は、研究者にとって考慮すべきポイントの1つです。T7 RiboMAX™ Express Systemの構成成分であるEnzyme Mix、RiboMAX™ Express T7 2X Bufferの37 °Cでの安定性は、24時間後でもほとんど変化しませんでした。また、Express T7 2X Bufferは、少なくとも30回の凍結/融解を行った後でも、RNA合成能に影響を受けませんでした。

短鎖 転写産物の合成

短鎖の*in vitro*転写反応では、ポリメラーゼの開始イベントが頻繁に起こるため、標準的な長さの転写に比べ困難であると考えられています。T7 RiboMAX™ Express Systemでは2種類の鋳型DNAを用いて短鎖RNAの合成能をテストしました。100, 200, 300, 400, 500 baseの転写産物を合成する鋳型を用いた場合、反応2時間後にはRNA濃度 5mg/mlに達し、TBE-urea PAGEゲル分析では5本のバンドが明瞭に観察されました(図2参照)。

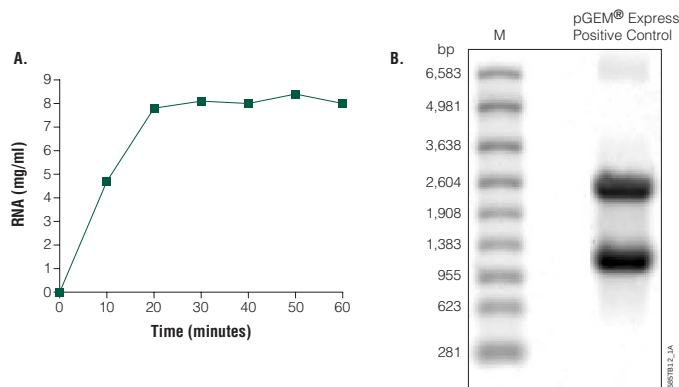


図1. RNA合成反応のタイムコース

250 µl 転写反応液を調製し、20 µl 反応液あたり1 µgのpGEM® Express Positive Control Template を加え (終濃度 50 µg/ml)、最後にEnzyme Mixを加えた。20 µl を分注し、37 °Cでインキュベーションを行い、図示した時間ごとに反応を停止させた。パネルA: 反応液を1000倍に希釈し、RNA濃度を測定した。パネルB: 30分間インキュベーションした反応液15 µlをアガロースゲル電気泳動で分析した。レーンMはRNA Markers (カタログ番号 G3191)。

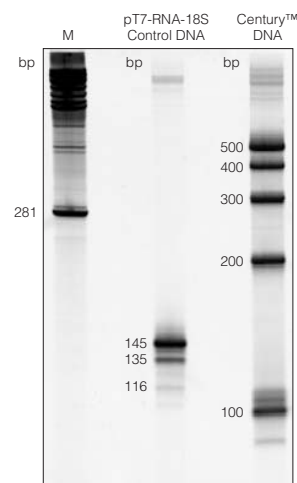


図2. 短鎖 転写産物の合成

転写反応には鋳型としてCentury™ marker およびpT7-RNA-18S control DNA (Ambion) を各1 µg使用した。反応後、500倍に希釈してRNA濃度を測定した。Century™ markerを用いた反応では0.5 µl、pT7-RNA-18Sの反応では0.25 µlを変性PAGEゲルで分析した。レーンMはRNA Markers。

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
T7 RiboMax™ Express Large Scale RNA Production System	1システム	P1320	44,000

Full Text www.promega.com/pnotes/80/9748_05/9748_05.pdf