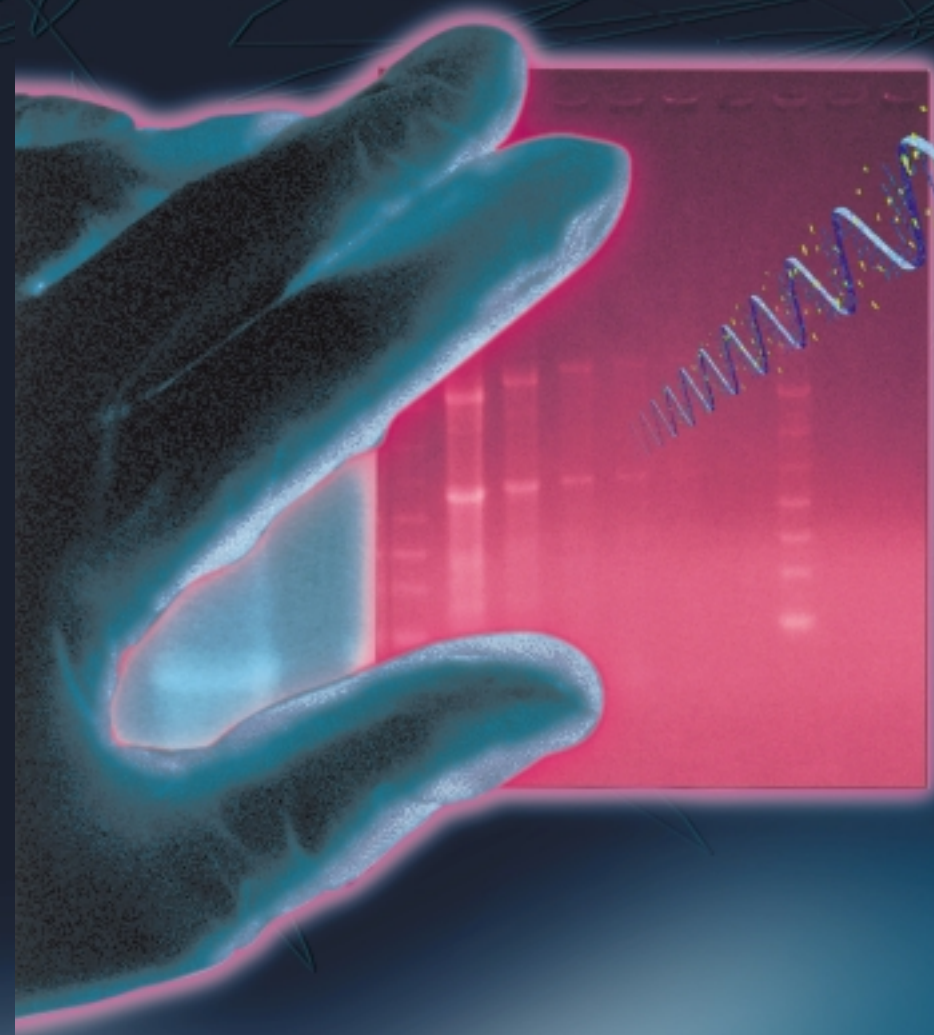




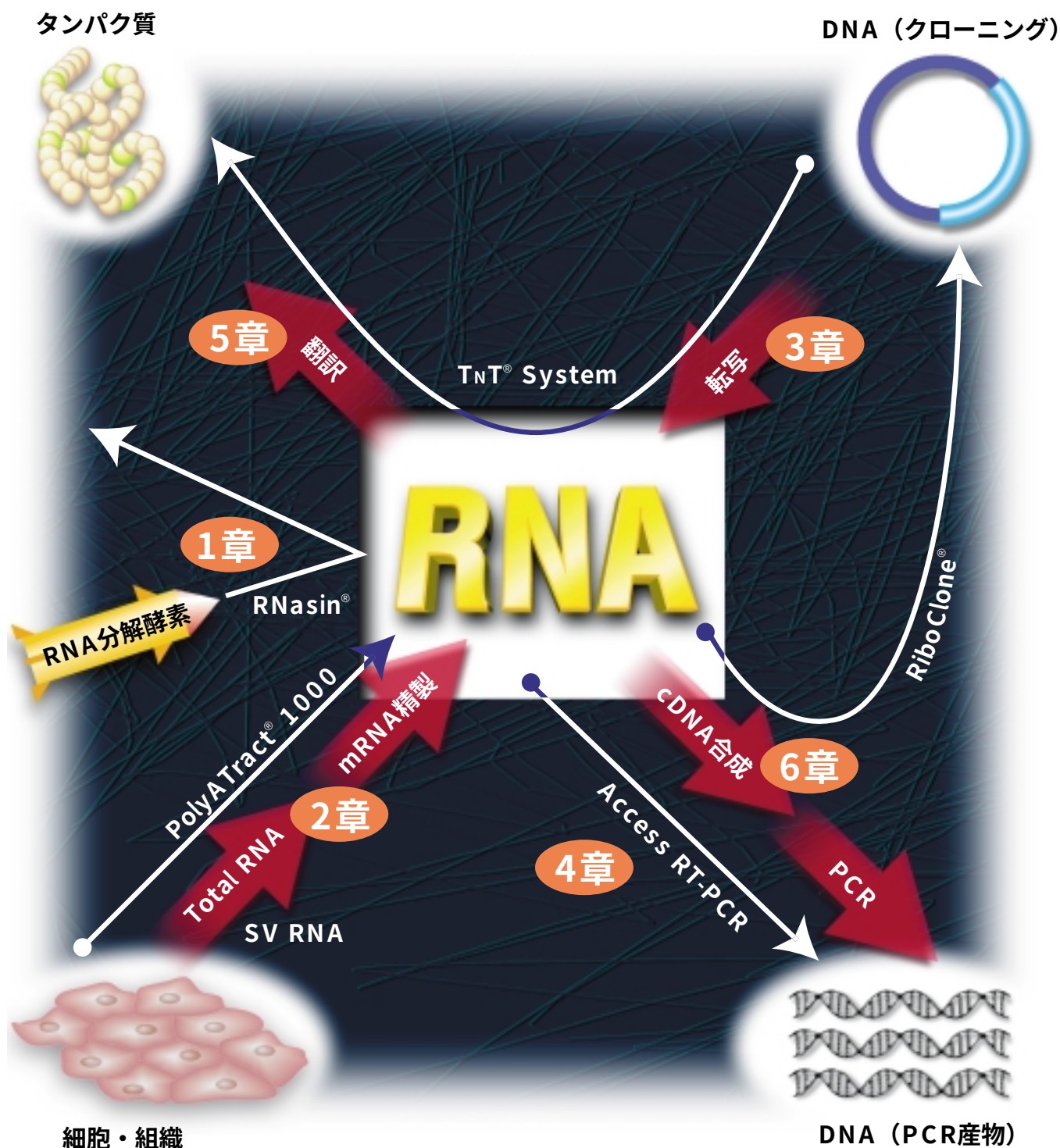
RNA

アプリケーションガイド



Get the message ...

プロメガ株式会社



目 次

第1章 RNaseから大切なRNAを守る	1
第2章 RNA精製	2
第3章 <i>in vitro</i> 転写.....	12
第4章 RT-PCR	16
第5章 <i>in vitro</i> 翻訳.....	20
第6章 cDNA合成	26
第7章 RNA精製後のアプリケーション	30



第1章 RNaseから大切なRNAを守る

リボヌクレアーゼ(RNase)がない環境を作り出す方法について

多くの分子生物学の手法はインタクトなRNAを必要とします。RNaseは非常に不活性化するのが難しく、抽出途中また抽出後の検体への混入を極力避ける努力をしなければなりません。これは特に検体が手に入れ難いまたは取り返しのつかない貴重なものである場合非常に重要です。以下の注意事項がRNAサンプルへのRNaseのコンタミを防ぎ、全長のRNAを抽出精製するのに役立ちます。

RNaseのコンタミを防ぐためのヒント

- ① RNaseの2大污染源は研究者の手と空气中に浮かぶ埃についた細菌やかび、またはこれらの付着したガラス容器です。これらの污染源からサンプルを守るには、RNA精製・解析用の試薬を取扱うときには必ず手袋を着用し（新品の使い捨てのラテックス手袋など）、無菌操作を行います。
- ② RNAを取扱うときにはなるべくプラスチック製の使い捨て器具を使います。これらの器具は普通RNaseフリーなので、前処理が不要です。
- ③ 再利用しているガラス容器やプラスチック器具は、RNaseを除去・失活させる処理を施します。ガラス容器は200°Cで一晩乾熱滅菌します。その他プラスチック容器などは0.1N NaOH / 1mM EDTAで満遍なくすすぎ、その後DEPC (diethyl pyrocarbonate) 処理水ですすぎます。COREX® 管は乾熱滅菌せずに、0.05% DEPC水に一晩浸します。これにより、遠心中にCOREX® 管が割れる可能性を低減することができます。
- ④ ほとんどの新鮮な脱イオン水はRNaseフリーですが、これもRNaseの污染源になる可能性があります。もし、プローブや検体としてのRNAが分解してしまった場合は、実験室の供給水をRNAサンプルと一緒に混ぜてインキュベートし、アガロースゲルで分析して分解しているかどうか確認して下さい。
- ⑤ RNA抽出用の試薬などは専用のものを使うようにします。ディスポの手袋をし、必ず乾熱滅菌済みのスパチュラを使用し、未使用の秤量皿又は薬包紙を使って下さい。
- ⑥ 自家製の溶液は必ず0.05% DEPCを加え、室温で一晩インキュベートします。その後、30分間のオートクレーブによりDEPCを飛ばしてから使用します。**オートクレーブのみではRNaseを不活性化できませんのでご注意ください。**

注意：Tris系のバッファーはDEPC処理できませんので、Tris bufferを調製する際には厳重に注意してTrisを秤量し、DEPC処理済みの水とガラス容器を使用してください。

RNasin® Ribonuclease Inhibitor: ネイティブタンパク質と組換えタンパク質

リボヌクレアーゼ(RNase)阻害剤を使用することにより、多くのアプリケーションでRNAの分解を防ぐことが出来ます。プロメーガのネイティブと組換え体RNasin® Ribonuclease Inhibitorは、真核生物の中性リボヌクレアーゼを含む幅広いリボヌクレアーゼに対する阻害能力を持っています（1、表1-1を参照）。

これらネイティブ並びに組換え体RNasin® Ribonuclease Inhibitorは、RNaseの混入が問題となる以下のような様々なアプリケーションで使用できます。

- RNAの収量増加
- cDNA合成中のmRNAの保護
- 逆転写PCR (RT-PCR)
- *in vitro* 転写/翻訳システム
- *in vitro* 翻訳時のRNAの安定性改善

ただし、リボヌクレアーゼは変性状態でも活性を保ちますので、非共有結合的に結合するRNasin® Ribonuclease Inhibitorが変性されて効力を失うことにならないよう、変性させる条件を避ける必要があります。活性化型のリボヌクレアーゼがRNasin® Ribonuclease Inhibitorから解離しないようにするため、使用は50°C以下で尿素などの変性剤が存在しない状態を選んでください。一方RNasin® は幅広いpH域でご使用いただけます（表1-2を参照）。

表1-1. ネイティブならびに組換え体RNasin® Ribonuclease Inhibitorのヌクレアーゼとポリメラーゼに対する影響（汎用されるものなどを選択し、リストアップした）

阻害できるリボヌクレアーゼ	阻害しないリボヌクレアーゼ
RNase A	RNase T1
RNase B	S1 Nuclease
RNase C	RNase from <i>Aspergillus</i> sp
human placental RNase	RNase H
	RNase ONE™ Ribonuclease
	Taq DNA Polymerase
	AMV, M-MLV Reverse Transcriptase
	SP6, T7 または T3 RNA Polymerase

表1-2. ネイティブならびに組換え体RNasin® Ribonuclease Inhibitorの特徴

活性	RNaseへの非共有結合による阻害
阻害型	非競合型(3)
リボヌクレアーゼ(RNase A)との結合比	1対1 (2)
結合阻害定数	Ki = 4 × 10 ⁻¹⁴ M (3,4)
使用濃度	反応溶液1 μlに対して1 unit
避けるべき反応条件	50°C以上、尿素、SDS
pH活性域	5-9（至適pH7-8）(1)
分子量	49,847Da
等電点	pI 4.7

参考文献

1. Blackburn, P. and Moore, S. (1982) In: *The Enzymes*, Vol. XV, Part B, Academic Press, NY.
2. Polakowski, I.J. *et al.* (1993) *Am. J. Pathol.* **143**, 507.
3. Lee, F.S. *et al.* (1989) *Biochemistry* **28**, 219.
4. Lee, F.S. *et al.* (1989) *Biochemistry* **28**, 225.

製品案内

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



第2章 RNA精製

はじめに

ノーザンブロット解析、cDNAライブラリーの構築、RT-PCR、プロテントランケーションテスト(Protein Truncation Test; PTT)といったアプリケーションにおいては、単離したRNAの精製度が高く、RNAが完全な状態を保っていることは極めて重要な意味を持ちます。RNA精製の成否は様々な要因・効果的な組織/細胞の破碎、内在性RNaseの不活性化、混入しているDNAやタンパク質の除去など(1)に依存しています。RNAを用いたすべての実験において、これらの中で最も重要な要因となるのが迅速なRNaseの不活性化です。RNaseは幅広い条件下で強力なRNA分解活性を発揮します(2)。その他にも、RNAの精製法を選択するときに考慮すべき要因としてサンプルの種類、目的のRNAの特性および単離したRNAをどのようなアプリケーションに用いるかなどが挙げられます。

Total RNAかpoly(A)⁺ RNAか

RNAはtotal RNAとしてもpoly(A)⁺ RNAとしても単離できます(3)。どちらの手法を用いることが最も実験者の要求に合うか、という選択は単離したRNAをどのようなアプリケーションに用いるかに大きく依存します。一般的なアプリケーションに対してtotal RNAとpoly(A)⁺ RNAのどちらが適しているかの一般的なガイドラインを表2-1に示します。

表2-1の情報はどちらのRNAを使うかを選択するための一般的なガイドラインとなりますが、選択にはこうしたアプリケーション以外の要因も考慮する必要があります。多くの場合、poly(A)⁺ RNAを実験に用いることによって様々な利点があります。しかし、total RNAの方が望ましい場合や、poly(A)⁺ RNAの単離に特殊な問題が起こりうる場合もあります。例えば、poly(A)⁺ RNAの単離システムはバクテリアやウイルスのような非ポリアデニル化RNAの単離には使えません。poly(A)⁺ RNAはmRNAの大部分を占めており、多くのアプリケーションではpoly(A)⁺ RNAが望ましいとされていますが、高速多検体処理が要求される実験系ではtotal RNAを単離する方が解析しやすくなります。最終的にはサンプルの特性、サンプルサイズや検体数などを考慮した上で、total RNAかpoly(A)⁺ RNAのどちらを単離すべきか選択してください。

表2-1. 様々なアプリケーションにおけるtotal RNAとpoly(A)⁺ RNAの比較

RNA	ノーザン ブロットング	RT-PCR	ライブラリーの 構築	ヌクレアーゼ プロテクション アッセイ	<i>in vitro</i> 翻訳	プライマー エクステンション	PTT アッセイ	ディファレンシャル ディスプレイ	レプリゼンテーション ディファレンシャル 分析
total RNA	++	++	+	++	—	++	+++	+	+
poly(A) ⁺ RNA	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++

(+++)**推奨**, (++)**十分**, (+)**可能**, (—)**推奨しない**

一般的なRNA単離法と留意点

RNA精製方法の最初のステップは細胞や組織の破碎です。この破碎・ホモジナイズのステップが徹底して行なわれないとRNAは細胞から放出されません。また、破碎の作業にともない内在するRNaseが細胞小器官から放出されます。良質のRNAを精製するには、細胞を破碎すると同時にこれらRNaseを不活性化する必要があります。このホモジナイズのステップでは通常グアニジンを使用しタンパク質を変性させ、RNaseを一時的に不活性化しています。また、ホモジナイズを促進させるために界面活性剤を利用することもあります。

細胞が破碎・ホモジナイズされた後、酸化フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコールの有機溶媒混合液により、有機物（タンパク質、細胞膜など）を抽出するのが最も一般的な方法論です。ここでRNAの精製度を決める要因は、正確な酸化フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコールの比、組織の種類に対するその溶媒の十分な量と正しいpHです。これら試薬の精製度とDNAを有機相に抽出するための条件設定が意外と難しいため、一般的に市販されている試薬を利用することが賢明です（RNAgent® Total RNA Isolation Systemなど）。目視で確認できるくらいのDNA混入があった場合、試薬の使用量やその調製に問題があったと考えられます。RNA精製過程では、DNAを取り除くステップも含まれていますが、普通DNAは有機溶媒による抽出ステップで取り除かれます。水相を移すとき有機相との境目の沈殿がDNA混入の原因となりますので、なるべく避けるようにします。また、DNAを完全に取り除きたい場合は、

RQ1 RNase-Free DNase（カタログ番号M6101）を利用することをお勧めします。これは、特にRT-PCRを行なうときに必要なステップです。

RNA精製の初期過程では、環境からのRNaseによる汚染は問題となりません。精製過程でRNaseを不活性化する試薬からサンプルを移すとき、特に外部からのRNaseによる汚染を防ぐ必要があります。ゲル電気泳動で明瞭に見えるRNAサンプルでも、活性のあるRNaseや活性化可能なRNaseが存在する可能性があります。そのようなRNaseを完全に隔離するには、RNasin®リボヌクレアーゼ阻害タンパク質を利用します。この阻害タンパク質により、容器やピペティング中に混入しやすいRNaseからRNAサンプルを守ることが出来ます。これら、RNaseの混入を防ぐためのヒントはプロメガRNAガイド第1章をご覧ください。



Total RNA の単離（スピнкаラム法）

SV Total RNA Isolation System^{II}

SV Total RNA Isolation System^{II} は組織、培養細胞、白血球などから簡単・迅速に完全なRNAを1時間以内に精製するシステムです(サンプル数にもよります：参考文献28, 図2-1)。Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System^{II}(カタログ番号 A1330)と同じように吸引法でも遠心法でもお使いになれます。サンプルの種類、目的のRNAの発現量や機能によりますが、1回の精製に60mgまでのサンプルを処理できます。また、このシステムではRT-PCRなどのDNA増幅を行う方法で問題となるゲノムDNAの混入を最小限に留めるために、DNase処理のステップを組み込んでいます。この単離法ではフェノール/クロロホルム抽出やエタノール沈殿は不要であり、最終サンプルへのDNaseの持ち込みもありません。様々なサンプルからの標準的なRNAの収量を表2-3に示します。

備考：吸引法で精製される場合、Miniprep Vacuum Adaptor (カタログ番号 A1331) が必要になります。別途お求めください。

^{II}特許出願中

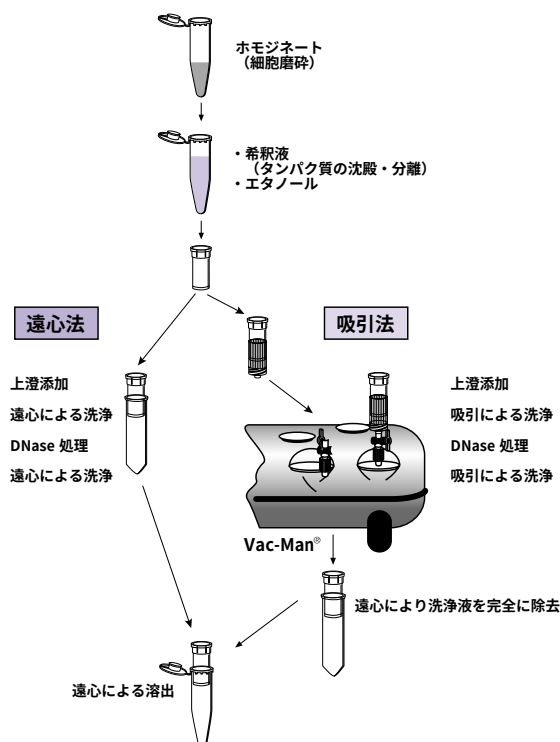


図2-1. SV Total RNA Isolation System (カタログ番号Z3100)の概略図。プロトコルの詳細については参考文献28をご覧ください。

Total RNAの単離（有機溶媒による抽出法）

RNAgents[®] Total RNA Isolation System

RNAgents[®] Total RNA Isolation Systemは液層抽出法に基づいた迅速な精製法です(4)。このシステムはサンプル中の内在性RNaseを急速に失活させる強力な変性剤を用い、それに続く有機溶媒による抽出と脱塩・濃縮のためのエタノール沈殿を組み合わせています。RNAgents[®] System は培養細胞をはじめ組織、血液、植物体と様々なサンプルからのtotal RNA抽出が可能です(4)。様々なサンプルからの標準的なRNAの収量を表2-2に示します。

表2-2. 様々な細胞・組織からRNAgents[®] System を用いて単離したtotal RNAの収量

サンプル	Total RNAの収量
HeLa 細胞	1.6mg RNA/10 ⁸ cells
Human WBC細胞	1.3mg RNA/10 ⁸ cells
マウス腸	2.3mg RNA/g 組織
マウス脾臓	8.3mg RNA/g 組織
マウス肺	1.9mg RNA/g 組織
マウス肝臓	6.6mg RNA/g 組織
マウス腎臓	3.1mg RNA/g 組織

RNAgents[®] System は、自由にスケール調整ができ、単離したRNAをRT-PCRへ適用するための改良プロトコルでは、多数のサンプルを1時間半以内に処理できます(4)。RNAgents[®] System で調製されたRNAはRT-PCRに加え、ノーザンブロット解析やcDNA合成、Poly(A)⁺ RNA 調製のサンプルなど、様々な用途にお使いいただけます。

表2-3. SV Total RNA Isolation Systemを用いて単離したTotal RNAの収量

組織 / 細胞株*	開始 サンプル量	ブレットあたりの収量	mg組織あたりの収量	A ₂₆₀ / A ₂₃₀	A ₂₆₀ / A ₂₈₀
肝臓	30mg	133μg	4.4μg	2.4	1.9
腎臓	20mg	46μg	2.3μg	2.1	1.9
心臓	60mg	16μg	0.3μg	1.8	2.1
脾臓	15mg	79μg	5.3μg	2.3	1.9
脳	60mg	39μg	0.7μg	2.1	2.1
肺	60mg	36μg	0.6μg	2.0	2.1
筋肉	30mg	22μg	0.7μg	1.8	2.1
RAW 264.7 cells	5 x 10 ⁶ cells	51μg	--	2.0	2.0

*心臓と肺はラット由来。その他の組織はマウス由来。マウスマクロファージ細胞株RAW264.7は、10% FCSと1mMピルビン酸を含むDulbecco's modified Eagle's medium中でコンフルエントになるまで育成した。あとの4つの列の値は平均値を示した。細胞株と脾臓サンプルはそれぞれ2個と3個のサンプルの平均値で、その他のサンプルは最低でも6サンプルの平均値を示した。



Poly(A)⁺ RNA の精製

RNAの解析に用いられる技術の多くにおいて、非選択的なRNA(Total RNA)を使用できますが、poly(A)⁺ RNAを使うことでより高い感度や特異性が得られます。Poly(A)⁺ RNAの精製ではmRNAが濃縮されるだけでなく、cDNA合成やその他のRNA解析の際にバックグラウンドとなる他の核酸分子が取り除かれます。

プロメガの PolyAtract[®] mRNA Isolation Systemシリーズは迅速かつ効率的に、異なる細胞性RNAの混合物や混入したDNAからPoly(A)⁺ RNAを単離できます(5,6)。すべてのPolyAtract[®] Systemは迅速なmRNA単離に磁性体技術に応用し、ビオチンとストレプトアビジンの強固な親和性を利用しています(図2-2)。これらのシステムは有機溶媒による抽出や沈殿を必要としないため、少量の開始サンプルからの高速多検体処理に最適です。

PolyAtract[®] System I-IVは単一のサンプルからtotal RNAとPoly(A)⁺ RNAの両方が必要な場合に便利ですが、Poly(A)⁺ RNAを調製する時には、Poly(A)⁺ RNAの単離に先だってtotal RNAを単離する必要があります。それとは対照的に、PolyAtract[®] System 1000(6)は、前もってtotal RNAを単離する手間を省き、様々な組織から直接Poly(A)⁺ RNAを単離できます。この単離システムは極めて効率的であり、様々なサンプルサイズに対応できます。ごく少量のスタート材料からPoly(A)⁺ RNAを単離する場合、PolyAtract[®] System 1000を用いた組織/細胞からの直接精製によって最大限の収量が期待できます(表2-4)。PolyAtract[®] Systemの特長を表2-5に示します。

表 2-4. PolyAtract[®] System 1000によるmRNAの収量

組織	mRNA 収量(μg/g 組織)
マウス 肺	100
マウス 肝臓	220
マウス 腎臓	330
NIH 3T3 細胞	200*

*約6 x 10⁶ 個の細胞

プロメガの各RNA精製キットについては表2-5を参照ください。

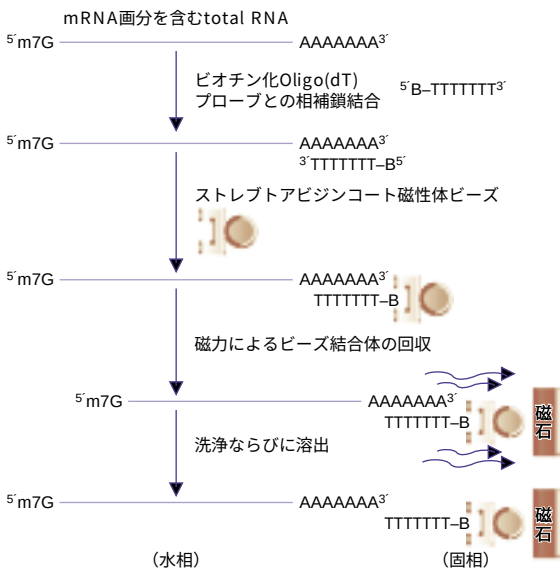


図2-2 PolyAtract[®] mRNA Isolation Systemの概要
Total RNAサンプル、または破碎した組織・細胞中のRNAとビオチン化オリゴ(dT)をハイブリダイズさせる。oligo(dT)はmRNAのpoly(A)テールにのみ結合する。ビオチンに結合する Streptavidin-Paramagnetic Particles(SA-PMPs)を加える。SA-PMPsを引き付けるために磁石を用い、その結果mRNAを含む複合体が精製されます。Nuclease-Free Water を加えることによってSA-PMPsからmRNAを分離する。

2本鎖RNAの精製

多くのRNAウイルスはライフサイクルの中で、2本鎖RNA状態をとる時期があります。健康体の植物、動物や真菌類の細胞には2本鎖(double-stranded; ds)RNAはほとんど含まれません。そのため、dsRNAの存在はウイルス感染の診断に用いられます。dsRNAは哺乳動物細胞内におけるウイルスの防御機構の活性化に関与することが知られています(7)。dsRNAの精製と解析はウイルス学にとって重要なツールとなります(8,9)。

多くの場合、最初にインタクトなウイルス粒子を精製し、そこから核酸を抽出する手法が最も簡便なdsRNAの単離方法です(10)。dsRNAはヒドロキシアパタイト(10,13)やCF-11セルロース(11,12)への特異的な吸着、またはフェノールを用いての differential extraction(14)、種々のヌクレアーゼに対する感受性の違い等を利用して組織から精製できます(12)。1本鎖RNA(single-stranded RNA; ssRNA)からdsRNAを分離する最も一般的な方法はCF-11セルロースへの吸着を利用したものです。まず全ての核酸を精製した後、エタノール存在下でdsRNAをCF-11セルロースへ吸着させます。洗浄の後、dsRNAはCF-11セルロースからエタノール不含のバッファーにより溶出されます(15,16)。ssRNAのみを切断する条件でDNaseおよびRNaseで処理することで、より高い精製度が求められます。高塩濃度(0.3M NaCl)下ではDNase Iと RNase AはDNA とssRNAを分解しますが、dsRNAは分解されません。低塩濃度下では全ての核酸が分解されてしまいます(8)。ヌクレアーゼを用いた Differential digestionはDNAとssRNAの混入物からの精製に、またdsRNA本体の確認のために利用できます。



表2-5. 各RNA精製システムの特長

精製RNA	製品名	カタログ番号	プロトコル番号	所要時間	サイズ	サンプル処理量	収量	特長
Total RNA	SV Total RNA Isolation System ^a	Z3100	TM048	1時間	50回分	1回あたり (最大) 組織: 30mg 細胞: 5×10 ⁶ 個 血液: 100μl~1ml	0.27~5.3μg/mg 組織	- 迅速, 高収量, フェノール不要 - 少量サンプルに最適 - 吸引と遠心を選択可能 - 血液・動物/植物組織・細胞・細菌・酵母を処理 ※吸引の場合、Miniprep Vacuum Adaptors (カタログ番号A1331) が必要です。
	SV Total RNA Isolation System, Trial Size ^a	Z3101	TM048	1時間	10回分			
	RNAgents [®] Total RNA Isolation System	Z5110	TB087	2.5~3時間 (標準プロトコル) 1.5時間 (短縮プロトコル)	可変	1キットあたり (最大) 組織: 6g 細胞: 6×10 ⁶ 個	1.3~8.3μg/mg 組織	- 高収量, 低コスト - グアニジン, フェノール方式 (フェノールはキットに含まれます。)
mRNA (Total RNAサンプル用)	PolyAtract [®] mRNA Isolation System II (with Magnetic Stand)	Z5200	TM021	30分	ラージスケール	1キットあたり 1~1mg Total RNA×3回	Total RNAの 1~2%	- 迅速, フェノール不要 - Total RNAからmRNAを単離
	PolyAtract [®] mRNA Isolation System I (without Magnetic Stand)	Z5210	TM021	30分	Z5200の試薬のみ			
	PolyAtract [®] mRNA Isolation System III (with Magnetic Stand)	Z5300	TM021	30分	スモールスケール	1キットあたり 100μg~1mg Total RNA×15回	Total RNAの 1~2%	- 迅速, フェノール不要 - Total RNAからmRNAを単離
	PolyAtract [®] mRNA Isolation System IV (without Magnetic Stand)	Z5310	TM021	30分	Z5300の試薬のみ			
mRNA (組織・細胞用)	PolyAtract [®] System 1000 (with Magnetic Stand)	Z5420	TM228	45分	2~50回以上	1回あたり 組織: 5mg~2×1g 細胞: 10 ⁶ ~10 ⁸ 個 血液: 10μl~10ml	70~200ng mRNA/mg組織	- 迅速, フェノール不要 - 組織, 細胞から直接mRNAを単離
	PolyAtract [®] System 1000 (without Magnetic Stand)	Z5400	TM228	45分	Z5420の試薬のみ			

^a Patent Pending.
N/A = Not Applicable.

mRNA特異的な定量

Poly(A) mRNA Detection System

Poly(A) mRNA Detection Systemは、高感度なmRNAの特異的検出のためにデザインされたルシフェラーゼベースの検出キットです。検出は、目的サンプル中に存在するmRNA濃度の評価を可能にする一連のハイブリダイゼーションと酵素反応による発光シグナルに基づきます。このシステムはmRNAに特異的で、rRNAまたはtRNAではほとんどシグナルを生じません。このシステムの検出限界は400pg mRNA (例: 40pg/μlのmRNA溶液、10μlを反応に添加) です。

このキットを用いた検出には、次のハイブリダイゼーションと酵素反応が含まれます。

1. アンカーオリゴ(dT)プライマーをmRNA poly(A)テールにハイブリダイズ
2. ハイブリダイズ完了後、mRNAの量に応じてATPを生成する2つの異なる酵素反応が進行
3. ルシフェラーゼ / ルシフェリン反応を用いて合成されたATP量に応じて光シグナルを生成
4. 合成したATP量をスタンダードmRNAと比較し、サンプル中のmRNA量を推定

特長

高感度: UVを用いた分光光度計やゲル解析よりも優れた感度を示します。ピコグラム (pg) からナノグラム (ng) オーダーのmRNAの特異的検出が可能

特異性: mRNAを検出。rRNAやtRNAのシグナルはほとんどなく、total RNAサンプルからのmRNAの検出が可能

直線性: 50倍の濃度まで直線性を示します。

効率的: 検出のために必要なmRNAサンプルの量が少量で済みます。

このテクノロジーでは、2本鎖DNA(dsDNA)とDNA:RNAハイブリッドのDNA鎖を脱重合するDNA Polymerase Iのピロリン酸化機能を利用しています。

RNAサンプル中のpoly(A) mRNAを特異的なターゲットとするために、アンカーオリゴ(dT)プライマーをmRNA poly(A) テールにハイブリダイズします。オリゴ(dT)プライマーは、3'末端に1つのデオキシグアノシン、またはデオキシシチジン、デオキシアデノシンを持つ18merのオリゴヌクレオチドです。3'末端のこの塩基はpoly(A)テールの最初の位置にオリゴヌクレオチドを導き、アンカーさせ、正しくアンカーしたオリゴ(dT)プライマーのみがピロリン酸化されるようにします。既知量のmRNAを含むスタンダードmRNAの反応で合成された光のユニット数と比べることでサンプル中に含まれる未知量のRNAを定量することができます。精製した1.2kb合成カナマイシン転写産物がmRNAスタンダードとして提供されます。



ヒント

RNA単離の成否は組織/細胞を効率良く破碎すること、内在性のRNaseの迅速な不活性化、DNAやタンパク質の除去など、様々な要因が関与しています。内在性RNaseの不活性化の他に、サンプルの調製や精製の過程でRNase活性を持ち込まないということも、最も重要な要因のひとつです。ここでは、より確実なRNAの解析や保存、精製の為のアドバイスについて述べています。

RNase-フリーの環境を作る — RNase-フリーの環境はインタクトなRNAを単離するために極めて重要です。RNA単離をはじめる前に、RNA分解の対策について紹介している第1章『RNaseから大切なRNAを守る』をお読みください。また、合わせて(7)もご覧ください。

RNA 抽出前のサンプルの処理と保存方法 — 多くの細胞や組織は簡単な破碎操作で処理できます。しかし筋肉や結合組織を大量に含むような組織では効率良くRNaseを阻害、不活性化するために、細かく切り刻んだりすり潰したりといった操作が必要になります。できるだけ迅速にサンプルを破碎することは、内在性のRNaseを急速に不活性化するために重要です。速やかに組織を処理することが困難な場合、変性剤を含むバッファー中でサンプルを処理し、RNA抽出が終了するまでは可能な限り-70°Cに保つようにしてください。代わりの方法として、抽出前に液体窒素で凍結させておくこともできます。

取り扱いに注意が必要な組織からのRNA単離 — 開始サンプルの種類によってRNAの単離が難しい場合があります。RNase活性が特に高い組織、脂質やグリコーゲンを大量に含むような組織等では特に問題となります。プロメガのRNA精製システムでは、こうした組織から最大限の収量を得るために、一部を改良したプロトコルを紹介しています(18-21)。

RNAサンプルの沈殿 — RNAは精製と濃縮のために沈殿させます(22,23)。少量のサンプルや希釈したRNAを沈殿させるときに、RNase-フリーのグリコーゲンなどをキャリアーとして使うと、収量の増加が見込めます。グリコーゲンは核酸を基質とした反応に影響を及ぼさないで、核酸分子をキャリアーとして用いた際のバックグラウンドを除くことができます。さらにRNAの沈殿量の増加とグリコーゲンによる沈殿物の体積増加によって、ペレットを目視で確認することもできます。またサンプル溶液に等量の5M酢酸アンモニウムを加え、20分間氷上でインキュベートすることによりRNAは選択的に沈殿するので、DNAと分離することができます。

Poly(A)⁺ RNA の選別 — Poly(A)⁺ RNAの使用により、後のアプリケーションでさまざまな利点が得られます。例えばノーザンブロットでは高いシグナル/ノイズ比が得られます。またcDNA合成やRT-PCRではmRNA非依存的な合成を抑制することができます。しかし、total RNAの単離が望まれる場合や、目的のPoly(A)⁺ RNA 固有の問題(poly(A)テールが短いなど)によって精製できない場合があります。非常に少量のtotal RNA からのpoly(A)⁺ RNAの精製も技術的に難しい問題です。限られた量のサンプルからのpoly(A)⁺ RNAの精製はPolyATtract® System 1000(6)を用いたダイレクト精製により十分な収量をあげることができます。

Poly(A)⁺ RNA単離手法の比較 — 核内で修飾される新生RNAに付加されるポリアデニル酸テールは、細胞性RNAやDNAの混合物からのpoly(A)⁺ mRNA の精製に利用されます。この精製はpoly(A)配列にpoly(dT)をアニーリングさせ、支持体に吸着させる事によって行われます。Poly(A)⁺ RNA を捕らえるためには、バッチ法、oligo(dT)セルロースを用いたカラムクロマトグラフィー、磁性体による吸着の3つの主要な手法があります。従来から行われてきたバッチ法には、支持体中のボイド容量が大きいという難点があります。その結果、非ポリアデニル化RNA の除去効率が悪くなったり、支持体からの液量が多いため溶出の際にサンプルが希釈されてしまうことになります。

カラムクロマトグラフィーでは時間がかかり、こちらの方法でも溶出量が増えてしまいます。プロメガのPolyAtract® Systemは迅速なmRNA精製のために磁性体技術を応用し、ビオチンとストレプトアビジンの強固な親和性を利用しています(図2-2)。この手法は極めて効率的であり、どのようなスケールにも対応できます。

Total RNAからのPoly(A)⁺ RNAの収量 — total RNAにはmRNA、rRNA、tRNAが含まれています。Poly(A)⁺ RNAはtotal RNAのおよそ1%であり、精製後のサンプルは極めて少量となります。そのため精製の操作中やその後の実験の過程ではRNaseを混入させないように、細心の注意が必要です。

精製したRNAの保存 — RNAは専用のコンテナを使用し、-80°Cで保存してください。使いやすい分量に分注し、凍結融解を数多く繰り返さないようにし、大量のサンプルを一度で汚染させてしまう危険を避けてください。長期の保存または貴重なサンプルを保存する際には、分注しておいたRNAサンプルに1/10容量の3M酢酸ナトリウムと2倍量のエタノールを加え、沈殿したまま-80°Cで保存してください。

RNAの純度 — RNAの純度を評価するために頻用されるアッセイ法は260nm と280nmの吸光度比です。分子生物学の一般的な実験書では260/280の比が1.8~2.0にあるとき、タンパク質の混入が極めて少ないRNAサンプルであると記述されています。この方法は簡便であり、十分に目的に適った方法である一方で、計測方法に潜在的な限界があることに注意しなくてはなりません(24)。一般に核酸精製にはフェノールやEDTAのような多くの化合物が使用され、こうした化合物の中には、その後に続く実験を阻害するものが含まれています。これら化合物のコンタミネーションは吸光度260nmと240nmの比で計測されます(私信、25)。吸光度比は1.8以上にすべきです。一方、 A_{260}/A_{280} の吸光度比が1.0程度またはそれ以下のときには、RNA の精製に頻繁に用いられるフェノールやEDTAの混入が考えられます。

インタクトな RNA — 細胞性RNAが分解されていないかどうか、変性ゲル電気泳動で確認します。数種類の変性剤がありますが、グリオキサールとホルムアルデヒドが最も広く使われています。グリオキサールゲルは毒性も低く、扱いやすいのですが、ホルムアルデヒドゲルの方がノーザンブロット解析等で感度が高いと報告されています。一般的には1~10µgのtotal RNAまたは0.1µgのPoly(A)⁺ RNAを1レーンで分離できます。泳動後にはエチジウムブロマイドで染色し、観察できます。サンプルは0.1mg/mlエチジウムブロマイド色素で染色します。染色には泳動後に染める方法、加熱融解させたゲルに加える方法、泳動前に直接サンプルに加える方法があります。プロメガでは泳動前に直接サンプルに加える方法を推奨します。この方法は最も感度が高く、バックグラウンドも低くおさえられます。total RNA が完全であるかどうかは、リボソームRNAのシャープなバンドによって確かめられます。Totalまたは poly(A)⁺ RNA が分解されていないかどうかは、アガロースゲルを泳動した後、メンブレンに転写して放射性同位元素で標識したプローブによって確かめることもできます(26)。

Poly(A)⁺ RNAのモル濃度の決定 — サンプル中のPoly(A)⁺ RNAのモル濃度を決定する手法が(27)で紹介されています。この技術ではpoly(A)ポリメラーゼによって放射性同位元素をRNAの3'側末端に取り込めています。取り込まれた標識体は12~18塩基のoligo(dT)の存在下でRNase Hの作用により、選択的に除去されます。この反応はRNase H が、oligo(dT)とハイブリダイズすることによって形成されたDNA-RNA ハイブリッド鎖上のRNA鎖のみを分解する性質を利用しています。



Q&A

Q. サンプルから取れるRNAの量はどのくらい？

RNA精製は難しく十分な収量がえられないこともあり、RNAの精製度や収量を前もって予測しなければならない場合があります。収量の予測のための最初のポイントは、生物自体に関するものです。細胞中に存在するRNA量は、検体の種類やその検体の代謝活性によって左右されます。従って、サンプルの質がRNAの収量の評価に影響すると考えます。サンプル処理の工程、細胞破碎または溶解後直ちにヌクレアーゼを不活性化することが、効率的なRNAの精製方法のポイントになります。表2-6に様々なサンプルからどのくらいのRNAの収量が得られるかの目安を示します。

表2-6. 組織と培養細胞からのTotal RNA と mRNA の予想収量

組織	Total RNA	mRNA
	有機溶媒を利用した抽出方法 (RNAgents® Total RNA Isolation System)	磁性体を利用し直接、培養細胞または破碎された組織からの抽出 (PolyATract® System 1000)
マウス 肝臓	6.6 mg/g組織	220µg/g
マウス 腎臓	3.1mg/g組織	328µg/g
マウス 肺	1.9mg/g 組織	100µg/g
マウス 脾臓	8.3mg/g組織	72µg/g
マウス 小腸	2.3mg/g組織	NA (実験データなし)
ヒト 白血球	1.3mg/10 ⁶ cells	NA
HeLa細胞	1.6mg/10 ⁶ cells	NA
マウス 脾臓	NA	370µg/g
NIH 3T3細胞	NA	200µg/g (約6x10 ⁶ cells)

SV Total RNA Isolation System

Q.SV Total RNA Isolation Systemには従来のRNAの分離方法と比べてどのような利点がありますか？

SV Total RNA Isolation Systemには以下の利点があります。

- 高収量のTotal RNAが得られます (表2-3を参照)
- 手順が迅速・簡単です
- 遠心法と吸引法の選択ができます
- 組織、細胞、全血など様々なサンプルからtotal RNAを分離できます
- Spin Column AssemblyとSterile Elution Tubeが便利な個別のパッケージ入りです

Q.SV Total RNA Isolation Systemを使うと、RNAの収量はどれくらいですか。また様々な組織から精製されたTotal RNAの純度はどれくらいですか？

表2-3に示されている値は、プロメガで得られた結果の平均です。収量は組織の種類や動物の代謝の状態によって異なります。精製されたRNAは、RT-PCRやノーザンブロッティングを含む通常の分子生物学のアプリケーションに使用できます。

Q.精製したRNAにゲノムDNAの混入はありますか？

開始のサンプル量がプロメガの推奨する量を超過していなければ、DNase I処理の手順によりゲノムDNAのキャリアオーバー(混入)は最小限にとどめられます。このシステムを使って精製されたtotal RNAを50ng用いてRT-PCRを行ったとき、ゲノム

DNAは検出されませんでした(図2-2)。

SV Total RNA Isolation Systemを使って、表2-3に示された推奨するサンプル量を超過した場合、ゲノムDNAが混入する可能性があります。精製したRNA中へのゲノムDNAの混入が懸念される場合は、単離したRNAをRQ1 RNase-Free DNase (カタログ番号: M6101) で処理した後、フェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈殿を行うとゲノムDNAを除去できます。

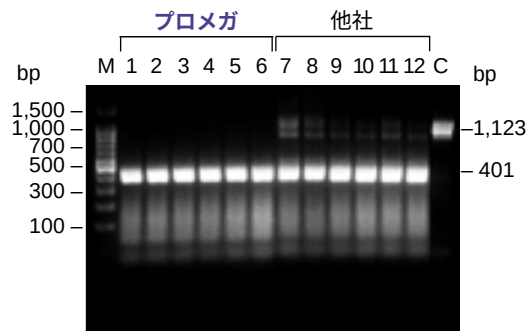


図2-2. RT-PCR による混入ゲノム DNA の比較

Total RNA はプロメガ及び他社製品を用いて、マウス肝臓30mgから単離し、イントロンを挟む IL-1β プライマーで RT-PCR を行った。ゲノムDNA の混入があると目的バンド(401bp)の他に1,123bpのバンドが観察されます。

Q. SV Total RNA Isolation Systemを植物組織、バクテリア、または酵母からのRNA単離に使うことはできますか？

SV Total RNA Isolation Systemを使って、タバコやトマト、シロイヌナズナの葉からのRNA単離に成功しています。グラム陽性菌やグラム陰性菌からのRNAの単離にもご利用いただけます。また、少し修飾したプロトコルを用いると酵母からRNAを単離することもできます。これらのアプリケーションに関する詳しいプロトコルは下記のサイトでご覧いただけます。

http://www.promega.com/jp/jp_tech/wiz_application.htm

Q.プロトコルで薦めている容量より少ない容量で溶出できますか？

お奨めしている溶出液量は50µl以上となっています。25µlの滅菌水で溶出した場合は、RNAの収量が減少します(表2-7参照)。より濃度の高いRNAサンプルが必要な場合は、Speed-Vac®でRNAを乾燥し、希望する容量になるよう溶かします。

表2-7. 様々な溶出容量ごとのRNAの収量の例

溶出液量 (µl)	Total RNA の収量 (µg)	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀
25	101.4	2.25	2.01
50	136.9	2.33	1.95
100	137.9	2.39	1.85
200	141.0	2.43	1.75
(2 x 100)			
200	131.0	2.44	1.73

列2~4の値は2サンプルの平均値



Q. SV Total RNA Isolation SystemをゲノムDNAの単離に用いることはできますか？

SV Total RNA Isolation Systemは、スタンダード・プロトコルからDNase処理の手順を省くだけでゲノムDNAの精製に使うことができます。このシステムでは1mlの血液から0.75~1.5μgのDNAが得られ、増幅反応に使うことができます。また、RNAもいっしょに精製されます(Promega Notes 69参照)。

Q. RNAの収量と純度はどのように数値化したらいのですか？

十分なRNAがある場合は、total RNAの収量を260nm(A_{260})の波長に設定した分光光度計で測定できます。吸光度1ユニットは1mlあたり40μgの一本鎖RNAに相当します。

純粋なRNAは、 A_{260}/A_{280} の吸光度の比率が2.0を示します。 A_{260}/A_{230} の比率からもサンプルの純度がわかります。 A_{260}/A_{230} が2.0よりも小さい場合は、Lysis Buffer中のグアニジンチオシアネートまたはβ-メルカプトエタノールが残っていることを示します。その場合、RNAを酢酸塩とエタノール(RNase-free)で沈殿させます。

Q. プロメガではTotal RNAの精製用に、RNAgent® Total RNA Isolation SystemとSV Total RNA Isolation Systemを販売しています。RNAの精製法はどのように選んだらいいのですか？

どちらのRNA精製システムでも、RT-PCRや、cDNAライブラリーの構築、ノーザンブロットングなど、様々な精製後のアプリケーションにお使いいただけるRNAが得られます。

SV Total RNA Isolation Systemは、少量のサンプルから迅速にRNAを精製するカラムベースのシステム(遠心法または吸引法による)です(表2-5参照)。このシステムは、フェノール/クロロホルムによる抽出や塩/エタノールによる沈殿を必要としません。DNase I 処理が精製手順に組み込まれているので、RNAへのゲノムDNAの混入がほとんどありません。

RNAgent® Total RNA Isolation Systemは、グアニジンと酸性フェノールベースのシステムで最大6gの組織からのRNA精製に使用できます(4)。このシステムには2つのプロトコルがあり、スタンダードプロトコルでは約2.5~3時間、簡易プロトコル(RT-PCRで使用するRNA用に簡略化されています)では90分かかります。

PolyAtract® mRNA Isolation Systems

Q: PolyAtract® System 1000 はどのように機能しますか？

サンプルをグアニジンチオシアネートバッファーおよびβ-メルカプトエタノールでホモジナイズし、Biotinylated Oligo(dT) Probeを加えmRNAとアニールさせます。細胞残渣とタンパク質を遠心により除去すると、溶液中にはプローブとmRNAのハイブリッドが留まります。MagneSphere® Streptavidin Paramagnetic Particlesで捕獲した Biotinylated Oligo(dT) ProbeとmRNAとのハイブリッドはMagnetic Separation Standで捉えられ、ハイブリダイズしないRNAは洗浄除去されます。組織、培養細胞から高品質のmRNAを30分以内に単離することができます。

Q: PolyAtract® mRNA Isolation Systemで得られたmRNAの収量が低い場合に考えられる原因とは？

mRNAの収量はスタート時のtotal RNAサンプルの質やPolyAtract® mRNA Isolation System操作中におけるサンプルの取扱い方など様々な要因が影響します。

多くの問題点の例として…

- 1) スタート時のtotal RNAサンプルがインタクト（濃度が既知であり、しかも良質）であることが重要です。
 - A) サンプルはアガロースゲルに泳動してエチジウムブロマ이드で染色し、RNAのバンドが明確でスメアリングを起こしていないことを確認するべきです。また、上部 (28S) のリボソームRNAバンドは下部 (18S) のものより約2倍の強度が見とめられるべきです。スメアリングが起こっていたり、リボソームRNAが観察されない場合、RNaseが混入していることを示しています。RNaseの混入が見とめられた場合は再度RNAを単離してください。
 - B) サンプルをアガロースゲルに泳動し、エチジウムブロマ이드染色で強度を見るとときには既知濃度のサンプルと比較することが理想的です。サンプルにDNAが混入している場合、RNA濃度を260nm (A_{260}) での吸光度測定だけで判断すると、過大に見積もる可能性があります。RQ1 RNase-Free DNase (カタログ番号 M6101)で処理することによりDNA混入サンプルからDNAを除去することができます。
 - C) 分光測定による分析の場合、 A_{260}/A_{280} 比は1.7~2.0となるべきです。この比率が低い場合には通常タンパク質の混入が、反対に高い場合はグアニジンチオシアネートやβ-メルカプトエタノール (Total RNA抽出方法にこれらが使用されている場合) の残存が原因になっています。調製したRNAにタンパク質が混入している場合、フェノール:クロロホルム:イソアミルアルコールで再抽出してください。その他の夾雑物はエタノール沈殿で除去できます。
- 2) サンプル中でのBiotinylated Oligo(dT) ProbeとmRNAのハイブリダイゼーションは温度と塩濃度 (SSC) に依存します。
 - A) プローブの捕獲前にアニーリング反応の温度を十分に下げないと、収量が下がる可能性があります。これは特に暖かい実験室でしばしば問題になります。Biotinylated Oligo(dT) ProbeとmRNAのアニーリング反応は室温 (22~25°C) になるまで十分に時間をかける必要があります。
 - B) もしも、アニーリング反応でSSCが含まれないか、または0.5Xおよび0.1XのSSC洗浄液が不適切に調製されている場合、mRNAはハイブリダイズしないか、またはハイ



ブリッドが十分形成されず融解してしまいます。この場合、保存していた上澄み（最初の粒子を捕獲するステップからの）にSSCを加えた後、MagneSphere® Streptavidin Paramagnetic Particleペレットに加え、適切な濃度のSSCで洗浄を繰り返すことでmRNAを回収することができます。

- C) もしも最後の洗浄後、チューブに塩が多く残っている場合は、mRNAがBiotinylated Oligo(dT) ProbeとmRNAとのハイブリッドから効率的に溶出されていない可能性があります。その場合はNuclease-Free Waterで再度溶出することによりBiotinylated Oligo(dT) Probe - mRNAハイブリッドからmRNAが得られることがあります。

Q: PolyATtract® mRNA Isolation Systemに使用されているMagneSphere® Streptavidin Paramagnetic Particleのサイズおよび結合容量は？

MagneSphere® Streptavidin Paramagnetic Particleは直径の平均が0.5µmの不規則な球体で、表面積は100~150mm²/mgです。粒子の結合容量はmg粒子あたり0.75~1.25nmol Biotinylated Oligo(dT) Probeで、濃度1mg/mlで供給されます。

Q: Biotinylated Oligo(dT) Primerの長さは？

Biotinylated Oligo(dT) Probeの長さは25merで18個の炭素原子（スパーサーアーム）を挟んでビオチンが共有結合しています。

Q: PolyATtract® SystemsのMagnetic Separation Standの代わりにどんなマグネットでも使用できますか？ または MagneSphere® Streptavidin Paramagnetic Particleを遠心することはできますか？

Magnetic Separation Standはネオジム-コバルトでできた強力な希土類磁石です。このシステムで使用するマグネットは、チューブの側面にMagneSphere® Streptavidin Paramagnetic Particle全てを引きつけるだけの強さが必要です。通常の磁石は、サンプルから粒子を部分的に引きつけるかもしれませんが、すべてを引きつけることはできないので、代用品として使用できません。サンプルの遠心は粒子が凝集する原因となり、充分なmRNAの収量は期待できません。さらに、夾雑物が粒子とともに沈殿することがあるため、サンプルの遠心は行わないでください。

Q: MagneSphere® Streptavidin Paramagnetic Particleは再利用できますか？

MagneSphere® Streptavidin Paramagnetic Particleは使用前、30分以内に洗浄し、再懸濁しなければなりません。保存バッファーにはこの粒子を安定化させるために必要なBSAが含まれており、粒子を洗浄することにより除去します。MagneSphere® Streptavidin Paramagnetic Particleは洗浄して再利用することはできません。

Q: Biotinylated Oligo(dT) Probe と MagneSphere® Streptavidin Paramagnetic Particleとの結合はSDSによって影響されますか？

はい、SDSの存在はストレプトアビジンとビオチンの相互作用に影響をあたえます。5% SDS (テストされた最高の濃度)の場合、68% のBiotinylated Oligo(dT) Probe - mRNAハイブリッドサンプルしか回収されませんでした。

その他

Q: 少量のRNAを正確に定量する限界とは？

1 ml以下のサンプルを測定するときにはセミマイクロかマイクロセルキュベットを使用します。マイクロショートキュベット（高さ25mm）では300-400µlのサンプルを測定することが出来ますが、測定機種により異なりますのでご注意ください。分光光度計の測定可能な最低容量は光線の通る位置により決まります。詳細に関しては、光度計のマニュアルをご覧ください。メーカーまでお問い合わせ下さい。短い光路長による計測も可能ですが、正しい数値を出すためには、ある濃度以上のmRNAが必要です。キュベットの標準光路長は1cmです。サブ-マイクロセルでは10µlまで計測できるものがあります。それらのキュベットがご使用の機種に適合しているか確認する必要があります。黒い遮光素材で覆われているキュベットは低いS/N比を得ることが出来ます。キュベットの窓は（研磨石英）で200 nm以下で使用出来ることが条件です。ポリスチレンやアクリル製のキュベットは230-280 nmでは使用できないので適しません。

計測値が0.02から0.1の場合、一般的に誤差が多く数値の信頼度が低くなりますので注意して下さい（機種により異なります）。1.0 A₂₆₀ ユニットは1本鎖RNAで40µgに相当します。従って、正確な測定が必要な場合、濃度が4.0µg/ml 以上のRNA溶液の測定を推奨します。

Q: mRNAを正確に定量するには？

cDNA合成やRT-PCRを行う前、またはDNAチップ用のcDNAプローブを合成する際にmRNAを正確に定量することは重要です。プロメガのpoly(A) mRNA Detection System はrRNA、tRNAが混在する中、mRNAのみを定量することができます。詳細については5ページをご覧ください。



アプリケーション

(PN:Promega Notesの略称。NN:Neural Notesの略称。

www.promega.com/pnotes

www.promega.com/nnotes でご覧いただけます。

() 内はページ

RNAgents® Total RNA Isolation Kit

- PN029(5) : 大腸菌からのRNA精製 (ライソザイムを使用)
- PN036(17) : フェノール抽出の影響や短時間用に改良したプロトコルの紹介
- PN054(2) : トウモロコシの様々な組織 (胚、小根、子葉鞘、胚乳、葉) からの精製
- PN055(10) : RT-PCR用の改良プロトコルの紹介、サンプル量毎の収量データ、ノーザンブロットのデータ
- PN061(33) : Q&A、個々の構成試薬の役割の説明、改良点、アプリケーション、使用できるサンプル、収量、開始サンプル量、RT-PCRプロトコルなど
- PN062(11) : 少量のヒト血液からのRT-PCR用のRNA精製

PolyATtract® mRNA Isolation Systems

- PN025(1) : 全工程図、精製の原理、サンプルに対する収量の値、精製したmRNAの純度、精製したmRNAの *in vitro* 翻訳
- PN033(6) : システム改善後の収量データなど
- PN056(27) : Q&A
- PN060(14) : 動物組織・植物組織・動物細胞・Total RNAからの精製、サンプル量毎の試薬使用量の一覧
- PN075(10) : Biomek® 2000を用いた96ウェル対応の組織からのmRNA直接精製プロトコル、RT-PCRデータ、品質データなど

PolyATtract® System 1000

- PN039(7) : マウス肝臓からの直接精製、マウス組織・培養細胞からの精製データ、精製したmRNAからのcDNA合成
- PN041(14) : 酵母からのmRNA精製データ
- PN044(10) : タバコ葉・トウモロコシ葉からの収量データ
- PN054(2) : トウモロコシの胚・葉からの精製データ、ノーザンによる確認
- PN060(14) : 動物組織・植物組織・動物細胞・Total RNAからの精製、サンプル量毎の試薬使用量の一覧
- PN062(11) : 少量のヒト血液からのRT-PCR用のRNA精製
- NN012(20) : マウスおよびラット脳からのmRNA精製

Streptavidin MagneSphere® Paramagnetic Particles

- PN066(17) : PolyATtract®システムで用いられているParamagnetic Particlesの形状・性能・使用方法などに関する説明

SV Total RNA Isolation Kit

- PN064(7) : 精製プロセスの概要説明、ラットやマウス組織・培養細胞からの精製 (収量と品質)、ヒト血液からのTotal RNA精製
- PN067(16) : Q&A、システムの概要、収量や純度、植物組織・バクテリア・酵母からの精製など
- PN068(23) : ヒト血液 (1-3ml) からの精製、抗凝血剤の影響や血液の保存状況による影響を示すデータなど
- PN068(28) : 植物の葉 (トマト)、酵母 (*S. cerevisiae*)、大腸菌 (*E. coli*) からの精製プロトコルと収量・純度のデータ
- PN069(17) : 脳組織からのRNA精製、精製産物のプロメガRT-PCRプライマーを用いた確認
- PN069(19) : ヒト全血からのゲノムDNAとRNAの同時精製、手法の流れ図、ゲノムDNAとRNAの単離データ (マウス組織および血液)、ゲノムDNAとRNAの増幅データ、*in vitro* 翻訳、血漿からのHCVウイルスRNAの単離
- PN071(2) : カキ幼生からのRNA精製プロトコルと収量・純度のデータ
- NN012(20) : マウスおよびラット脳からのゲノムDNAの精製



参考文献

1. Ausubel, F.M. et al. (1996) *Current Protocols in Molecular Biology* **2**, John Wiley & Sons, New York, Chapter 4.
2. Chirgwin, J.M. et al. (1979) *Biochemistry* **18**, 5294.
3. Aviv, H. and Leder, P. (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**, 1408.
4. *RNAgents® Total RNA Isolation System Technical Manual #TM021*, Promega Corporation.
5. *PolyATtract® mRNA Isolation System Technical Manual #TM228*, Promega Corporation.
6. *PolyATtract® System 1000 Technical Manual #TM228*, Promega Corporation.
7. Groskreutz, D. and Schenborn, E. (1995) *Promega Notes* **48**, 8.
8. Dodds, J.A., Morris, T.J. and Jordan, R.L. (1984) *Ann. Rev. Phytopathol.* **22**, 151.
9. Matthews, R.E.F. (1991) *Plant Virol., 3rd Edition*, Academic Press, San Diego.
10. Santos, N. and Gouvea, V. (1994) *J. Vir. Meth.* **46**, 11.
11. Franklin, R.M. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **55**, 1504.
12. Choi, G. and Randles, J. (1996) *Biotechniques* **23**, 610.
13. Ausubel, F.M. et al. (1993) *Complete Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley and Sons, NY.
14. Flegr, J. (1987) *Prep. Biochem.* **17**, 423.
15. Valverde, R.A. (1990) *Plant Dis.* **74**, 255.
16. DePaulo, J.J. and Powell, C.A. (1995) *Plant Dis.* **79**, 246.
17. Blumberg, D. (1987) *Meth. Enzymol.* **152**, 20.
18. Chirgwin, J.M. et al. (1979) *Biochemistry* **18**, 5294.
19. Puissant, C. and Houdebine, L. (1990) *Biotechniques* **8**, 148.
20. Monstein, H., Nylander, A., and Chen, D. (1995) *Biotechniques* **19**, 340.
21. Mathy, N., Lee, R., and Walker, J. (1996) *Biotechniques* **21**, 770.
22. Wallace, D. (1987) *Meth. Enzymol.* **152**, 41.
23. Kamdar, S. and Evans, R. (1992) *Biotechniques* **12**, 632.
24. Glasel, J. (1995) *Biotechniques* **18**, 62.
25. Ausubel, F.M. et al. (1996) *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 2, John Wiley & Sons, New York, A.3D.1.
26. *Riboprobe® in vitro Transcription Systems Technical Manual #TM016*, Promega Corporation.
27. Krug, M. and Berger, S. (1987) *Meth. Enzymol.* **152**, 262.
28. *SV Total RNA Isolation System Technical Manual #TM048*, Promega Corporation.

製品案内

Total RNA精製 (スピンカラムタイプ)

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
SV Total RNA Isolation System	50回分	Z3100	28,000
SV Total RNA Isolation System, Trial Size	10回分	Z3101	10,000
Miniprep Vacuum Adaptor	20個	A1331	2,000

Total RNA精製 (液相分離タイプ)

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
RNAgents® Total RNA Isolation System	1システム	Z5110	23,000

mRNA精製 (Total RNAからの精製)

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
PolyATtract® mRNA Isolation System II with Magnetic Stand	1システム	Z5200	26,000
PolyATtract® mRNA Isolation System I	1システム	Z5210	21,000
PolyATtract® mRNA Isolation System III with Magnetic Stand	1システム	Z5300	26,000
PolyATtract® mRNA Isolation System IV	1システム	Z5310	21,000

mRNA精製 (組織、細胞からのダイレクト精製)

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
PolyATtract® System 1000 without Magnetic Stand	1システム	Z5400	59,000
PolyATtract® System 1000 Magnetic Separation Stand	1個	Z5410	15,000
PolyATtract® System 1000 with Magnetic Stand	1システム	Z5420	69,000

mRNA定量システム

製品名	サイズ	カタログ番号	定価(¥)
Poly(A) mRNA Detection System	100回分	K4040	35,000



第3章 *in vitro* 転写

はじめに

in vitro 転写とは、*in vivo*での転写系を*in vitro*で模倣する行程で、精製された成分の存在下でRNAポリメラーゼにより鋳型DNAからRNA転写産物が合成されます。*in vitro*で合成されたRNAは、タンパク質の*in vitro*合成、ハイブリダイゼーション用のRI標識したRNAプローブの産生や卵母細胞に注入するためのRNA大量調製などの多くのアプリケーションに広く利用されます(1-12)。

一般的な考慮事項

*in vitro*で産生されたRNA転写産物を多く得るためには、鋳型として高質なDNAを使うことが必要不可欠です。エタノール沈殿は鋳型となるDNAから塩や転写反応を阻害する混入物を除くために有用です。RNA転写産物を産生するための鋳型として、直鎖状およびスーパーコイルのどちらでも用いることができます。スーパーコイル状のプラスミドを鋳型として使う場合や特定部分の転写産物が必要な場合、ローリングサークル転写を起こさないようにプラスミドにRNAポリメラーゼ終結シグナルを組み込むことが必須です。ローリングサークル転写が起こった場合、反応産物をゲル電気泳動で解析したときに、予想されるRNA転写産物よりも大きなバンドとして確認されます。この問題の解決には、平滑または5'突出末端を生成する制限酵素を用いて鋳型を直鎖状にすることを推奨します。3'突出末端部位でRNAポリメラーゼは反転し、目的の転写産物に対して相補的な転写を開始する可能性があるため3'突出末端を生成する制限酵素で鋳型を直鎖状にすることは避けてください。

プロメガ*in vitro*転写システム

バクテリオファージのSP6、T7またはT3プロモーターを含んでいる鋳型DNAから適当なRNAポリメラーゼ (SP6, T7またはT3) を用いて転写を行った場合、μgからmg単位のRNAを産生することができます。プロメガではさまざまなプロモーター領域の組み合わせを持つローニングベクターを販売しています。これらのベクターは多様な研究アプリケーションに用いられるRNA転写産物の合成に対応して設計されているので、Riboprobe® SystemやRiboMAX™ RNA Transcription Systemと組み合わせてお使いいただけます(表3-1)。表3-2ではこれら2種類のキットの特長を比較します。

in vitro 転写 (標識用)

Riboprobe® *in vitro* Transcription System

Riboprobe® Systemは*in vitro*における比活性の高い一本鎖RNAプローブやμg単位 (5~10μg) の転写産物の調製用にデザインされています(図3-1)。RI標識したRNAプローブを作成するために、RI標識されたrUTP、rCTPまたはrGTPを転写反応に組み込みます。RI標識されたATPの使用は、組み込みキネティックスの効率が低いため推奨しません。rNTPは³⁵S、³²P、³³Pまたは³Hで標識できます。複数の標識されたNTPを反応に用いることにより、高い比活性をもつプローブが産生されますが、このプローブは自己崩壊が急速に起こるため、以降のアプリケーションに影響を及ぼすことがあります。

表3-1. アプリケーション別プロメガ*in vitro*転写システムの比較

アプリケーション	転写システム	
	Riboprobe® System	RiboMAX™ System
メンブレン	+++	+
ハイブリダイゼーション		
RNaseプロテクション	+++	+
アッセイ		
<i>in situ</i>	+++	+
ハイブリダイゼーション		
ライブラリー	+++	+
スクリーニング		
転写マッピング	+++	+
<i>in vitro</i> 翻訳	+++	+++
卵母細胞への注入	+	+++
哺乳類細胞への	+	+++
トランスフェクション		
リボザイムの産生	++	+++
低分子RNAの合成	++	+++

キー: (+++) 推奨; (++) 十分に可能; (+) 可能

表3-2. プロメガ*in vitro* 転写システムの特長の比較

目的	Riboprobe® System	RiboMAX™ System
大量RNA生産	-	+++
プローブ合成		
RI標識	+++	-
非RI標識	+++	-
バクテリオファージ		
プロモーター		
T7	+++	+++
SP6	+++	+++
T3	+++	+++
転写産物のキャッピング ¹	+++	+++

¹ 効率的な翻訳のために、一部の転写産物には5'末端にm⁷G(5')ppp(5')G キャップの付加が必要です。*in vitro*合成反応時に、Ribo m⁷G Cap Analog, 40mM (カタログ番号P1711, P1712)を加えることによりキャップの付加が行えます。

注意: 反応液中に存在するおそれがあるRNase活性を阻害するために、プロメガではRNasin® Ribonuclease Inhibitorの添加を推奨しています。
キー: (+++) 推奨; (-) 推奨しない



メンブレンハイブリダイゼーションでは効率的な反応のために全長のプローブを必要としません。一方、転写マッピングのようなアプリケーションでは全長のプローブを必要とします。反応液中のrNTP量が12μMをきると、全長の転写産物が生成されにくくなります。標識ヌクレオチドの濃度が対応する非標識ヌクレオチドで調整されていない場合、標識ヌクレオチドを最終濃度が12~24μMとなるように増やすことをお勧めします。この条件が満たされない場合、全長の転写産物を得ることは難しくなります。

転写産物をRNaseプロテクションアッセイのプローブとして使う場合、このプローブには300~500ntの長さで1~3×10⁸cpm/μgの比活性が必要です。転写産物を合成するときには、[α-³²P]CTP(3,000Ci/mmol)のような比活性が高いrNTPを使ってください。解析時に転写産物を完全にプロテクションする全長のプローブを使うことが重要なので、使用する前にプローブのゲル精製を推奨します。プローブのゲル精製により、鋳型DNAからプローブを分離することで高いバックグラウンドを防ぐことができます。プローブのゲル精製に代わる方法として、プロメガのRQ1 RNase-Free DNaseによる処理と、続けて行うフェノール抽出、エタノール沈殿によってハイブリダイゼーションのバックグラウンドを防ぐことができます。

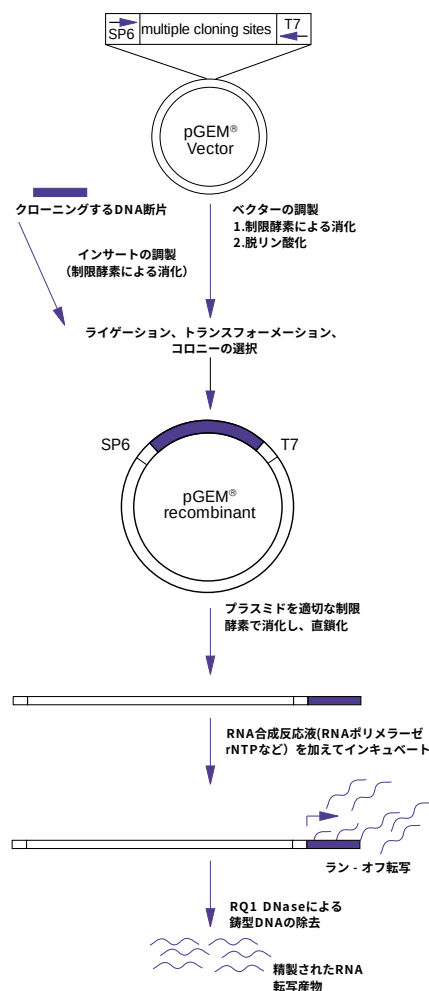


図3-1. Riboprobe® *in vitro* Transcription Systemの概略

Riboprobe® *in vitro* Transcription Systemを使い、非RI標識のプローブも合成することができます。ビオチンまたはディゴキシゲニン修飾された塩基を転写産物に取り込んだり、RNAの3'末端に付加することができます(13,14)。しかし、修飾された塩基の取り込みにより収量は低下します。この手法の代わりに、T4 RNA Ligaseで転写産物の3'末端にビオチンまたは蛍光標識されたヌクレオチドを付加することができます(15)。また、terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)を用いてディゴキシゲニンやビオチンをRNAの3'末端に付加できることが文献に紹介されています(16)。

in vitro 転写 (ラージスケール)

RiboMAX™ Large Scale RNA Production System

卵母細胞への注入や哺乳類細胞へのトランスフェクションのようなアプリケーションのために、大量のRNA転写産物が必要とされる場合、Riboprobe® *in vitro* Transcription SystemよりもむしろRiboMAX™ Large Scale RNA Production Systemを使用して転写反応を行います。RiboMAX™ Systemはmg単位 (2~6mg) の転写産物の調製用にデザインされています(17)。実際の収量は鋳型の配列、転写産物の長さ、鋳型の精製度により変動します。RiboMAX™ SystemはRNA転写産物を大量に調製するため、高比活性プローブの生産には推奨しません。

RNAのキャッピング

Ribo m⁷G Cap Analog

ほとんどの真核生物のRNAは5'末端にm⁷G(5')ppp(5')G キャップ構造を持っています。このキャップ構造は、eIF4Eのような翻訳開始因子の結合、RNAのプロセシングや移行、細胞内ヌクレアーゼからの保護において重要な役割を担っています。キャップを付加されたRNAはライセートや*Xenopus*の卵母細胞を使った*in vitro*翻訳、マイクロインジェクション、核抽出物を使った*in vitro*スプライシングやプロセシングに利用できます。

Ribo m⁷G Cap Analog(カタログ番号P1711およびP1712)は、5' 7-methyl guanosine nucleotide(m⁷G(5')ppp(5')G)です。これは生体内におけるmRNAのキャップ構造形成のように*in vitro*合成されたRNAに組み込まれます。このキャップアナログはプロメガのRiboprobe® SystemやRiboMAX™ Systemでお使いいただけます(17,18)。



ヒント

転写産物のでき具合は、鋳型の性質、精製度、バッファー組成、反応条件などの多くのパラメーターに依存します。*in vitro* 転写反応とそのRNA収量を最適化するためのコツとガイドラインを以下にご紹介します。

鋳型DNAの直鎖化：決まった長さのRNAを生産するために、通常鋳型DNAを*in vitro*転写反応の前に直鎖化します。適当な制限酵素によってDNAを直鎖化し、続いて適したクリーンアップの手順を行います。精製した『直鎖状DNA』が実際、完全に直鎖化されているか、また予想された大きさのDNA断片が存在しているか(分解されていないか)を確認するために、転写反応の前にアガロースやポリアクリルアミドゲル電気泳動により確認してください。ランナーオフ転写を行う場合、目的よりも長い転写産物を産生することがあるので3'突出末端を形成した直鎖状プラスミドを鋳型とすることは避けてください。直鎖状プラスミドをKlenowで処理することにより3'突出末端を平滑末端にすることができます。

一般的な転写産物の比活性：³²P-CTPをRiboprobe® Systemで取り込んだ場合の一般的な比活性は2~2.5×10⁸cpm/μg RNAです。

一般的なRNA収量：Riboprobe® Systemでの一般的な収量は5~10μg RNA/μg プラスミドDNAであり、RiboMAX™ Systemでの収量は2~6mg RNA/50~100μg プラスミドDNAです。

試薬の保存と用法：スぺルミジンの存在下では4°CでDNAが沈殿することがあるので、試薬は室温で調製してください。また、RNAもスぺルミジンの存在下で低温にした場合に沈殿することがあるので、Transcription Buffer中にRNAを凍結保存しないでください。

コントロールの使用：試薬の機能チェックおよびコンタミネーションの検定に備え、常にポジティブコントロールとネガティブコントロールを行ってください。

鋳型DNAの除去：転写反応後、鋳型DNAを取り除くためにサンプルをRQ1 RNase-Free DNaseで処理してください。続いて、フェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈殿で転写産物を精製してください。

RNA転写産物の安定性：転写産物をトランスフェクションやインジェクションのようなアプリケーションに用いる場合、転写産物の安定性は重要です。RNAの安定性を上げる転写産物のキャッピングは転写反応時に行うことができます。SP6 RNAポリメラーゼを使う場合、GTPの最終濃度1mMに対して5mMのキャップアナログを加えてください。T7 RNAポリメラーゼを使う場合には、GTPの最終濃度1.5mMに対して7.5mMのキャップアナログを加えてください。

転写産物ができているかをチェック：ゲルで転写産物ができているかをチェックするときは、RNAをホルムアミドのローディングバッファーで希釈し、ローディングの前に65°Cで5分間加熱することにより通常のアガロースゲルで変性ゲルと同様に確認することができます。

転写産物のゲル解析：RNAラダーと比較した時に、予想と異なったサイズで転写産物が泳動された場合、エタノール沈殿により転写産物を精製することで正しい移動度を示すことがあります。

転写産物の長さ：RiboMAX™ Systemを用いて最大14kbの転写産物を作成することができます。しかし、通常このキットは5~6kbの転写産物の合成に汎用されています。転写反応は37°Cで2~4時間行います。反応条件の詳細はRiboMAX™ SystemのTechnical Manual (TB166)をご覧ください。

ポリメラーゼ効率の上昇：転写反応に0.05% Tween®-20を加えることで、反応におけるポリメラーゼの効率が上がり、より多く転写産物が得られることがあります。

Q&A

Q. Riboprobe® とRiboMAX™ の違いは？

Riboprobe® Systemは高い比活性標識産物 (RI標識など) を合成するためにデザインされています。RiboMAX™ Systemは大量のRNAを合成するためのシステムで、*in vitro* 翻訳やマイクロインジェクションなどに適していますが、高比活性標識産物の合成には適しません。

Q. これらのシステムを使うには何が必要ですか？

適切なプロモーター (T7, T3, SP6など) を持つベクターに、目的のDNA配列をクローニングしたものがが必要です。プロメガの2つのプロモーターを持つpGEM®ベクターが便利ですが、T7, T3, SP6プロモーターを持つベクターであれば使用できます。コンストラクトを大腸菌で増やし、標準的な精製法に従いプラスミドを精製します。あとはこの鋳型DNAを適切なRNAポリメラーゼやバッファー、rNTPを含む転写反応混合液に加えるだけです。

Q. 完全長の転写産物を得るにはどうすればいいですか？

もしも、Riboprobe® Systemのプロトコルで完全長転写産物が得られない場合、転写反応を室温で行うことで完全長転写産物の合成される割合が増える可能性があります。RNAポリメラーゼの種類によってターミネーター配列が異なります。もし、目的のDNA配列にターミネーター配列がある場合は、異なるRNAプロモーターを利用することで解決することができます。また、rNTP濃度を上げることで完全長転写産物を合成できるかもしれませんが、合成したRNAプロブの比活性は低下してしまいます。

Q. 合成したRNAはどのようなアプリケーションに使用できますか？

Riboprobe® Systemで合成したRNAプロブはサザンブロットティングやノーザンブロットティングに使用することができます (19,20)。特にサザンブロットティングでは、RNA:DNAハイブリッドがDNA:DNAハイブリッドよりも熱安定性が強いので、より厳しい条件で洗うことができ、S/N比を高くすることができます。その他、ブランクおよびコロニーリフティング (21) や組織切片の*in situ*ハイブリダイゼーション (22)、染色体*in situ*ハイブリダイゼーション (23) に使用することができます。その他RNaseプロテクションアッセイなどの液相のハイブリダイゼーションを必要とする様々なRNAマッピングにも使用できます。

Q. *in vitro* 転写反応でのRibo m⁷G Cap Analogの取り込み効率はどうのくらいですか？

Riboprobe® SystemやRiboMAX™ Systemを使い、標準的な反応を行った場合、Ribo m⁷G Cap Analogは60~70%の転写産物に5'-ヌクレオチドとして取り込まれます。



Q.標準反応にRibo m⁷G Cap Analogを加えることで収量は減少しますか？

キャップアナログの取り込みによってRNAの収量は標準反応に対して20~50%減少します。14kb以上を目的とした*in vitro*転写反応では、低い比率で転写されたり、予想よりも小さなサイズの転写産物が得られます。これはrGTPが不足しているためと考えられます。このためプロメガではrGTPの濃度を上げるように推奨しています。転写反応の効率とキャップ付加された転写産物の生成量の釣り合いをとるために、キャップアナログ:rGTPの比率を10:1から1:1の範囲で変動させることができます。伸長を促進するために反応温度を30°Cまで下げることができますが、この処置は転写産物の生成量には無関係です。

予想よりも転写産物が短い場合、転写開始が制限されています(律速段階である可能性があります)。このような時には、インキュベーション時間を延長する、RNA polymeraseの量を増やす、鋳型の濃度を上げるなどの対処を行ってください。

Q.ライセートを使った*in vitro*翻訳を行う場合、キャップ付加された転写産物はキャップ付加されていない転写産物よりも効率的に翻訳されますか？

Rabbit Reticulocyte Lysate(RRL)やWheat Germ Extract(WGE)で翻訳反応を行う場合、効率的な翻訳のためにほとんどの転写産物でキャップ構造を必要としません(24,25,26)。キャップ付加されていないRNAでも翻訳反応に加える量を増やすことでタンパク質合成量はキャップ付加されたRNAと同等になります(27)。

RRLでは最大刺激レベルより20mM上の濃度の KClにおいて、キャップ付加されていないRNAからのタンパク質合成に最適な条件を示します(28)。

RRLでの翻訳はmRNAのキャップ構造の存在に比較的影響されません。しかし、一般的に知られているRNA結合タンパク質(hnRNP A1, La, hnRNP 1/PTB, p50)を加えることにより、RRLにおける翻訳にキャップ構造が必要となることをSvitkinらの研究グループは発見しました。これらのタンパク質はキャップ付加されていないmRNAの翻訳を著しく阻害します。一方、キャップ付加されたRNAの翻訳には影響しません(29)。著者らは細胞質に存在するこれらRNA結合タンパク質の機能の一つとして、5'末端のキャップ構造を介した機構によりリボソームの結合を促し、誤った翻訳開始点からの開始を妨げているのではないかと考えています。

RRLとWGEの翻訳キットでは、キャップ付加された転写産物の翻訳効率上がることもあります(17,25,26)。例えば、dihydrofolate reductaseのmRNAの翻訳をRRLで行った場合、キャップ付加されたRNAがキャップ付加されていないRNAの4~8倍のタンパク質を発現することをRestoらは観察しました(30)。

Q.*in vitro*転写/翻訳反応(例えば、TNT[®] System反応)にcap analogを直接加えることができますか？

翻訳が著しく阻害されるため、キャップアナログをTNT[®] Systemを使った反応に直接加えることはできません。また、翻訳反応の前に遊離のキャップアナログを除かなければ、これらは翻訳反応を阻害します。

Q.プロメガの*in vitro* 転写システムで2本鎖RNAを合成することはできますか？

できます。Alvaradoらの論文で、プロメガのT3 (カタログ番号P2083)、T7 (カタログ番号P2075) RNA Polymerasesと、Riboprobe[®] System (カタログ番号P1420、P1430、P1440) を用いてdsRNAを合成し、ディゴキシゲン標識プローブを用いた*in situ*ハイブリダイゼーションで内在性のmRNA転写産物の発現を検出する実験が行われています(31,32)。

参考文献

1. Schenborn, E.T. (1995) *Meth. Mol. Biol.* **37**, 1.
2. Krieg, P.A. and Melton, D.A. (1984) *Nucl. Acids Res.* **12**, 7057.
3. Melton, D.A. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 144.
4. Krainer, A.R. et al. (1984) *Cell* **36**, 993.
5. Krieg, P.A. and Melton, D.A. (1984) *Nature* **308**, 203.
6. Georgiev, O. et al. (1984) *Nucl. Acids Res.* **12**, 8539.
7. Nicole, L.M. and Tanguay, R.M. (1987) *Biosci. Rep.* **7**, 239.
8. Witherell, G.W. et al. (1990) *Biochemistry* **29**, 11051.
9. Turek, C. and Gold, L. (1990) *Science* **249**, 505.
10. Kaplan, G. et al. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 8482.
11. Burgin, A.B. and Pace, N.R. (1990) *EMBO J.* **9**, 4111.
12. Heus, H.A. et al. (1990) *Nucl. Acids Res.* **18**, 1103.
13. Langer, P.R. et al. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 6633.
14. Aigner, S. and Pette, D. (1990) *Histochem.* **95**, 11.
15. Richardson, R.W., and Gumpert, R.I. (1983) *Nucl. Acids Res.* **11**, 6167.
16. Rosemeyer, V. et al. (1995) *Anal. Biochem.* **224**, 446.
17. RiboMAX[™] Large Scale RNA Production Systems Technical Bulletin #TB166, Promega Corporation.
18. Riboprobe[®] *in vitro* Transcription Systems Technical Manual #TM016, Promega Corporation.
19. Melton, D. et al. (1984) *Nucl. Acids Res.* **12**, 7035.
20. Srivastava, R.A.K. and Schonfeld, G. (1991) *BioTechniques* **11**, 584.
21. Hanahan, D. (1983) *J. Mol. Biol.* **166**, 577.
22. Jorgensen, E.M. and Garber, R.L. (1987) *Promega Notes* 10.
23. Matthaei, K.I. and Reed, K.C. (1986) *Promega Notes* 5.
24. Dasso, M.C. and Jackson, J. J. (1989) *Nucl. Acids Res.* **17**, 3129.
25. Rabbit Reticulocyte Lysate Systems Technical Manual #TM232, Promega Corporation.
26. Wheat Germ Extract Technical Manual #TM230, Promega Corporation.
27. Gurevich, V.V. et al. (1991) *Anal. Biochem.* **195**, 207.
28. Kozak, M. (1990) *Nucl. Acids Res.* **18**, 2828.
29. Svitkin, Y.V. et al. (1996) *EMBO J.* **15**, 7147.
30. Resto, E. et al. (1992) *Nucl. Acids Res.* **20**, 5979.
31. Alvarado, A.S. and Newmark, P.A. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 5049.
32. eNotes - Citations. URL: <http://www.promega.com/enotes/incite.htm>

製品案内

in vitro 転写 (ラベリング用)

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
Riboprobe [®] System - SP6	1システム	P1420	32,000
Riboprobe [®] System - T3	1システム	P1430	32,000
Riboprobe [®] System - T7	1システム	P1440	32,000
Riboprobe [®] Combination System - T3/T7 RNA Polymerase	1システム	P1450	37,000
Riboprobe [®] Combination System - SP6/T7 RNA Polymerase	1システム	P1460	38,000

in vitro 転写 (翻訳・大量合成用)

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
RiboMAX [™] Large Scale RNA Production System - SP6	1システム	P1280	35,000
RiboMAX [™] Large Scale RNA Production System - T3	1システム	P1290	35,000
RiboMAX [™] Large Scale RNA Production System - T7	1システム	P1300	35,000
Ribo m ⁷ G Cap Analog	10A ₂₅₄ units	P1711	24,000
Ribo m ⁷ G Cap Analog	25A ₂₅₄ units	P1712	45,000



第4章 RT-PCR

はじめに

polymerase chain reaction (PCR**) はDNAを迅速かつ正確に数千倍から数百万倍に増幅する、極めて有効で感度の高い技術です。PCRの応用法である逆転写PCR(Reverse Transcription-PCR: RT-PCR)は、組織や細胞における遺伝子発現研究の最も有効な手段の一つとして登場しました。本法ではPCRステップに先立って、mRNAの第1鎖cDNAへの転換が行われます。この効果的な実験手法はライブラリーの構築をはじめとして、発現段階における遺伝子発現解析、ディファレンシャル・ディスプレイ、*in vitro*翻訳系のテンプレート合成など、幅広く用いられています。逆転写に酵素については6章をご参照ください。

プロメガ Access RT-PCR System

プロメガのAccess RT-PCR System は、2種類の酵素を用いる手法の感度と1種類の酵素で行う手法の簡便性の両方を兼ね備えています。この2種類の酵素を用いたシングルチューブの反応系(図4-1)は、トリ肉腫ウイルス(Avian Myeloblastosis Virus: AMV)逆転写酵素と *Thermus flavus* (*Tfl*) 耐熱性DNA Polymerase から成り、わずか1pgのtotal RNAから特異的なmRNAを検出し、また10²コピーのコントロールRNAを検出し得る感度を持ちます(図4-2)。AMV/*Tfl* 5× Reaction Buffer は逆転写反応とDNA増幅反応とでバッファの調整が必要ないように最適化されています。そのため操作の手間が省け、コンタミの危険も最小限に抑えられます。

	MuLV/Taq RNA PCR Kit	<i>Tth</i> RNA PCR Kit System	Promega Access RT-PCR
マスターミックスの調整	MuLV	<i>Tth</i>	AMVと <i>Tfl</i>
第1鎖合成	42°C、45分	60°C、45分	48°C、45分
逆転写酵素の失活	99°C、5分	該当しない	該当しない
試薬の追添	Taq、プライマー バッファ	該当しない	該当しない
テンプレートの変性	94°C、2分間	94°C、2分間	94°C、2分間
第2鎖を合成増幅	40サイクル	40サイクル	40サイクル

図4-1. 3通りのRT-PCRプロトコルの概要

RT-PCR の最適化

RT-PCRを行うに当たって、パラメーターの最適化を行うためには多くの要素を考慮しなければなりません。表4-1に反応系に影響を及ぼす様々な要因のいくつかをリストアップし、推奨するサンプル調製法または濃度等を記載しています。RT-PCRは鋳型とプライマーの組み合わせ等によって、それぞれ最適の条件を選択しなくてはなりません。

図4-2. マウス肝臓由来のtotal RNAを鋳型とし、β-アクチンに特異的なプライマーを用いたコントロール反応。540bpのPCR産物を検出

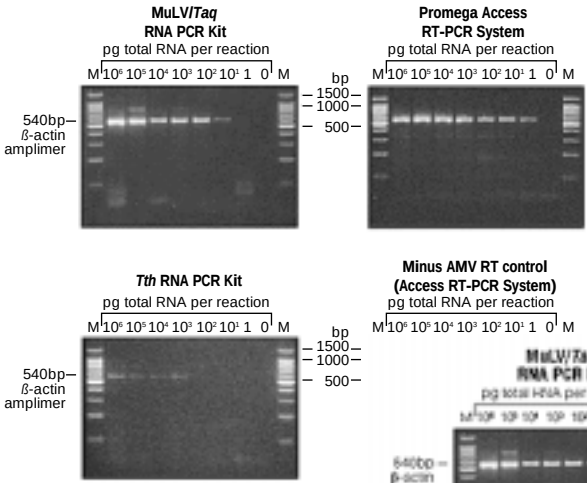


表4-1. RT-PCRの反応条件

反応に影響を与える要因	考慮すべき点	推奨する条件
RNA鋳型	鋳型からのDNA、変性剤、塩等の排除	鋳型の精製にはRNAagents®、SV Total RNA Isolation System、またはPolyATtract® mRNA Isolation Systemを推奨します。
	鋳型の完全性	鋳型が分解されていないことをホルムアルデヒド・ゲル電気泳動で確認してください。Total RNAをご使用の際は18Sと28Sの比率を確認してください。
	鋳型の分解	RNasin® Ribonuclease inhibitorを加えてください。
	1回の反応に必要なテンプレート量	Total RNA: 1pg~1µg Poly (A) ⁺ RNA: 1~100ng
	DNAの混入	混入が予想される場合にはRQ1 RNase-Free DNase をお使い下さい。
プライマー	以降のアプリケーションに依存する濃度	オリゴ(dT)、ランダムヘキサマー、または遺伝子特異的プライマーを使い分けて下さい。備考1をご覧ください。
MgSO ₄	濃度	50pmol~1µmol 3.0µM~0.5mM
dNTPs	濃度	通常200µM
サイクル数	逆転写の温度と時間	備考2をご覧ください。
	PCR	備考3をご覧ください。

備考:

- 3'側のプライマーは、全RNAに対応するプライマー(オリゴ(dT)およびランダムヘキサマー)よりも遺伝子特異的な配列を含むものを可能な限りお使いください(図4-3)。ただしライブラリーの構築にはオリゴ(dT)およびランダムヘキサマーが適しています。特にランダムヘキサマーは転写産物に沿っていくつもプライミングするので、2次構造をとり易い、長いmRNAをクローニング場合に適しています。
- AMVはMMLVに比べ、高温で効率よく逆転写反応が行われるため、Access RT-PCR Systemでは48°C、45分間を目安として温度設定することをお薦めしています。Access RT-PCR Systemは、反応温度を最高58°Cまで上げることができます。高温での反応はRNAの2次構造に起因する問題を最小限に抑えられるので、完全長のcDNA合成において非常に有効です(1~6)。逆転写反応に続き、RNA-cDNA ハイブリットを解離させ、AMV-RTを失活させるために94°C 2分間の熱処理をお薦めします。AMV-RTの不活化は*Tfl* DNA Polymeraseが十分なパフォーマンスを発揮するために必要です(7,8)。



3. 第2鎖cDNAの合成とそれに続くDNAの増幅に関する諸条件は、DNA増幅産物の長さ、またはプライマーのアニーリング温度を考慮し、各自で設定してください。一般的には40サイクルのPCR反応で目的のRNA検出には十分であると言われています。検出しようとするmRNAが希少である場合にはサイクル数を上げるか、nested PCRを行う必要があります。しかしこの場合、僅かながら混入しているゲノムDNAに起因する、非特異的なPCR産物が増加する傾向があるので注意が必要です。こうしたDNAの混入はRQ1 RNase-Free DNase処理を施しても完全に除くことはできません。したがってPCRのサイクル数は必要最小限に抑える必要があります。

第一鎖合成：



図4-3. RT-PCRにおける、異なったプライマーを用いたmRNAからのcDNA第1鎖の合成様式

RNAサンプルのDNase処理

RQ1 RNase-Free DNase

ウシ臍臓から精製されたRQ1(RNA-Qualified) RNase-Free DNaseは、2本鎖および1本鎖DNAを分解し、3'-OHのオリゴヌクレオチドを生成するエンドヌクレアーゼで(9)完全性を維持したRNAが要求されるアプリケーションに使用されます。この酵素は*in vitro*転写後の鋳型DNAの除去(10)やRT-PCRなどで使用するRNAサンプルからのDNA除去(11)、その他ニクトランレーション(12)、ランダムな断片の合成(13)、フットプリンティングにおけるゲノムDNAの切断(13)にもお使いいただけます。

Mg²⁺の存在下では個々のDNA鎖をランダムに切断し、Mn²⁺の存在下では2本鎖をおおよそ同じ部位で切断し、平滑末端または1~2塩基突出した末端を生成します(14)。

RQ1 DNaseの反応停止

DNase I処理が必須の場合、キャリアオーバーを最少にするために、酵素量を低く(1 unit/μg RNA未満)抑えます。RQ1 RNase-Free DNaseを含むDNase IIは、サンプルを単純に熱処理しただけでは十分変性しません。DNase Iの除去を確実にするには、サンプルのフェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈殿による回収をお勧めします。しかし、抽出や沈殿によるサンプル量の減少を回避する場合、RQ1 DNase反応にMg²⁺またはMn²⁺が必要であることを利用して、EDTAやEGTAなどのキレート剤添加により反応を停止させることもできます(図4-4)。プロメガのRQ1 RNase-Free DNaseにはEGTAを含有するRQ1 DNase Stop Solutionが添付されています。DNase反応後にこのStop Solutionを添加した後、65°C、10分間のインキュベーションにより酵素を不活性化し、そのままRT-PCR反応に加えることができます(注意：DNase処理した後のRNAを電気泳動する場合は、反応バッファーやStop Solutionの影響により泳動度に異常をきたすため、フェノール抽出によるDNase Iの不活性化をお勧めします)。

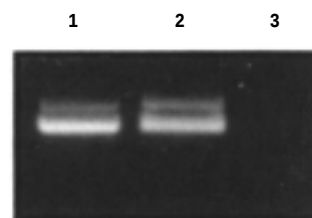


図4-4. RQ1 DNase活性のEDTAによる阻害

RQ1 DNase、1ユニットを、20mM EDTAの存在下または非存在下で20mM Tris-HCl, pH 7.4、100mM NaCl、および10mM MgCl₂中で1μgのpGEM®-4Z閉環状プラスミドDNAとインキュベートした(反応の最終量20μl)。反応は37°Cで10分間行なわれ、1%アガロースゲルで解析した。レーン1、DNaseなし。レーン2、+ EDTA。レーン3、- EDTA。



ヒント

高Tm値プライマーの使用 — アニール温度はTm値によって決まります。高Tm値プライマーを用いることにより、アニール温度を下げずに済むのでPCRにとって有利です。

Tfi DNAポリメラーゼ — Tfi DNAポリメラーゼはテストされた条件下では内在性の逆転写活性は認められません。

マグネシウムの使用 — MgSO_4 の代用として MgCl_2 を使用することはできません。Tfi DNAポリメラーゼは MgSO_4 の添加によって反応性を増加させます。

コントロールの使用 — それぞれのアッセイ系でポジティブコントロールを取ることで、反応液の組成に問題がないかどうかをチェックできます。また、ネガティブコントロールを取ることでコンタミネーションをチェックすることができます。ネガティブコントロールにはAMV-RTを除いた、RNAサンプルを含むすべての反応構成物を使用します。PCRで増幅し得る産物を検出することにより、ゲノムDNAの混入を検出します。

dNTPの濃度 — 高濃度のdNTPは、誤った塩基対の取りこみを増加させ、DNAポリメラーゼの忠実度を減少させることがあります。

AMV逆転写酵素の使用 — AMV逆転写酵素を用いた第1鎖cDNAの合成は、58°Cまで温度を上げることが可能です。しかしながらその活性は50°C以上で著しく減少することが知られています。

試薬の調製 — 使用前に完全に融解し、転倒混和またはボルテックスによりよく攪拌してください。酵素類は氷上に置き、使用する前にボルテックスしてください。混合が不十分な場合、実験結果に影響を及ぼすことがあります。

ミネラルオイルの使用 — 重層用のオイルはヌクレアーゼフリーの高品質オイルをお使いください。オートクレーブしたオイルは用いないで下さい。

RNAの完全性の確認 — RT-PCRを行う前にはtotal RNAが分解していないかどうか、サンプルの一部をホルムアルデヒド変性ゲル電気泳動で確認してください。28S(5.1kb)と18S(1.9kb)リボソームRNAのバンドによって確かめられます。mRNAは2つのrRNAのバンドの間でスミアとなり、分解したRNAは18Sの下に現れます。

RNaseからの保護 — RNasin® Ribonuclease Inhibitor のようなRNase阻害剤を用いてください。

何度試してもうまくいかない場合 — 特にポジティブコントロールからも何も検出されないような場合には、まずサーマルサイクラーのサイクリングが問題なく行われているか、また温度計でウェルの温度が正しく設定温度に達しているかを確認してください。

Q&A

Q. Total RNAをテンプレートとして用いることはできますか。それともpoly(A)⁺ RNAが必要ですか？

ターゲットRNAテンプレートはTotal RNA、poly(A)⁺ RNAまたは*in vitro*転写されたRNAのどれでも構いません。逆転写がうまくいくかどうかは、テンプレートとして用いるRNAの完全性や精製度に依存します。用いるRNAの種類が何であれ、RNA精製の操作中にRNaseフリーの環境が維持されることが重要です。プロメガのRNAagents® Total RNA Isolation System、PolyAtract® mRNA Isolation Systems、およびSV Total RNA Isolation Systemで、Access RT-PCR Systemに十分使用できる純度のRNAサンプルを精製できます。さらに、RNAサンプル中に含まれるDNA量を最少になるよう注意してください。DNAを含む可能性のあるRNAサンプルには、プロメガのRQ1 RNase-Free DNaseのようなRNase-Free DNase IでRNAサンプルを処理することをお勧めします。

Q. DNA Polymeraseを用いて増幅したフラグメントをpGEM®-T、pGEM®-T Easy、およびpTARGET™ Vectorsを使ってクローニングすることはできますか？

Tfi DNA Polymeraseは、3'→5' エクソヌクレアーゼ (プルーフリーディング) 活性を持たず、テンプレート非依存的に3'末端にアデニン塩基を付加します。したがって、Access RT-PCR Systemを使って合成したcDNAは、pGEM®-T、pGEM®-T Easy、およびpTARGET™ Vector Systemsを使ってクローニングできます。

Q. Access RT-PCR Systemを用いて増幅した最長のフラグメントサイズはどれくらいですか？

ヒト骨格筋から精製したtotal RNAからAccess RT-PCR Systemを使ってジストロフィンの3.9kbのフラグメントが増幅されています(15)。しかし、大きなターゲットの増幅は難しく、反応条件を最適化する必要があります。

Q. Tfi DNA Polymeraseの忠実度はどれくらいですか？AMV RTのエラー率はどれくらいですか？

Tfi DNA Polymeraseに塩基が間違っており取りこまれる率は 1.03×10^{-4} エラー/塩基と報告されており(16)、Taq DNA Polymeraseで報告されている 8.9×10^{-5} から 1.1×10^{-4} エラー/塩基(17,18)に比肩します。AMV RTのエラー率は、MMLVも同様におよそ 3.0×10^{-5} エラー/塩基であると報告されています(19)。



アプリケーション

1 チューブ型RT-PCR反応を用いたネココロナウィルスの蛍光検出による定量

プロメガのAccess RT-PCR System (カタログ番号A1260、A1250、A1280) とTaqMan® probe technology (Perkin-Elmer) を用いて蛍光検出による定量に成功しました(20)。この実験ではレポーター蛍光色素とクエンチャーの蛍光色素で標識されている蛍光プローブが用いられました。定量は、ポリメラーゼの伸長反応のステップの間に、T₇ DNA Polymeraseのエキソヌクレアーゼ活性によってハイブリダイズしたプローブからレポーター蛍光色素が切断されることにより生じる蛍光によります。

慢性骨髄性白血病 (CML) および急性リンパ性白血病 (ALL) 患者における Bcr-Abl 遺伝子の検出

Evans らは、プロメガの Access RT-PCR System* (カタログ番号A1260、A1250、A1280) と nested PCR を組み合わせた系により、慢性骨髄性白血病患者のBcr-Abl の転座検出に成功しました (21)。検出には、初回の増幅反応 (RT-PCR) では bcr のエクソン b1 (NB1+) と Abl のエクソン a3 (Abl3) に特異的なプライマーが用いられ、続いて Nested PCR 反応のために bcr に対する B2A プライマーと Abl に対する CA3 プライマーが用いられました。この実験では、b3a2 転座と b2a2 転座が3人の患者サンプルから1例ずつ確認されています。このプロトコルの長所としては、1チューブでRT-PCR反応が行える Access RT-PCR System の使用により実験ステップを簡略化でき、コンタミの可能性も低くなることがあげられます。

*Note: PCR is a patented process. Promega does not encourage or support the unauthorized or unlicensed use of the PCR process. Use of this kit is recommended for persons that either have a license to perform PCR or are not required to obtain a license.

® For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

参考文献

1. Buell, G.N. et al. (1978) *J. Biol. Chem.* **253**, 2471.
2. Kotewicz, M.L. et al. (1988) *Nucl. Acids Res.* **16**, 265.
3. Bailey, J.M. and Davidson, N. (1976) *Anal. Biochem.* **70**, 75.
4. Bassel-Duby, R. et al. (1986) *J. Virol.* **60**, 64.
5. Huibregste, J.M. and Engelke, D.R. (1986) *Gene* **44**, 151.
6. Shimomaye, E. and Salvato, M. (1989) *Gene Anal. Tech.* **6**, 25.
7. Sellner, L.N., Coelen, R.J. and Mackenzie, J.S. (1992) *Nucl. Acids Res.* **20**, 1487.
8. Chumakov, K.M. (1994) *PCR Meth. Appl.* **4**, 62.
9. Moore, S. (1981) *Pancreatic DNase In: The Enzymes*, Volume 14A, P.D. Boyer, Ed., Academic Press, New York, 281.
10. *Riboprobe® in vitro Transcription System Technical manual* #TM016, Promega Corporation.
11. *Access RT-PCR System and Access RT-PCR Introductory System Technical Bulletin* #TB220, Promega Corporation.
12. *Nick Translation System Technical bulletin* #TB044, Promega Corporation.
13. Cebianchi, F. and Wilson S.H. (1987) *Enzymes for modifying and labeling DNA and RNA. Meth. Enzymol.* **152**, 94.
14. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd ed.*, Cold Spring Harbor laboratory, Cold Spring harbor, New York.
15. Miller, K. and Storts, D.R. (1996) *J. NIH Res.* **8**, 48.
16. Mantilla, P. et al. (1988) *Biochemistry* **27**, 6008.
17. Cariello, N.F., Swenberg, J.A. and Skopek, T.R. (1991) *Nucl. Acids Res.* **19**, 4193.
18. Barnes, W. M. (1992) *Gene* **112**, 29.
19. Roberts, J. D. et al. (1989) *Mol. Cell. Biol.* **9**, 469.
20. Gut, M., Leutenegger, C.M., Huder, J.B., Pedersen, N.C. and Lutz, H.J. (1999) *Virol. Meth.* **77**, 37.
21. Evans, H., and Sillibourne, J. *Promega Notes* 57, p21.

製品案内

RT-PCRシステム

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
Access RT-PCR Introductory System	20回分	A1260	19,000
Access RT-PCR System	100回分	A1250	76,000
Access RT-PCR System	500回分	A1280	300,000

RTシステム

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
Reverse Transcription System	100回分	A3500	64,000

PCRシステム

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
PCR Core System I	200回分	M7660	24,000
PCR Core System II	200回分	M7665	28,000

DNA分解酵素

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
RQ1 RNase-Free DNase	1000u	M6101	6,000



第5章 *in vitro* 翻訳

はじめに

*in vitro*における翻訳には (i) RNAテンプレートを用いるプログラムシステムと、(ii) DNAテンプレートを用いるプログラムシステム (転写/翻訳システム) の2つの基本的な方法論があります (図5-1)。RNAテンプレートは、Total RNA、mRNA、または*in vitro*で合成された転写産物などが使用できます。DNAテンプレートは、プロモーターや翻訳開始点の下流に翻訳されるべき遺伝子を持つプラスミドやPCR産物、RT-PCR産物などが使用できます。適切な*in vitro*翻訳システムは、翻訳される遺伝子のオリジン (真核生物/原核生物)、利用できるテンプレート (例えばRNAまたはDNA) および生成されたタンパク質をどのようなアプリケーションに用いるか等、様々な要因に依存します。

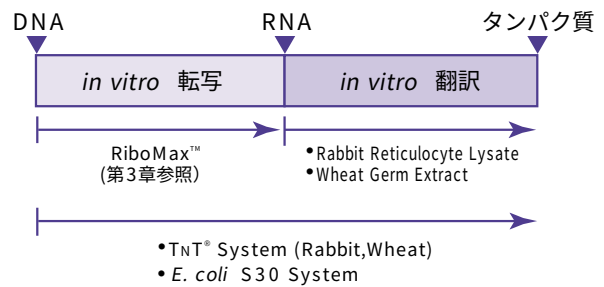


図 5-1. *in vitro* 転写・翻訳とシステムの関係

プロメガの*in vitro*翻訳システム

プロメガではタンパク質の*in vitro*生成のために様々なシステムを提供しています。表5-2に、必須のシークエンスエレメントとテンプレートの必要条件を示します。

表5-2. プロメガの*in vitro* タンパク質翻訳システムの比較

タンパク質 翻訳システム	DNA 環状	DNA 直鎖状	RNA	シグナル切断 プロモーター	グリコシレーション (6-8)	RBS ^a	収 量 (50μl 反応)
真核生物系							
TnT® Reticulocyte Lysate	yes	yes	yes	T7, T3, SP6 and combinations	yes	no	150-300ng ^e
TnT® Wheat Germ Extract	yes	yes	yes	T7, T3, SP6 ^d and combinations	yes ^c	no	150-300ng ^e
Rabbit Reticulocyte Lysate	no	no	yes	no	yes	no	50-200ng ^e
Wheat Germ Extract	no	no	yes	no	yes ^c	no	30-150ng ^e
原核生物系							
<i>E. coli</i> S30 Circular	yes	no	no	strong <i>E. coli</i>	no ^b	yes	100-250ng ^e
<i>E. coli</i> S30 Linear	yes	yes	yes	strong <i>E. coli</i> ^f (DNAのみ)	no ^b	yes	100-250ng (RNAでは効率が落ちます) ^e
<i>E. coli</i> T7 S30 Circular	yes	no	no	T7 or strong <i>E. coli</i>	no ^b	yes	300ng

a RBS=ribosome binding site (リボソーム結合サイト)
b バクテリアによってはβラクタマーゼ遺伝子プロセッシングします。
c プロセッシングには、タンパク質が小胞と結合し、signal recognition particle (SRP) との相互作用が必要です。
小麦胚芽抽出液の調製過程でのEDTA処理でSRPが除去されてしまうため、プロセッシング実験を効率的に行うためには外因性SRPの添加、EDTA処理のステップを省くなどの変更が必要です。
d プロモーターの選択が重要です。
e システムに添付されたコントロール翻訳反応の場合、目的のタンパク質によって収量が変わります。
f スーパーコイル非感受性大腸菌プロモーターのみ使用可能。

翻訳システムの選択

必ずという訳ではありませんが、一般的に真核生物の遺伝子を翻訳するときには真核細胞のシステムが使用され、同様に原核生物の遺伝子を翻訳するためには原核生物のシステムが選択されます。ある翻訳システムの構成要素中に、抗原性や機能性において交差する成分が含まれている場合、別のシステムを使う必要性が生じます。ミクロソーム膜を使用する翻訳後修飾や翻訳後のプロセッシングは、ウサギ網状赤血球の抽出液でのみ可能です。ただし、小麦胚芽抽出液の翻訳システムにおいては、特定の反応条件に限り使用可能な場合もあります。表5-1にテンプレートの由来別に、システム選択の概要を示します。

表 5-1. テンプレートの由来による*in vitro*翻訳システムの選択

RNA	ウサギ網状 赤血球 抽出液 (1)	小麦胚芽 抽出液 (2)	大腸菌S30 抽出液 (9-11)
動物	+++	+++ ^a	— ^b
植物	++	+++	—
細菌	++	++	+++
哺乳類ウイルス	+++	— ^c	—
植物ウイルス	+++	+++	—

a 転写因子の発現に使われた
b 翻訳後のプロセッシングが必要な場合は薦めません
c encephalomyocarditis virus internal ribosomal entry sites (EMCV IRES)を持つ哺乳類ウイルスでは小麦胚芽抽出液での発現があまり見られません
キー：(++) 推奨；(++) 十分可能；(+) 可能；(—) 推奨しない



翻訳システムのアプリケーション

翻訳システムは広範囲のアプリケーションに使われています (表5-3)。TnT® Coupled Transcription/Translation Systemは、転写ステップを別に行う必要がなく、プラスミドDNAからの遺伝子の翻訳を大幅に簡便化します。TnT® System BibliographyではTnT® システムを、プロテインドランケーションテスト (PTT) やタンパク質・タンパク質相互作用、タンパク質・DNA相互作用の研究、クローン化した遺伝子の迅速な同定 (13) などに使用した、100以上の文献を紹介しています (Q&A参照)。

ウサギ網状赤血球抽出液を用いた翻訳の為にRNAテンプレートの準備

ウサギ網状赤血球抽出液を用いた翻訳に使用するRNAテンプレートの調製によっては、翻訳効率に影響したり、他の問題を引き起こしたりする場合があります (表5-4)。テンプレートは精製され、塩類や有機溶媒 (フェノール/クロロホルム) の混入がないものである必要があります。有機溶媒による抽出後、エタノール沈殿したり、PolyAtract® mRNA Isolation SystemによるmRNAの選択的抽出を行うことにより、そのまま翻訳に使えるテンプレートが生成されます (表5-5)。網状赤血球抽出液を用いた翻訳では、*in vivo* RNAまたはファージポリメラーゼにより *in vitro* で生成されたRNAをテンプレートとして使うことができます (表5-4)。様々なシークエンスエレメントをテンプレートに導入することで翻訳産物を増加させることができます (表5-6)。

表5-3. タンパク質翻訳システム的应用による選択ガイド

TnT® 用 途	TnT® Quick	TnT®** for PCR	TnT® Reticulocyte (9)	TnT® Wheat Germ (9)	Reti- culocyte Lysate	Wheat Germ	S30 Circular	S30 Linear	T7 S30 Circular
プラスミドDNAを用いた翻訳	+++	+	+++	+++	—	—	++	++	++
PCR産物を用いた翻訳	++	+++	+++	+++	—	—	—	+++	—
RNAを用いた翻訳	+	+	+	+	+++	+++	—	+	—
クローン化遺伝子の確認	+++	+	+++	+++	++	++	++	++	++
タンパク質/タンパク質相互作用	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	++
タンパク質/DNA相互作用	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	++
プロテインドランケーションテスト	++	+++	+++	+++	+	+	—	—	—
変異導入分析	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	++
薬剤スクリーニング (翻訳阻害など)	+++	+++	++	++	+++	++	+++	++	++

記号: (+++) 推奨; (++) 許容; (+) 可能; (—) 不可

*PCR産物からの翻訳にはTnT® Quick T7 for PCR DNAが最適です。

プロメガの*in vitro* 翻訳システム

プロメガではタンパク質の *in vitro* 生成のために様々なシステムを提供しています (表5-2)。RNAをテンプレートにタンパク質を合成する系には、ウサギ網状赤血球溶解液の系である Rabbit Reticulocyte Lysate (カタログ番号L4960) と、小麦胚芽抽出液の系である Wheat Germ Extract (カタログ番号L4380) があります。これらの系では精製したmRNAや *in vitro* 合成したmRNAをテンプレートとして使うことができます。

プロメガの*in vitro* 転写・翻訳システム

DNAテンプレートをを用いるプログラムシステムとして、プロメガではTnT®シリーズの名称でウサギ網状赤血球溶解液および小麦胚芽抽出液による転写・翻訳システムを提供しています。

この系では、ファージ由来のRNA Polymerase (T7、SP6、T3) が用いられているため、それぞれのRNA Polymerase に固有のプロモーター配列を含むベクターまたはDNA断片を用いることが発現の最低条件となります。TnT® ウサギ網状赤血球溶解液システムでは、T3プロモーターによる系であるTnT® T3 Coupled Reticulocyte Lysate System (カタログ番号L4950)、SP6プロモーターによる系であるTnT® SP6 Coupled Reticulocyte Lysate System (カタログ番号L4600)、およびT7プロモーターによる系であるTnT® T7 Coupled Reticulocyte Lysate System (カタログ番号L4610) があります。

プロモーターによる系のTnT® T7 Coupled Reticulocyte Lysate System (カタログ番号L4610) がありT3、SP6、T7 RNA Polymeraseがそれぞれの系には含まれます。新製品として現在マスターミックスタイプのTnT® Quickシリーズ (カタログ番号L1170/1、L2080/1) がT7またはSP6プロモーター用に製品化されています。また、PCR産物の転写・翻訳用に最適化されたTnT® T7 Quick for PCR DNA (カタログ番号L5540) がお使いいただけます。

TnT®小麦胚芽抽出液システムにも、T3、SP6、T7プロモーターの系ごとにTnT® T3 Coupled Wheat Germ Extract System (カタログ番号L4120)、TnT® SP6 Coupled Wheat Germ Extract System (カタログ番号L4130)、およびTnT® T7 Coupled Wheat Germ Extract System (カタログ番号L4140) があります。

大腸菌の発現系としては、*E. coli* S30 のシリーズがあります。この系には、環状テンプレート用のキットである *E. coli* S30 Circular (カタログ番号L1020)、環状テンプレート用のキットでT7 RNA Polymerase を含む *E. coli* T7 S30 Circular (カタログ番号L1130)、直鎖状テンプレート用のキットである *E. coli* S30 Linear (カタログ番号L1030) があります。直鎖状DNAを環状テンプレート用のキットで用いることはできません (環状テンプレート用の溶解液では直鎖状DNAは分解されてしまうため)。



これらの系でタンパク質を合成する場合は、ベクターやDNA断片に開始コドン、リボゾーム結合サイト (大腸菌の系の場合)、Kozak 配列、Poly (A) テール、ターミネーター配列が含まれるかどうかに注意してください (開始コドンは必須、そのほかは発現量に大きく影響することがあります。詳しくは表5-6を参照)。

これらの *in vitro* 転写系および転写・翻訳系で発現されたタンパク質を検出する方法には、RI を用いる方法とNon-RI の方法があります。Non-RI の方法として、プロメガでは発色または化学発光による検出系であるTranscend™ (カタログ番号L5070およびL5080) と、蛍光による検出系であるFluoroTect™ GreenLys *in vitro* Translation Labeling System™ (カタログ番号L5001、新製品) を販売しています。Transcend™ では、ピオ

チンラベルされたリジンtRNA を用いており、ビオチン化されたタンパク質を泳動分離・メンブレンへのトランスファー後、アルカリホスファターゼ (発色) またはホースラディッシュペルオキシダーゼ (化学発光) 標識ストレプトアビジンで検出します。FluoroTect™ では、BODIPY®で標識されたリジンtRNAを用いており、泳動後、ゲル内の翻訳産物をそのまま蛍光イメージング機器 (フルオロイメージャーなど) で検出することができます。

合成したタンパク質の翻訳後修飾が重要な場合、反応液にCanine Pancreatic Microsomal Membrane (CPMM; カタログ番号Y4041) を加えることができます。CPMMが有効とされている主なアプリケーションには糖鎖の付加やシグナルペプチドの切断があり、膜タンパクの合成やタンパク質のフォールディング研究などにも使用されています。

表5-4. ウサギ網状赤血球および小麦胚芽抽出液の翻訳系を用いる際のRNAテンプレートの指針

RNAのタイプ	RNA濃度	備考
<i>in vitro</i> RNA		
HEPESバッファーの系 (例: RiboMAX™ System)	10~80µg/ml	HEPESベースの系で合成したRNAの場合、より多量のRNAを翻訳反応に加えられる。
Trisバッファーの系 (例: Riboprobe® System)	10~20µg/ml ウサギ網状赤血球 4-10µg/ml 小麦胚芽	RNAが精製されている場合はどちらの系でも安定した結果が得られる。5'ジヌクレオチドによる <i>in vitro</i> mRNAのキャップ付加により翻訳効率が増加する可能性がある。
<i>in vivo</i> RNA		
Total RNA	100~200µg/ml	rRNAやtRNAがブレップ中に豊富に存在するため翻訳効率が悪い
Poly(A) ⁺ RNA	5~20µg/ml ウサギ網状赤血球 5-80µg/ml 小麦胚芽	Poly(A) ⁺ の分画化によりtRNAやrRNAが除去され、翻訳効率が増加する。植物から単離されたPoly(A) ⁺ RNAには多糖類が付加されていることがあり、それによりウサギ網状赤血球における翻訳が阻害される可能性がある。2µg RNA/50µl反応液以上の濃度で反応させた場合、正規の開始コドンよりも下流のATGから翻訳が開始される可能性がある。

表 5-5. テンプレートRNA精製の一般的な手順

手法	備考
有機溶媒による抽出後、エタノール沈殿	等量のフェノール:クロロホルム:イソアミルアルコールで抽出後、クロロホルム:イソアミルアルコール抽出を行なう。0.3M酢酸ナトリウムと2.5倍量のエタノールで沈殿させる。クロロホルムを除去する。
クロマトグラフィー	RNase-freeのSephadex® G-25またはG-50。材料のオートクレーブによりRNaseを減少させることはできるが、RNaseの混入を完全に除くことはできない。
LiCl沈殿	低分子量のRNAが失われてしまうため、一般的には推奨しない。阻害作用のあるCl ⁻ を除去するためにエタノール沈殿が必要になる。
Poly(A) ⁺ 単離	PolyATtract® mRNA Isolation Systems

表5-6. 翻訳に影響を及ぼすシーケンスエレメント

シーケンスエレメント	備考
開始コドン	Kozakコンセンサス配列(10)によりウサギ網状赤血球抽出液では翻訳開始が促進される
Poly(A) テール	コーディング領域の3'末端にpoly(A) テールがあることで翻訳が7倍程度に増加する可能性がある。しかし、poly(A) のみを加えることやpoly(A) テールを持つmRNAの量を増加させることにより翻訳が直接阻害されることもある。
5'キャップ構造の有無	5'mGm ⁷ G(5')ppp(5')G キャップを持つ場合、RNAの種類によってより効率良く翻訳が行なわれる場合がある。キャップを持たないmRNAでは内部からあるいは誤った開始点から翻訳されることがある。キャップ構造を持たないmRNAは、インターナリボゾームエントリーサイト (IRES) (例えばピコルナウィルスのmRNA(13)に見られるような) を含む場合、ここからの翻訳がより効率よく起こる (TnT® Systemでキャップを用いると翻訳効率が下がります)。
5'非翻訳領域	EMCV(14) mRNA (IRESを含む) の5'上流領域を目的のmRNAの上流配列と置きかえると、高濃度のKCl (110~120mM、酢酸カリウムではなく) が加えられた反応で翻訳産物に16倍の増加が観察された。目的のmRNAの上流に置き、翻訳産物を増加させることができる翻訳促進効果がある5' UTRs (例えばβ-グロビンからのような) は他にも存在する。IRESは小麦胚芽抽出液系の翻訳においては逆の効果を持つ。



ヒント

ウサギ網状赤血球抽出液および小麦胚芽抽出液を使用する為のテンプレートRNA調製のヒント

翻訳阻害剤 — 多糖類、2本鎖RNAおよび酸化チオールはウサギ網状赤血球抽出液を用いた翻訳の阻害剤となります(1)。

***in vitro* RNA** — *in vitro*で生成されたRNAは、直接翻訳反応に加えることができます。反応液中で1/10から1/50に希釈されるように用います。

直鎖状テンプレート — 3'突出を持つ直鎖状のDNAテンプレートを使用する*in vitro*転写は、アンチセンスRNAを含む大きなmRNAを生産する可能性があります。これらのRNAは、異常な翻訳産物を生産したり、目的産物の翻訳を阻害することがあります。この問題を避けるためには、転写反応の前に3'突出をKlenow DNAポリメラーゼで処理してください(12)。

翻訳の早期終結 — *in vitro*で生産されたRNAには転写の早期終結により目的のRNAに加えて短いRNAが含まれている可能性があります。これらの短いRNAにより翻訳反応で短いタンパク質が生成されることがあります。

Q&A

Q.TnT® システムを用いるとどれくらいのタンパク質が生成されるのですか？

陽性コントロールのテンプレート（ルシフェラーゼ）からは、50μlの反応当たり約200～300ngのタンパク質が生成されます。ただし、タンパク質の生成はテンプレートに依存します。

Q. 抗体を作製するのに十分なタンパク質量が得られますか？

一匹のマウスで免疫反応を生じさせるためには、一回の注射当たり10～50μgの精製したタンパク質が必要です。ウサギでは最低で50μgですが、100～500μgが好ましいとされます。50μgの反応当たり250ngのタンパク質が得られるとすると、TnT® システム1キットで7.5ugのタンパク質が合成されることになります。より多くの抗体を精製するためには2回の免疫が必要であるとなると、TnT® システム3、4キット分からマウスを免疫するのに十分な産物が得られることになります(15)。

Q.反応当たりどれくらいのDNAテンプレートが必要ですか？

50μlの反応当たり0.2～2.0μgのDNAテンプレートを用いることをお勧めします。これ以上加えても合成されるタンパク質量は増えません。

Q.TnT® システムを用いたときに合成されるタンパク質の最大サイズはどれくらいですか？

最大サイズは決められていません。百kDa以上から数百kDaで成功例があります(15)。

Q. 2つの異なるDNAテンプレートを同じ反応で使用することはできますか？

できます。Co-expression of multiple NF-κB subunits using the TnT® System (PN42、16ページを参照) で、複数のT7プロモーター構築体からのタンパク質の同時合成や、3つの異なるプロモーター構築体からの複数タンパク質の合成が報告されています。各テンプレートから合成されるタンパク質量は、ひとつのテンプレートのみを含む反応における合成量よりも少ない可能性があります。現時点では、プロメガではすべてのロットのTnT® Lysateが複数のポリメラーゼを使った翻訳をサポートすることは保証していません。

Q. RNAポリメラーゼによってタンパク質合成量が違いますか？

スーパーコイル状の陽性コントロールテンプレートを用いると、SP6 RNA PolymeraseでT3またはT7 RNA Polymeraseの2倍の収量が得られています(16,17)。しかし、この違いはすべてのテンプレートであてはまるとは言えません。



Q.プロメガのCanine Pancreatic Microsomal MembranesをTnT®システムと組み合わせて発現と同時進行のプロセッシングに使うことはできますか？

Canine Pancreatic Microsomal Membranesは TnT® Reticulocyte Lysate Systemといっしょに使うことができます。しかし、TnT® Wheat Germ Extract Systemでは使うことができません (18)。

Q.TnT®システムの個々の構成品を単品で買うことはできますか？

TnT®システムは、その試薬が特定のプロモーターに対して最大の発現を与えるように品質保証された一揃いのシステムとしてしかお求めいただけません。現時点では個々の試薬は必ずしも常に交換可能なわけではありません。しかし、プロメガはこれら使用の自由度を上げるようにシステムを改良するよう努めています。

Q.TnT®反応液はどのような組成になっていますか？

TnT®システムは特許の対象となっています。TnT®反応のすべての構成物と濃度は社外秘となっております。

Q.TnT®の新しいアプリケーションとしてどのようなものがありますか？

25ページに最近の優れたTnT®システム利用例を示しました。その他cDNAやPCR産物からのタンパク質発現研究の幅広いアプリケーションについては引用文献集であるBibliography of References Using the TnT® Coupled Transcription/Translation Systems (資料番号BL001)やプロメガホームページ <http://www.promega.com/exp/exrefr.html> (引用文献リスト) をご覧ください。また、アプリケーションの概要についてはPromega Notes 47、53、60、62、66、67、70 (ホームページアドレス：<http://www.promega.com/pnotes/>) の記事も合わせてご参照ください。

参考文献

1. Pelham, H. and Jackson, R. (1976) *Euro. J. Biochem.* **67**, 267.
2. Krieg, P. and Melton, D. (1984) *Nucl. Acids Res.* **12**, 7157.
3. Thompson, D. and Beckler, G. (1992) *Promega Notes* **38**, 15.
4. Zubay, G. (1973) *Ann. Rev. Genet.* **7**, 267.
5. Zubay, G. (1980) *Meth. Enzymol.* **65**, 856.
6. Shimomaye, E. and Salvato, M. (1989) *Gene Anal. Tech.* **6**, 25.
7. Walter, P. and Blobel, G. (1983) *Meth. Enzymol.* **96**, 84.
8. Spiess, M. and Lodish, H. (1986) *Cell* **44**, 177.
9. *Bibliography and References using TnT® Coupled Transcription/Translation System*. BL001, Promega Corporation 1996.
10. Kozak, M. (1990) *Nucl. Acids Res.* **18**, 2828.
11. Jackson, R. and Hunt, T. (1983) *Meth. Enzymol.* **65**, 856.
12. Schenborn, E. and Mierendorf, R. (1985) *Nucl. Acids Res.* **13**, 6223.
13. Borman, et al. (1995) *Nucl. Acids Res.* **23**, 3656.
14. Beckler, G.S. (1992) *Promega Notes* **35**, 5.
15. Thompson, D. et al. (1992) *Promega Notes* **35**, 1.
16. Thompson, D. (1993) *Promega Notes* **40**, 1.
17. Thompson, D. and Van Oosbree, T. (1992) *Promega Notes* **38**, 13.
18. Thompson, D. and Beckler, G.S. (1992) *Promega Notes* **38**, 15.

製品案内

in vitro 転写/翻訳 システム (真核生物)

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
TnT® T7 Quick for PCR DNA	1システム	L5540	75,000
TnT® T7 Quick Coupled Transcription/Translation System	1システム	L1170	75,000
TnT® SP6 Quick Coupled Transcription/Translation System	1システム	L2080	85,000
TnT® SP6 Coupled Reticulocyte Lysate System	1システム	L4600	70,000
TnT® T7 Coupled Reticulocyte Lysate System	1システム	L4610	70,000
TnT® T3 Coupled Reticulocyte Lysate System	1システム	L4950	70,000

in vitro 転写/翻訳 システム (真核生物)

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
Rabbit Reticulocyte Lysate, Nuclease Treated	1ml	L4960	24,000

in vitro 転写/翻訳システム (植物)

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
TnT® T3 Coupled Wheat Germ Extract System	1システム	L4120	65,000
TnT® SP6 Coupled Wheat Germ Extract System	1システム	L4130	65,000
TnT® T7 Coupled Wheat Germ Extract System	1システム	L4140	65,000

in vitro 翻訳システム (植物)

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
Wheat Germ Extract	1ml	L4380	24,000

in vitro 転写/翻訳 システム (真核生物)

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
<i>E. coli</i> S30 Extract System or Circular DNA	1システム	L1020	55,000
<i>E. coli</i> S30 Extract System for Linear Templates	1システム	L1030	55,000
<i>E. coli</i> T7 S30 Extract System for Circular DNA	1システム	L1130	58,000

翻訳産物ダイレクト検出システム(蛍光)

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
FluoroTect™ Green _{Lys} in vitro Translation Labeling System	1システム	L5001	お問い合わせ下さい

翻訳産物検出システム(発色・化学発光)

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
Transcend™ Non-Radioactive Translation Detection System (Colorimetric)	1システム	L5070	30,000
Transcend™ Chemiluminescent Non-Radioactive Translation Detection System	1システム	L5080	43,000

翻訳後プロセッシング

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
Canine Pancreatic Microsomal Membranes	50µl	Y4041	39,000

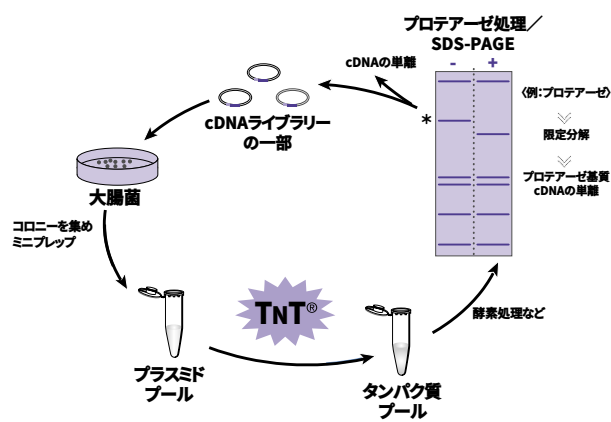


TNT®のアプリケーション

In vitro 発現クローニング (IVEC)

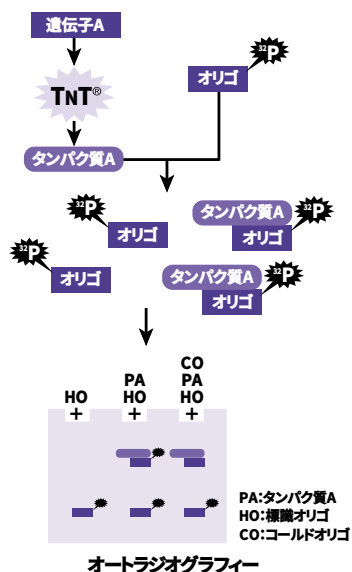
～タンパク質の機能解析からcDNAをスクリーニング～

ファージプロモーターを含むベクターで構築したcDNAライブラリーの一部でTNT®反応を行い、合成されたタンパク質群の中から特定のタンパク質機能を見つけ、そのcDNAを同定します。
例) 特定のプロテアーゼ (caspase-3 など) 基質やキナーゼ基質cDNAの同定、特定のDNAやタンパク質と相互作用するタンパク質cDNAの同定など



タンパク質/DNA相互作用 ～ゲルシフト アッセイ～

TNT® 反応 (標識なし) で合成したタンパク質と³²P 標識したオリゴヌクレオチドを用いたゲルシフトアッセイ。
DNAがタンパク質と結合しなければ、ゲル中をオリゴヌクレオチドは迅速に移動するが、DNAとタンパク質が相互作用すると泳動が遅れます。この現象に基づいて転写因子の解析などを行います。

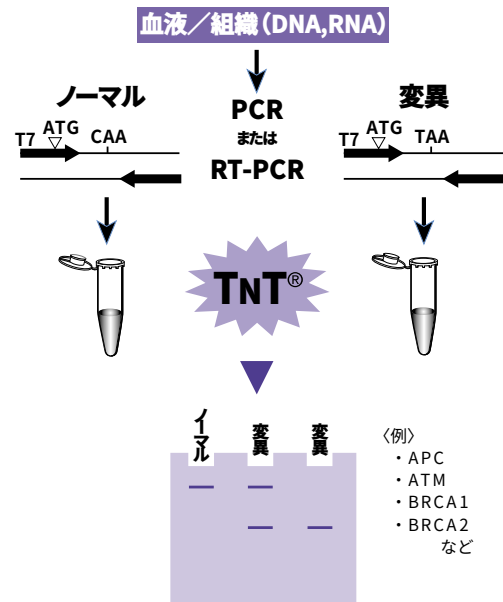


遺伝子変異検出

プロテイントランケーションテスト (PTT)

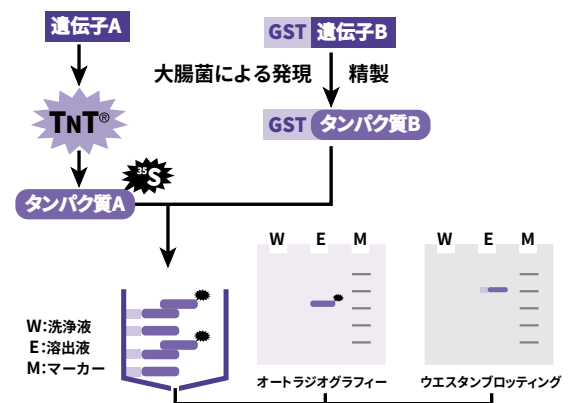
PTTは翻訳停止変異をタンパク質レベルで検出します。SSCP、シーケンシング、酵素消化などのDNAレベルの変異検出方法に比べ、主要な2つの利点があります。

- ・長い遺伝子フラグメント(2-3Kb)を解析できる
- ・病的に関連する変異のみを検出できる
(表現型サイレント変異は検出されません)



タンパク質/タンパク質相互作用

TNT® で合成した標識タンパク質Aと大腸菌で発現したタグ付タンパク質Bの相互作用。タグ付タンパク質B をカラムに固定し、標識タンパク質A をカラムに通して、洗浄液と溶出液をオートラジオグラフィーあるいはウエスタンブロットングによりタンパク質Aとタンパク質Bの相互作用を解析します。





第6章 cDNA合成

cDNA合成の概説

mRNAに対応するcDNAライブラリーの構築は、分子生物学において従来からかなりの困難を伴う実験手法の一つでした。この手法ではmRNAを2本鎖cDNAに逆転写し、続いてベクターにライゲーションするための末端処理を含む、複雑な酵素反応が行なわれます。cDNAライブラリーは下記のような様々なアプリケーションで有用です(1)。

- 遺伝子構造解析
- タンパク質発現
- DNAマッピング

Universal RiboClone® cDNA Synthesis Systemは、GublerおよびHoffmanにより改良された(3) OkayamaおよびBerg(2)による手法に基づいています。この手法は簡単に述べると、ランダムヘキサマーまたはoligo(dT)プライマーを用いてAMV逆転写酵素による第1鎖合成を行い、続いてRNase HとDNA polymerase Iを用いた第2鎖の合成(置き換え)を行ないます。T4 DNA Polymeraseで平滑末端にし、EcoR Iアダプターのライゲーションにより(図6-1) cDNA分子のクローニングへの準備が整います。その後cDNA-EcoR Iアダプター分子はLambda gt10やLambda gt11などのベクターにクローニングされるというものです(図6-2)。本システムには、cDNA合成やライゲーション反応の効率を確認するために使用する、陽性コントロールRNAが含まれます。

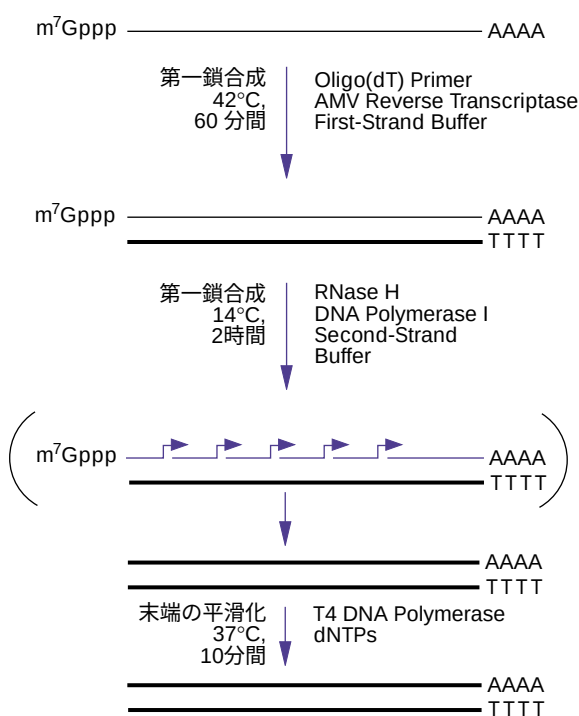


図6-1. Universal RiboClone® cDNA Synthesis Systemとoligo(dT)プライマーを使ったcDNA合成

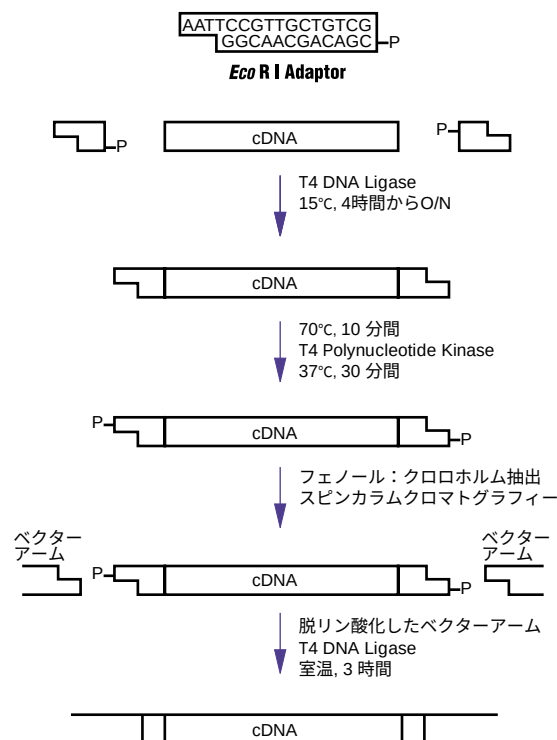


図6-2. 一般的なEcoR I アダプターライゲーションの概要

cDNA合成の典型的な方法では、mRNAからの第1鎖cDNAの合成を開始するためにoligo(dT)プライマーを使用します。ランダムヘキサマープライマーにより、mRNAの内部から第1鎖cDNAの合成を開始するという変法が提供されました(4)。ランダムプライマーは原核生物のmRNAや一部のウイルスRNAなど、ポリアデニル化されていないmRNA分子からの合成開始に有効です。これらのプライマーを用いて生成されたcDNA産物はランダムな方向にクローニングされます。

方向性のあるcDNAのクローニングは、ある種のアプリケーションでは有効です。こうしたcDNAクローニングの手法は、適切な発現ベクターにおいてインサートを正しいポリペプチドとして発現する確率が2倍になります。

合成されたcDNA分子のほとんどは、mRNAの5'末端部分に相補的な数ヌクレオチドを欠いています。これは第2鎖への置き換えが3'-OH RNAプライマーから進行するためです。これらのプライマーは、添加されたRNase HおよびAMV逆転写酵素に既存のRNase H活性によりランダムに生成されます。mRNAの最も5'側のニックは、通常末端から数ヌクレオチドのところに生じ、残りのRNAオリゴヌクレオチドはハイブリダイズした状態を保つには短すぎる可能性があります。そのため、DNA polymerase Iの3'-5'エキソヌクレアーゼ活性がcDNA第1鎖の最後の数ヌクレオチドを除去してしまいます。しかしすべての真核生物のmRNA分子では、5'側に通常40~80ヌクレオチドから成る非翻訳リーダ配列が見られるため、ほとんどの2本鎖cDNAには最初の細胞内mRNA分子に存在するコーディング配列が含まれていると考えられます(4)。



逆転写酵素

逆転写酵素(RT)は、RNAテンプレートから相補的なDNA(cDNA)合成を触媒するDNAポリメラーゼの一種です(5-7)。RNAからcDNAコピーを作製する逆転写酵素の活性は、cDNAライブラリーの構築、RT-PCR^(a)、プライマー・エクステンションやRNAシーケンシングを含む多くの異なる分子生物学のアプリケーションで利用されています。

AMV RTとM-MLV RTは、両方とも2つの主要な活性を持ちます。ひとつはRNA依存性DNAポリメラーゼ活性、もうひとつはRNase H活性です。DNAポリメラーゼ活性は、cDNA合成を必要とする全てのアプリケーションで必要です。それに対し、RNase H活性は完全長cDNAを合成するこの酵素の活性として望ましくなく、むしろ妨げとなります。逆転写酵素は、DNAテンプレートとRNA:DNAハイブリッドにおいてDNA依存性DNAポリメラーゼ活性も持つことに注意してください。しかし、この活性は大きくなく、一般的に分子生物学のアプリケーションで活用されることはありません。

RNase H活性とは

RNase H 活性は、cDNA合成にもっとも適した逆転写酵素を選ぶ際に重要な活性です。大腸菌のRNase H活性のように逆転写酵素のRNase活性はRNA:DNAハイブリッドのRNA鎖を分解します。cDNAが合成されると、逆転写酵素のRNase H活性の基質となるRNA:DNAハイブリッドが形成されます。cDNA合成におけるRNase H活性の影響は2つあります。完全長の逆転写産物の全収量とパーセント収量が低下するということです。逆転写反応は、RNAテンプレート中の特異的な配列にハイブリダイズしたDNAプライマー、多くの場合poly(A)⁺ テールから開始されます。プライマーとRNAのハイブリッドは重合のプライムサイト(開始点)として働くのみならず、逆転写酵素のRNase H活性の基質にもなります。合成されるcDNAの収量は、逆転写酵素が重合を開始する前にRNA:DNAハイブリッドを破壊するRNase H活性がどのくらいあるかにも影響されます。アプリケーションによってはcDNA合成を検出するためにRNAの最少量を増加させる必要が生じます。さらに、この酵素のRNase H活性により、DNA重合が起こっているサイトの近くのRNA鎖が切断されることもあります。切断が起こるとRNA分子のコピーされていない部位が逆転写複合体から解離し、cDNA合成は停止します。RNA分子が長ければ長いほどこのような現象は起こりやすくなります。その結果、お使いになる逆転写酵素にRNase H活性がある場合、長鎖RNA分子(>5kb)が完全にcDNAにコピーされにくくなります。

M-MLV, RNase H (-) 逆転写酵素

RNase H(-)の逆転写酵素は特にcDNAライブラリー作製において選択すべき酵素です。この酵素により長いテンプレートから完全長のcDNAを合成できるということは、作製したcDNAライブラリーがより正確にRNAプール(ライブラリーを作製するために用いられる長短の転写産物)を反映しているということです。その一方で、RNase H(-)の逆転写酵素を使用する一番の利点が長鎖cDNAを合成することであるため、必要とされるDNAが通常短いRT-PCRや、プライマー・エクステンションの結果改善には結びつかないかもしれません。長鎖cDNA (>5kb)が必要とされるアプリケーションには、RNase H (-)の逆転写酵素をお使いいただくことを推奨します。RNAテンプレートの長さのほかに、RNAテンプレート中で複雑な二次構造をとる領域も、逆転写酵素が完全長cDNAを合成する能力に影響します。反応温度を上げてcDNA合成反応を実施することで、問題となる二次構造を持つ領域をリラックスさせ、合成反応を向上させることができます。RNAテンプレート中の二次構造が完全長cDNAの合成を阻んでいる可能性がある状況下や、cDNA合成反応を温度を上げて行ないたい場合、M-MLV Reverse Transcriptase, RNase H Minus, Point Mutantを使用することをお勧めします。

M-MLV RT, RNase H (-)の欠失変異型(deletion mutant)と点変異型(point mutant)の違い

ほとんどのアプリケーションでは、M-MLV RTのどちらのRNase H (-)型もお使いいただけます。我々の観察では、点変異型のほうが欠失変異型よりも高温での安定性があります。1.2kbの鋳型を用いたcDNA合成反応において、M-MLV RT, RNase H Minus, Point Mutantを使った場合55°Cまで完全長のcDNAが合成されるのを観察しました。同じ鋳型でM-MLV RT, RNase H Minus, Deletion Mutantを使った場合、50°Cまで完全長cDNAが合成されました。これらの酵素を高温で使う場合の詳しい情報については、プロメガテクニカルサービスにお問い合わせください。

(prometec@jp.promega.com)

逆転写酵素の比較には表6-1を参照ください。



表6-1. プロメガ逆転写酵素の特徴

	AMV Reverse Transcriptase	M-MLV Reverse Transcriptase (RNase H Plus)	M-MLV Reverse Transcriptase, RNase H Minus Deletion Mutant	M-MLV Reverse Transcriptase, RNase H Minus, Point Mutant
推奨されるアプリケーション				
One-Step RT-PCR	○	×	×	×
Two-Step RT-PCR	○	○	○	○
cDNA合成 (<6kb)	○	○	○	○
cDNA合成 (>6kb)	△	△	○	○
プライマーエクステンション	○	○	○	○
酵素サイズ (kDa)	65kDaと94kDaの12つのサブユニット1からなるヘテロダイマー	71kDa	56kDa	71kDa
原料	トリ骨芽腫ウィルス粒子から精製	大腸菌のクローン	大腸菌のクローン	大腸菌のクローン
RNase活性	あり	あり	なし	なし
熱による不活化	可能、70°Cで15分間 (8)	可能、70°Cで15分間 (9)	可能、70°Cで15分間 (9)	可能、70°Cで15分間 (9)
熱安定性	42-58°C (10)	37-42°C (11)	40-50°C (11)	37-55°C (11)
至適pH	8.3、Tris-HCl中で25°Cで	8.0、Tris-HCl中で37°Cで (13)	8.0、Tris-HCl中で37°Cで (13)	8.0、Tris-HCl中で37°Cで (13)
プロセスビティ (テンプレートから外れるまでの平均付加塩基数)	97ヌクレオチド (14)	テンプレートに依存 (文献15,16を参照)	テンプレートに依存 (文献15,16を参照)	テンプレートに依存 (文献15,16を参照)
重合速度	テンプレートに依存 (文献17を参照)	700塩基/分 (18)	ND	ND
要求性	DNAプライマー、6-10mM Mg ²⁺ または Mn ²⁺ (19)	DNAプライマー、1-2mM Mn ²⁺ または 1-10mM Mg ²⁺ (19)	DNAプライマー、1-2mM Mn ²⁺ または 1-10mM Mg ²⁺ (19)	DNAプライマー、1-2mM Mn ²⁺ または 1-10mM Mg ²⁺ (19)
デオキシヌクレオチド	2-40μM (テンプレートに依存) (19,20)	dATPには24μM、dCTPには31μM (19)	dATPには24μM、dCTPには31μM (19)	dATPには24μM、dCTPには31μM (19)
エラー率	平均で2,000塩基中に1 (21)	平均で1,000塩基中に1 (22,23)	平均で1,000塩基中に1 (22,23)	平均で1,000塩基中に1 (22,23)
cDNAの大きさ	5kbまで	5kbまで	6kbまで	7.5kbまたはそれ以上
推奨するバッファー条件	50mM Tris-HCl (pH8.3), 50mM KCl, 10mM MgCl ₂ , 10mM DTT, 0.5mM spermidine	50mM Tris-HCl (pH8.3), 75mM KCl, 3mM MgCl ₂ , 10mM DTT (13)	50mM Tris-HCl (pH8.3), 75mM KCl, 3mM MgCl ₂ , 10mM DTT (13)	50mM Tris-HCl (pH8.3), 75mM KCl, 3mM MgCl ₂ , 10mM DTT (13)
阻害剤	グリセロール (>10%), ribonucleotide vanadyl complexes (2mM), 比較表については文献19を参照	ピロリン酸化ナトリウム, spermidine-HCl, グリセロール, ホルムアミド, SDS, ヘパリン, 比較表については文献19を参照	ピロリン酸化ナトリウム, spermidine-HCl, グリセロール, ホルムアミド, SDS, ヘパリン, 比較表については文献19を参照	ピロリン酸化ナトリウム, spermidine-HCl, グリセロール, ホルムアミド, SDS, ヘパリン, 比較表については文献19を参照
推奨するRIラベル	[α- ³² P]dATP または [α- ³⁵ S]dATP (24)	[α- ³² P]dATP または [α- ³⁵ S]dATP (24)	[α- ³² P]dATP または [α- ³⁵ S]dATP (24)	[α- ³² P]dATP または [α- ³⁵ S]dATP (24)
基質となるヌクレオチド	dNTP, DINTP, ddNTP, 7-deaza-dGTP, ビオチン または digoxigenin-11-dUTP および fluorescein-12-dUTP (19)	dNTP, DINTP, 7-deaza-dGTP, ビオチン または digoxigenin-11-dUTP および fluorescein-12-dUTP (19)	dNTP, DINTP, 7-deaza-dGTP, ビオチン または digoxigenin-11-dUTP および fluorescein-12-dUTP (19)	dNTP, DINTP, 7-deaza-dGTP, ビオチン または digoxigenin-11-dUTP および fluorescein-12-dUTP (19)

*The PCR process is covered by patents issued and applicable in certain countries. Promega does not encourage or support the unauthorized or unlicensed use of the PCR process. Use of this product is recommended for persons that either have a license to perform PCR or are not required to obtain a license.



ヒント

cDNA合成の成否には、多くのパラメーターが関与しています。下記にcDNA合成反応のためのヒントとガイドラインを紹介します。

第1鎖および第2鎖の収量 — 第1鎖および第2鎖の合成では、約350～6000ヌクレオチド（第2鎖ではベースペア）のcDNAフラグメントを生成します。cDNA合成を確認するためにアガロースゲルで分析する必要があります。

EcoR Iアダプター — RiboClone® Systemに含まれるEcoR Iアダプターは、cDNAフラグメントとの効率的なライゲーションのために平滑末端側がリン酸化されています。

RNAがきちんと取れているかの確認 — 可能であれば、使用前にRNAの完全性をゲルで確認します。mRNAを分解するRNase活性を阻害するためにRNasin® Ribonuclease Inhibitorを加えます。RNasin® Ribonuclease Inhibitorは、cDNAクローニングで問題となるRNase H活性を阻害しません。

陽性コントロールの使用 — キットの内容物に問題がないことを確認するために、各cDNAクローニング実験において陽性コントロールを使います。

mRNAの純度 — 高純度に精製されたmRNAからスタートするようにしてください。SDS、EDTA、多糖類および塩類は、すべて第1鎖cDNAの合成を阻害します。これらの試薬の混入が疑われる場合は、mRNAサンプルの一部を陽性コントロール反応に加え、第1鎖合成が阻害されるかどうかをアガロースゲル電気泳動で調べます。

Sephacryl® S-400スピナラムの使用 — Sephacryl® S-400を充填したスピナラムから溶液が適切に排出されない場合、カラムの上部に軽く圧力をかけて排出をスムーズにします。Sephacryl® S-400をカラムに詰めるときに、カラムの先端に小さな気泡がトラップされやすいので、溶液をカラムに流す前に気泡を追いつく必要があります。

スピナラムでの収量を確保する — Sephacryl® S-400スピナラムからのcDNAの収量を確保するために、バッファーによる平衡化を2回ではなく3回行ないます。

ヘアピン形成の抑制 — ピロリン酸ナトリウムを第1鎖cDNAの合成反応に加えると、ヘアピン形成を抑制する効果があります。DMSOでも同じ効果が見られます。15%のDMSOが第1鎖の合成で合成効率を下げることなく使用されています(25)。

cDNAクローニング用のRNA — 単離されたmRNAでなく、total RNAを使つてのcDNAクローニングを行なうことは推奨できません。第1鎖合成において、³²P-dCTPの取り込み効率の低下が実験で確認されているためです。25～50μgのマウス肝臓からのtotal RNAとoligo(dT)プライマーを使って得られたデータでは、ゲルによる分析で第1鎖cDNAが確認されませんでした。

cDNAの長さ — あるcDNA鎖では15kbpのものが合成されています。第2鎖の合成は11℃で1時間、続いて22℃で1時間反応が行なわれました。他の条件は通常の第2鎖の合成反応条件と同じです(26)。

参考文献

1. Cohen, J.J. (1993) *Immunol. Today* **14**, 126.
2. Cleveland, D.L. and Ihle, J.H. (1995) *Cell* **81**, 479.
3. Tartaglia, L.A. and Goeddel, D.V. (1992) *Immunol. Today* **13**, 151.
4. Kozak, M. (1983) *Microbiol. Rev.* 47.
5. Eun, H.-M. (1996) *Enzymology Primer for Recombinant DNA Technology*, Academic Press, San Diego, CA, 427.
6. Gerard, G.F. and D'Alessio, J. (1993) In: *Methods in Molecular Biology*, Vol.16: *Enzymes of Molecular Biology*, Burrell, M.M., ed., Humana Press, Totowa, NJ, 73.
7. *Enzyme Resource Guide*, Vol. 1: *Polymerases* **BR075A**, Promega Corporation.
8. Colomb, M. et al. (1981) *J Virol.* **38**, 548.
9. Roth, M. et al. (1981) *J. Virol. Chem.* **260**, 9326.
10. Mallet, F. et al. (1998) *BioTechniques* **18**, 678.
11. Gerard, G. et al. (1997) *Mol. Biotech.* **8**, 61.
12. Retzel, E. et al. (1980) *Biochem.* **19**, 513.
13. *Enzyme Resources Guide*, Polymerase, **BR075A**, Promega Corporation
14. Aimasri, N.M. et al. (1991) *Am. J. Clin. Path.* **95**, 376.
15. DeStearo, J.J. et al. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 7423.
16. Busier, R.G. et al. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 13103.
17. Lokhova, I.A. et al. (1990) *Mol. Biol. (USSR)*, **24**, 396.
18. Kotewicz, M.L. et al. (1988) *Nucl. Acids. Res.* **16**, 265.
19. Eun, H.-M. (1996) *Enzymology Primer for Recombinant Technology*, Academic Press San Diego, 465.
20. Eriksson, B. et al. (1982) *Antiviral Res.* **2**, 81.
21. Ricchetti, M and Buc, H. (1990) *EMBO J.* **9**, 1583.
22. Gerald, G. (1986) *Focus (Life Technologies Inc.)* **8**, 12.
23. Roberts, J.D. (1988) *Science* **242**, 1171.
24. Gerard, G.F. (1985) *Focus (Life Technologies Inc.)* **10**, 12.
25. Gross, L. et al. (1992) *J. Mol. Biol.* **228**, 488.
26. Lenstra, J. et al. (1988) *Gene Anal. Tech.* **5**, 57.

製品案内

cDNA合成 & クローニングシステム

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
Universal RiboClone® cDNA Synthesis System	1システム	C4360	79,000

逆転写酵素

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
M-MLV Reverse Transcriptase, RNase H Minus (Point Mutant)	10000u	M3682	26,000
M-MLV Reverse Transcriptase, RNase H Minus (Deletion Mutant)	10000u	M5301	20,000
M-MLV Reverse Transcriptase	10000u	M1701	9,000
AMV Reverse Transcriptase	300u	M5101	14,000



第7章 RNA精製後のアプリケーション

RNA合成は、真核細胞および原核細胞における遺伝子情報の流れの中心にあります。それゆえに、単離されたRNAは多彩な分析・診断技術の標的となっています。同様に、簡単で効率的にRNAを合成できるシステムが利用できるようになり、配列が決定されているRNAと生体分子の相互作用を研究するための技術が発展してきました。臨床分野における核酸の使用にもますます興味をもたれるようになっていきます。*in vitro*におけるランダムなRNA転写産物の生産は、酵素としてあるいは治療に役立つ機能をもつシークエンスの同定を目的としたハイスループットスクリーニングを作り出す突破口となりました。下記では単離あるいは合成されたRNA転写産物を利用する優れた応用研究および診断アプリケーション技術を紹介します。

PTT (Protein Truncation Test)

ある種の遺伝病や癌は特定の遺伝子の突然変異により起こります。これらのなかには、点変異、フレームシフト変異、またはmRNAプライスサイトにおける変異によるリーディングフレーム中への終止コドンの導入が主要な病因となるものがあります。前述の変異の結果、生成される“短くなった”遺伝子産物を検出するために、コードしている領域の上流(5'側)にT7プロモーターと開始コドンを導入するようにデザインされたプライマーを使い、mRNAをRT-PCRにより増幅します。増幅されたDNAは、TNT® T7 Quick反応に直接加えられ、生産物は“短くなった”タンパク質の発現を見るためにSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析されます(1-3)。

RDA (Representational Difference Analysis)

細胞や組織が環境刺激に対して反応するメカニズムを解明するひとつの手法として、反応の間に細胞に含まれる遺伝子情報がどのように異なって発現されるかを同定するテクニックが有用です。RDAは、試験する細胞集団が持つ固有のシークエンスを特異的に増やすことのできる増幅反応を基礎とするテクノロジーです(4)。RNAを実験処理の前(driver)と後(tester)の細胞集団から単離します。これらの両方のRNAから2本鎖cDNAを合成し、testerからのcDNAの両端にシークエンスが分っているアダプターをライゲーションします。2種類のcDNA群を融解し、testerに対するdriverの比率が高い条件下で両方をハイブリダイズさせます。これにより3種類の2本鎖ハイブリッドが合成されます。(tester:tester)、(driver:driver)、および(tester:driver)です。testerのアダプター末端と相補的なPCRプライマーを使い、ハイブリッドミックス中のDNAを増幅します。(tester:tester)のハイブリッドは、tester集団を象徴する固有のシークエンスと、指数関数的な増幅を行うためのPCRプライマーとアニーリングするアダプターシークエンスを両方の5'末端に有します。その他2種類のハイブリッドグループには両方のRNA群に共通のシークエンスが含まれますが、両端のアダプターシークエンスに欠けるため、指数関数的な増幅はしません。

Differential Display

ディファレンシャル・ディスプレイは異なって発現されたRNA転写産物を同定するために使われる第2の増幅反応に基づく手法です(5)。ディファレンシャル・ディスプレイとRDAは両者とも応答遺伝子の異なる転写を検出するために増幅反応を利用しますが、両者で用いられる戦略や技術上の細部は異なります。ディファレンシャル・ディスプレイの中で重要なポイントは、mRNA集団についてランダムプライマーとアンカーオリゴ(dT)プ

ライマー4種類のうちの1つを組合せて使うことです。各オリゴペアにより特徴付けられるmRNAの部分母集団はPCRにより増幅され、増幅差産物は変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離されます。同じプライマーペアを用いて刺激された細胞と刺激を加えられていない細胞から得られたPCR産物の相対的な強度を観察することで、刺激が加えられている間に異なって発現された一連のRNAを明らかにします。

Primer Extension

プライマーエクステンションは、特定のRNAを定量し、5'末端の位置を同定するために使われる技術です(6)。この手法では、目的のRNAに相補的なRI 標識DNAプライマーをターゲットにハイブリダイズさせ、逆転写酵素を使って伸長します。DNAプライマーはRNAターゲットの5'末端付近のシークエンスにアニーリングするようデザインされ、RNAの5'側の末端に逆転写酵素が到達したときに伸長反応は終結します。cDNA産物の長さは、RI標識されたプライマーの5'末端とRNAの5'末端(転写開始点)間の距離を正確に表し、cDNAの生成量はターゲットRNAの量に比例します。

Nuclease Protection

Nuclease Protectionアッセイは、ターゲットRNAや関連するRNAを高感度に検出および定量が行える手法です(7)。RI標識されたDNAまたはRNAプローブは、溶液中でターゲットRNAにハイブリダイズします。ハイブリダイゼーション後の反応液は、残った一本鎖領域/プローブを除くためにリボヌクレアーゼ(プローブがRNAの場合: RNase Protection)またはS1ヌクレアーゼ(DNAの場合: S1 Assay)とともにインキュベートします。生成物はポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析し、保護されたプローブの量を数量化します。この手法は非常に高感度で、RNAを固相担体に移す必要がなく、一度の反応で複数のRNA種について試験することができます。

RNA結合タンパク質の同定・機能解析

タンパク質のRNAへの結合は、転写調節、転写産物の安定性、RNAの翻訳に関与するシークエンスエレメントやタンパク質の特定に使われてきました。このタイプの分析にはいくつかの戦略が使われます。精製したタンパク質を単離したRNAとともに使うことにより、調節配列を持つRNA転写産物の同定や、RNAエレメントとの相互作用に影響を与えるRNA結合タンパク質中の突然変異の解析ができます。同様に、*in vitro*で合成されたRNAを使うことで、特定のRNAシークエンスと結合するタンパク質の同定や精製、RNAとRNA結合タンパク質との相互作用に関わるシークエンスエレメントの同定に利用することができます。このような実験では、RNAと目的のタンパク質の特異的な相互作用が見られる最適な条件を慎重に決めなければなりません。2番目に注意する点は、RNA・タンパク質の複合体をどのように単離し、分析するかを決めることです。RNA・タンパク質複合体を分離する一般的な技術には、フィルターまたはメンブレン上での保持、ポリアクリルアミドゲル電気泳動中の泳動速度の遅れ、密度勾配遠心、カラムクロマトグラフィーや磁性体によるキャプチャー技術を使った単離などがあります(8,9)。



リボザイム

生物学的反応系において、酵素による触媒反応は多くの場合タンパク質が担っていますが、RNA酵素(リボザイム)がさまざまな反応を触媒することが示されてきています。リボザイムの活性部位は、RNA中の二次構造または三次構造の相互作用が触媒表面となる特別な構造を取るときに形成されと考えられています。自然に発生するリボザイム分子の研究は、触媒作用に重要なシーケンスや構造を研究するため、*in vitro*で合成されたRNAの使用や、変異RNAやランダムなRNA分子を合成することで容易になります。核酸も次第に治療薬として考えられるようになってきました。全RNA配列のほんの一部のみが触媒活性を示すため、可能な限りのシーケンスを効率的にサンプルリಂಗするように*in vitro*でランダムに合成された大きなRNAプールを使うことが、リードターゲットの同定に重要です。治療用リボザイムの候補を見つければ、*in vitro*合成RNAを用いることにより、合理的にその機能配列を純化していくことも可能です(10-13)。

mRNAの細胞への導入：トランスフェクションとインジェクション

遺伝子機能の研究は生物学において主要な研究課題です。現時点における真核生物の遺伝子調節に関する知識には、外来の核酸を細胞内へ導入する技術(トランスフェクションや、エレクトロポレーション、ウイルスベクターなど)の開発が大きく貢献しています。RNAの細胞への導入は、DNAの導入とは異なり、タンパク質に翻訳されるためにRNAは細胞質に到達するだけで良く、そのため核へのエントリーに伴う複雑な問題や、転写調節に関する問題を回避することができるため有用です。残念なことに、RNA固有の生物学的不安定さが、RNAを細胞にトランスフェクトする上で大きな障害となっていました。しかし、3'末端へのポリアデニレーションシーケンスや5'末端へのメチルキャップシーケンスの付加がRNAを安定化し、RNAを直接トランスフェクションすることが代用法として有効になっています。RNAのトランスフェクション技術は、真核細胞の翻訳調節因子の研究や、*in vivo*における特定のmRNAの安定性試験、タンパク質の発現や機能の研究に使用され成功しています(14-16)。mRNAの*Xenopus*(アフリカツメガエル)卵母細胞への注入も、卵母細胞における遺伝子発現と機能を研究する上で強力な手段となっています(17-19)。

TKO(Technical Knock Out)

アンチセンスRNAが組織培養細胞において遺伝子発現を阻害することが、TKO技術の基礎にあります。この技術では、組織培養細胞集団内で、エピソーマルベクターにクローン化されたcDNAライブラリーからアンチセンスRNAが発現されます。アンチセンスの転写産物は、対応するmRNAに結合することによりタンパク質の翻訳をブロックするため、ターゲットRNAのノックアウトクローンを効果的に作製します。実験的に決められた選択技術を使ってクローンが同定されると、ベクターシーケンス中に見られる複製のエピソーマル起点により抑制的なcDNAクローンが同定されます。この技術には、細胞のプロセスを担う遺伝子の同定や癌抑制遺伝子の探索など多くの用途があります。この洗練された技術は、HeLa細胞においてインターフェロンγによるアポトーシス誘導のために重要な遺伝子の同定に使われ成功しました(20-22)。

参考文献

1. Roest, P.A. et al. (1993) *Human Mol. Genetics* **2**, 1719.
2. Cayouette, M. (1997) *Promega Notes* **60**, 8.
3. TNT® T7 Quick Coupled Transcription/Translation Technical Manual #TM045 Promega Corporation.
4. Hubank, M. and Schatz, D. G. (1994) *Nucl. Acids Res.* **22**, 5640.
5. Liang, P. and Pardee, A. (1992) *Science* **25**, 967.
6. *Primer Extension Technical Bulletin* #TB113 Promega Corporation.
7. Ausubel, F.M. et al. (1996) *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 2, John Wiley & Sons, New York, 4.6-4.7.
8. Ruby, S. W. et al. (1990) *Meth. Enzymol.* **181**, 97.
9. *Analysis of proteins binding to RNA*. In: "RNA Isolation and Analysis". Jones, P., Qiu, J. and Richwood, D., eds., Bios Scientific Publishers, Oxford, 146.
10. Wedel, A. B. (1996) *Trends Biotechnol.* **14**, 459.
11. Hager, A. J., Pollard, J. D. and Szostak, J. W. (1996) *Chem.Biol.* **3**, 717.
12. Stull, R. A., Szoka, F. C. Jr (1995) *Pharm. Res.* **12**, 465.
13. Marschall, P., Thomson, J. B., Eckstein, F. (1994) *Cell. Mol. Neurobiol.* **14**, 523.
14. Dwarki, V.J., Malone, R.W. and Verma, I.M. (1993) *Meth.Enzym.* **217**, 644.
15. Lu, D. et al. (1994) *Cancer Gene Ther.* **1**, 245.
16. Conry, R.M. et al. (1995) *Cancer Res.* **55**, 1397.
17. Sealfon, S.C. et al. (1990) *Mol. Endocrinol.* **4**, 119.
18. McNamara, P.D., Rea, C.T. and Segal, S. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 986.
19. Muslin, A.J., Klippel, A., Williams, L.T. (1993) *Mol. Cell. Biol.* **13**, 666.
20. Melton, D. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci, USA* **82**, 144.
21. Deiss, L.P., Kimchi, A. (1991) *Science* **252**, 117.
22. Osborne, B.A. and Schwartz, L.M. (1995) *BioEssays* **17**, 557.



Notes

[illegible]

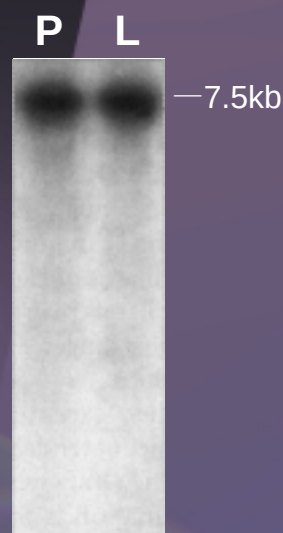


点変異型 MMLV(H-)
プロメガから新発売!

MMLV Point Mutant (H-)

MMLV RNase (H-), Point Mutant

- SuperScript® II と同等のパフォーマンス
- 優れたDNA合成能を維持する点変異型
- 完全長cDNAの合成が可能



cDNA合成能を較べた結果、
プロメガの酵素 (P) は、SuperScript® II
(L) と同等のパフォーマンスを示した。
転写産物は7.5kb

10,000 u 包装	M3682	¥26,000
50,000 u 包装	M3683	¥102,000

※ 詳細については第6章をご覧ください。

Get the message ...

日本語ホームページ開設 : www.promega.co.jp

テクニカルサービス • Tel. 03-3669-7980 / Fax. 03-3669-7982 • E-Mail : prometec@jp.promega.com

プロメガ株式会社

本社 〒103-0011

東京都中央区日本橋大伝馬町14-15 マツモトビル1F
Tel. 03-3669-7981 / Fax. 03-3669-7982

大阪事務所 〒533-0033

大阪市東淀川区中島1丁目17番5号 ス튜디오新大阪347号
Tel.(06)6379-7697 FAX.(06)6379-7698

※製品の仕様、価格については平成12年12月現在のものであり予告なしに変更することがあります。

販売店