

T7 RiboMAX™ Express RNAi System

日本語プロトコール No. TB316 2003年5月作成

| | | |
|--------|--|----|
| I . | はじめに..... | 1 |
| II . | 製品構成..... | 3 |
| III . | 鋳型DNAの調製..... | 4 |
| | A. PCR産物（鋳型）の調製..... | 4 |
| | B. 鋳型プラスミドの直鎖化..... | 5 |
| IV . | 転写プロトコル..... | 6 |
| | A. dsRNAの大量合成..... | 6 |
| | B. 型DNAの除去、dsRNAへのアニーリング、ssRNAの除去..... | 7 |
| | C. 2本鎖RNAの精製..... | 8 |
| | D. RNA濃度の測定とゲル電気泳動による確認..... | 8 |
| V . | RNAiアプリケーション..... | 9 |
| VI . | トラブルシューティング..... | 10 |
| VII . | バッファーおよび溶液の組成..... | 11 |
| VIII . | 参考文献..... | 12 |
| IX . | 関連製品..... | 13 |

I. 説明

T7 RiboMAX™ Express RNAi System^(a,b) は、短時間でmgレベルの2本鎖RNAを合成するためにデザインされたin vitro転写システムです。2本鎖RNA (dsRNA) にはタンパク質やその他の挟雑物が混入していないので、非哺乳動物細胞におけるRNA interference (RNAi) の実験に最適です。多くの非哺乳動物システムを用いたRNAiアプリケーションで使用されるdsRNAの長さは400bp以上です (1, 2)。T7 RiboMAX™ Express RNAi Systemは、~ 200bp以上のdsRNA分子の合成用にデザインされ、鋳型としてプラスミドおよびPCR産物が利用できます。このシステムの標準的な収量は1ml反応液あたり > 2mg dsRNAです。

予め用意した鋳型DNAから、このシステムを用いて相補的RNA鎖を2本合成します。転写反応後、合成された2つのRNA鎖をアニーリングさせ、dsRNAにします。その後、残存する1本鎖RNAおよび鋳型DNAは、ヌクレアーゼによる消化ステップで除去されます。イソプロパノール沈殿により精製したdsRNAは、RNAiアプリケーションの対象となる生物に導入することができます (プロトコルの概要は図2を参照)。

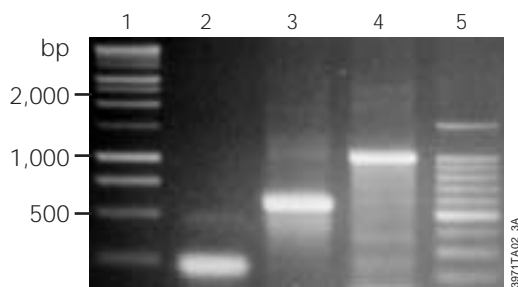


図1. T7 RiboMAX™ Express RNAi Systemで合成した異なる長さのdsRNAのネイティブゲル分析

およそ 4×10^{11} 分子のdsRNAを1.8%アガロース/1×TAEゲルで分離し、エチジウムブロマイドで可視化した。レーン1; 1kb DNA Ladder (カタログ番号G5711)、レーン2; 74ng 180bp dsRNA、レーン3; 200ng 500bp dsRNA、レーン4; 400ng 1000bp dsRNA、レーン5; 100bp DNA Ladder (カタログ番号G2101)。備考: dsRNAの移動はdsDNAよりやや遅い。

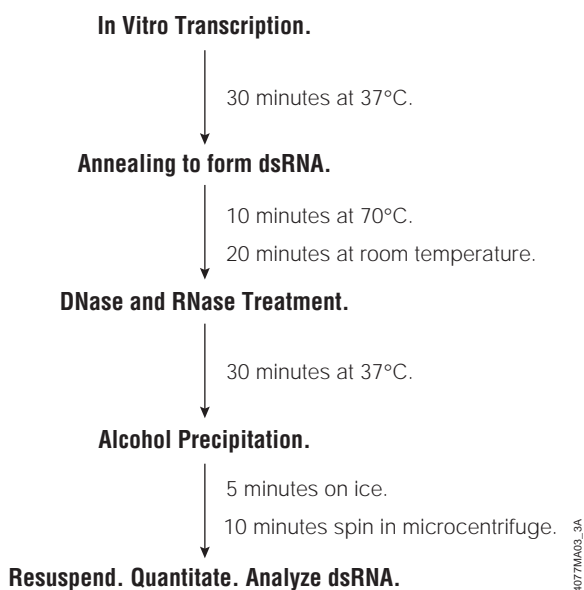


図2. T7 RiboMAX™ Express RNAi Systemを用いたdsRNA合成および精製プロトコル

長い二本鎖RNA分子が標的遺伝子の発現を特異的に抑制するRNA interferenceは、線虫 (*C. elegans*)で初めて発見され (3)、今日ではショウジョウバエ (4)、トリパノソーマ (5)、プラナリア (6)、ヒドラ (7)、ゼブラフィッシュ (8)など数多くの生物でも観察される現象です。RNAiのメカニズムの中では、小さなdsRNA中間体の存在が知られています。もとなる長鎖dsRNAはin vivoでリボヌクレアーゼIII様酵素により小さな断片にプロセシングされ、このsmall interfering RNA (siRNA)が転写後・翻訳前の標的mRNAの分解を起します (1, 9)。RNAiのプロセスは非化学量論的に振舞い、細胞間に広がっていくことが観察されています (3)。RNAiは、特定のmRNAの特異的抑制 (特定のタンパク質のノックアウト/ノックダウン表現型作製) により遺伝子機能を調べることのできる非常に強力なツールになっています。

このシステムは、アニーリングおよびRNAase A消化ステップを削除することにより、1本鎖RNAの大量合成にも使用できます (詳細についてはT7 RiboMAX™ Express Large Scale RNA Production System のTechnical Bulletin, # TB298を参照ください)。

T7 RiboMAX™ Express RNAi SystemはスタンダードなRiboMAX™ Systemと以下の2点が異なります：

- 時間の節約：T7 RiboMAX™ Express RNAi SystemはmgオーダーのRNAを約30分で合成します (オリジナルのRiboMAX™ Systemを含む市販のシステムでは2～4時間かかります。)
- 便利：rNTPとTranscription Bufferが一体になっているため、ピペティングエラーとセットアップ時間を最低限に抑えます。

II. 製品構成

| 製品名 | サイズ | カタログ番号 |
|---------------------------------|--------|--------|
| T7 RiboMAX™ Express RNAi System | 1 システム | P1700 |

このシステムには標準的な20μl反応50回分に相当する試薬が含まれ、25～50個のdsRNAを合成することができます。

| | |
|-----------|---|
| 100μl | Enzyme Mix, T7 Express (T7 RNA Polymerase, Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor ^(a,b) and Yeast Inorganic Pyrophosphatase) |
| 500μl | RiboMAX™ Express T7, 2X Buffer |
| 110 units | RQ1 RNase-Free DNase, 1u/μl |
| 2 × 5μg | pGEM® Express Positive Control Template ^(c) , 1mg/ml |
| 1ml | 3M Sodium Acetate (pH 5.2) |
| 1.25ml | Nuclease-Free Water |
| 200μl | RNase A Solution |
| 1 | Protocol |

保存と安定性：全ての構成成分は-20℃保存。1度溶解したRNase A Solutionは25℃保存し、適切に取り扱うことにより12ヶ月安定に保存することができます。

備考：RiboMAX™ シリーズ全てのTechnical Bulletinは以下のサイトでご覧いただけます。
www.promega.com/tbs/

備考：pGEM® Express Positive Control Templateは転写反応のみに対するコントロールとして供給されています。転写反応後の操作に対するコントロールとしては使用できません。

III. 鋳型DNAの調製

準備する試薬類

(溶液組成についてはセクションVIIに記載されています。)

クロロフォルム：イソアミルアルコール (24:1)

TE飽和 (pH 8.0) フェノール：クロロフォルム：イソアミルアルコール (25:24:1)

エタノール (70% および95%)

遺伝子特異的増幅用プライマーおよび鋳型

非哺乳動物をターゲットとしたRNAi実験では、通常400bp以上のdsRNAが用いられます (1, 2, 10)。RNAiで推奨されるdsRNAの最小サイズは~200bpです。一般的に、RNAi実験で使用されるdsRNA転写の鋳型は、標的配列のほとんどまたは全てと一致します。データが示すところでは、長いdsRNAほどタンパク質発現のサイレンシング効果が高い(モルベース)とされていますが、短いdsRNA分子の濃度が高ければ、同様のサイレンシング効果が得られると考えられます。

このシステムでは、dsRNAを合成するために、両方のDNA標的配列鎖の5'末端にT7 RNAポリメラーゼプロモーターが必要です。このような鋳型を作成する方法が2つあります。相対するT7プロモーターをもつ1種類の鋳型DNAを用いる方法(デュアルプロモーター)とそれぞれT7プロモーターに対して逆向きの標的配列を持つ2つの鋳型を使用する方法(シングルプロモーター)です。後者の方法では、2つの鋳型を1つの転写反応で行う方法と2つの独立した転写反応で行う方法があります。2つの転写反応を行う場合、合成した転写産物同士を混合すれば、転写後のハイブリダイゼーションが起こります。

dsRNAを最大量得るには、各1つのプロモーターを持つ2つの鋳型をそれぞれ異なるin vitro転写反応に使用し、アニーリングするために2つの転写物を混合する方法をお勧めします。この方法で調製したdsRNAは、2つの相対するプロモーターを持つ1種類の鋳型を用いた場合に比べ約3倍の合成量を示し、2次構造を形成しやすい標的にも有効です(表1)。

表1. シングルおよびデュアルプロモーターを持つ鋳型からのdsRNAの収量

| 鋳型 | dsRNA収量 |
|-----------------|---------|
| デュアル-相対プロモーター | 100% |
| シングル-プロモーター、1反応 | 236% |
| シングル-プロモーター、2反応 | 323% |

収量はデュアル-相対プロモーターを使用して得られた収量を100%とした場合の割合

A. PCR産物(鋳型)の調製

T7 RNAポリメラーゼプロモーターは、増幅プライマーの片方もしくは両方の5'末端にT7プロモーター配列を入れることにより、PCRを用いてどのようなDNA配列にも付加することができます。

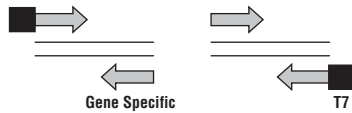
最短T7 RNAポリメラーゼプロモーターに必要な配列：

5'-TAATACGACTCACTATAGGN₍₁₇₋₂₂₎-3'.

太文字Gの+1塩基がRNA鎖として最初に組込まれる塩基で、2番目のGに続いて17~22の遺伝子特異的配列が合成されます。

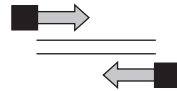
標準的なPCR産物は、両方のプライマーにT7プロモーターが付加されている場合よりも1つのプライマーだけに付加されている方が高収量です。しかし、この場合、必要な2つの鋳型DNAを作製するには、4つのプライマーと2つのPCR反応が必要となり、2つのPCRプライマーと1つのPCR反応だけが必要な2つの相対するT7プロモーターを持つ1つの鋳型とは対照的です(図3参照)。

セパレートPCRによる2種類のシングルプロモーター付加鋳型DNAの合成：
(片方にT7プロモーターを持つプライマーペアを2セット使用)



- 2種類のPCR産物を作成(プライマーペア2セット使用)
- シングルPCR(デュアルプロモーター)よりPCR産物収量高
- シングルPCR産物を鋳型とした転写よりもdsRNA収量高

シングルPCRによるデュアルプロモーター付加鋳型DNAの合成：
(上流/下流プライマーそれぞれにT7プロモーター配列を持つプライマーを1セット使用)



- 1種類のPCR産物を作成(プライマーペア1セット使用)
- セパレートPCR(シングルプロモーター)よりPCR産物収量が低
- セパレートPCR産物を鋳型とした転写よりもdsRNA収量低

3970MA02_3A

図3. T7プロモーターを転写用鋳型DNAに付加するためのPCRストラテジー

T7プロモーター配列をどちらにも持つプライマーペアを用いた反応の場合、PCR反応におけるプライマー濃度を100~500nMにすることを推奨します。高いプライマー濃度は顕著なプライマーダイマー形成の原因になります。T7プロモーター配列を持つプライマーを使用する場合、遺伝子特異的配列の融解温度よりも~5 程度高い温度でのアニーリングをはじめの5~10サイクル行い、その後、T7プロモーター配列を含むプライマー全体の融解温度よりも~5 程度高い温度でのアニーリングを20~35サイクル行います。

転写を行う前に、予想したサイズの単一PCR産物が合成されたことを確認するためにアガロースゲル電気泳動でチェックする必要があります。PCR産物はWizard® SV Gel and PCR Clean-Up System® (カタログ番号A9281) で精製し、吸光度(260nm)で定量することを推奨します。この精製システムを用いれば、精製と濃縮、必要に応じてゲルからのPCR産物回収も行うことができます。少量の未精製PCR産物でも鋳型DNA (20µl 反応あたり1~2µl) として使用できますが、通常 精製したPCR産物を用いた場合の方が転写産物の高収量が期待できます。

B. 鋳型プラスミドの直鎖化

dsRNA合成用の鋳型としてプラスミドを用いる場合、標的配列が正方向、逆方向に挿入された2つのクローンを用意する必要があります。また、それぞれのクローンには各標的配列に対して逆側の末端にT7 RNAポリメラーゼプロモーターを持つ必要があります。PCR産物はpGEM®-T Vector (カタログ番号A3600) やpGEM®-T Easy Vector (カタログ番号A1360) に直接クローニングすることもできます。これらのベクターにはマルチクローニングサイトの上流にT7プロモーターが1つ含まれています。標的配列のクローニング方向は、PCR(ベクター特異的プライマーと標的配列特異的プライマーにより合成された断片のサイズの違いによる) や制限酵素処理を用いたスクリーニングにより決定することができます。また、T7プロモーターを1つ含むPCR産物をこれらのベクターにクローニングし、ベクターおよびPCR産物に由来するT7プロモーターが相対するクローンを選ぶことにより、デュアルプロモーターを持つベクターを調製することもできます。

最適なRNA収量は、鋳型となるDNAの質に依存します。セシウムクロライド精製または Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification SystemTM (カタログ番号A1330) を用いれば、転写反応に適したDNAを得ることができます。DNAにRNaseが混入していないことが重要です。もし、RNaseの混入が予想される場合、プロテイナーゼKおよびSDS (0.5%) を含む50mM Tris-HCl (pH 7.5), 5mM CaCl₂で37℃、30分間処理してください(5)。さらに、TE飽和 (pH 8.0)フェノール：クロロフォルム：イソアミルアルコール (25:24:1) でDNAを抽出し、エタノール沈殿を行ってください。

正確な長さのRNA転写物を合成するために、鋳型DNAはin vitro転写を行う前に直鎖化します。標的配列の下流を切断する適切な制限酵素でDNAを直鎖化し、フェノール抽出/エタノール沈殿、Wizard® DNA Clean-Up SystemTM (カタログ番号A7280) などの適当な方法でクリーンアップ処理を行います。転写反応に必要なDNA量よりも少なくとも30%多く合成すれば、精製過程でのロスやゲル電気泳動によるチェックでの使用にも対応できます。

3'突出末端を形成する制限酵素の使用を避けることは重要です(表2参照)。このような鋳型を転写反応に用いると、目的の転写物に加えて、余分な転写物が合成されることが報告されています(11)。これらの余分な転写物は、目的の転写物と相補する配列やベクターと同一の配列を持つ場合があります。もし、このような制限酵素を使用しなければならぬ場合は、転写反応に使用する前に直鎖化したDNAをDNA Polymerase I Large (Klenow) FragmentやT4 DNA Polymeraseを用いて平滑末端にすることができます。

表2. 汎用される3'突出末端を生成する制限酵素

| | | | | |
|----------------|--------------|---------------|----------------|-------------------|
| <i>Aat</i> II | <i>Apa</i> I | <i>Ban</i> II | <i>Bgl</i> I | <i>Bsp</i> 1286 I |
| <i>Bst</i> X I | <i>Cfo</i> I | <i>Hae</i> II | <i>Hgi</i> A I | <i>Hha</i> I |
| <i>Kpn</i> I | <i>Pst</i> I | <i>Pvu</i> I | <i>Sac</i> I | <i>Sac</i> II |
| <i>Sfi</i> I | <i>Sph</i> I | | | |

精製した直鎖化DNAは、完全に直鎖化されているか、予想されているサイズか、分解されていないかなどを確認するためにアガロースゲル電気泳動で確認してください。

IV. 転写プロトコル

本システムに添付されているPositive Control Template (直鎖状) は1.1kb、2.3kbの1本鎖RNAを生成します。この2つの転写産物は相補的ではないので、2本鎖RNAを形成することはありません。この鋳型は本システムの転写活性および転写RNAの完全性に対するポジティブコントロールとして使用します。

A. dsRNAの大量合成

1. 室温で適当な反応サイズのセットアップを行います。20μl反応は必要に応じて変更することができます(総ボリューム500μlまで可能。>500μの場合、複数のチューブに分けてください)。構成成分は表示している順番に加えてください; 反応に加える前、鋳型DNAをnuclease-free waterに溶解する場合は慎重に行ってください。

T7 転写反応組成

| | サンプル 反応 | コントロール 反応 |
|---|---------------|---------------|
| RiboMAX™ Express T7 2X Buffer | 10.0µl | 10.0µl |
| linear DNA template (~1µg total; 備考1参照) | 1-8µl | |
| pGEM® Express Positive Control Template | | 1.0µl |
| Nuclease-Free Water | 0-7µl | 7.0µl |
| Enzyme Mix, T7 Express | 2.0µl | 2.0µl |
| 最終容量 | 20.0µl | 20.0µl |

凍結したRiboMAX™ Express T7 2X Bufferに沈殿物が認められた場合は、37℃で暖めて、よく混和することで溶解できます。

2. 穏やかに混和し37℃、30分間インキュベート（備考1～3参照）。

備考：

1. デュアルプロモーター付加鋳型DNAを鋳型として使用する場合は、20µl反応液に対して1µg使用します。2種類のシングルプロモーター付加鋳型DNAを使用する場合は、2つの転写反応ではそれぞれ1µg、1つの転写反応では各1µg（計2µg）を用います。1つの転写反応にシングルプロモーター付加鋳型DNA1種類を使用する場合は片方の転写産物を、デュアルプロモーター付加鋳型DNAを使用する場合は両方の転写産物を合成することになります。2種類のシングルプロモーター付加鋳型DNA計2µgとデュアルプロモーター付加鋳型DNA1µgは、転写反応に要する鋳型量として同等です。最大収量は、2種類のシングルプロモーター付加鋳型DNAを2つの転写反応で使用する場合に得られ、社内テストでは、デュアルプロモーター付加鋳型DNAを1つの転写反応で使用する場合に比べ、3倍の収量が得られています（表1）。プラスミドを鋳型として使用する場合は、20µl反応に対して最大3µgの精製プラスミドを使用することができます。
2. 最大収量を得るために、37℃で2～6時間までインキュベーションすることができます。しかし、通常30分以上のインキュベーション時間で劇的な収量増加は認められません（短い転写物[～200bp]の場合を除く）。最大のRNA合成を望む場合、タイムコース実験を行い最適なインキュベーション時間を見つけることもできます。
3. 2次構造をとる転写物合成の場合、インキュベーション温度を42℃にすることでdsRNAの収量を改善できる場合があります。もし37℃でのインキュベーションで十分な収量が得られない場合やGC含量の高い鋳型を使用する場合は、42℃でインキュベーションしてください。2種類のシングルプロモーター付加鋳型DNAを2つの転写反応で使用した場合、2次構造をとる傾向のある鋳型も含めて、収量が増加することが観察されています。

B. 鋳型DNAの除去、dsRNAへのアニーリング、ssRNAの除去


転写反応後、鋳型DNAはDNase消化により除去することができます。RQ1 RNase-Free DNase（カタログ番号M6101）は、RNAの完全性を維持したままDNAを分解する能力をテストされています。正確なRNA濃度を決定する必要がある場合、RNAをDNase処理し、潜在的な阻害・干渉物質を除去するために精製してください。

1. RNA鎖をアニーリングするために、相補するRNAを合成した反応液を等量ずつ混和後、70℃で10分間インキュベーションし、室温までゆっくりと冷やします（～20分）。この操作により2本の相補鎖RNAはアニーリングします。

備考：反応のセットアップは室温で行ってください。バッファーには、低温でDNAを沈殿させるスペルミジンが含まれています。

備考：社内テストではデュアルプロモーター付加鋳型DNAを1つの転写反応で使用する場合に比べ、2種類のシングルプロモーター付加鋳型DNAを2つの転写反応で使用する場合の方が3倍の収量が得られています。

備考：2種類のシングルプロモーター付加鋳型DNAまたはデュアルプロモーター付加鋳型DNAを1つの転写反応で使用する場合には、混和ステップは不要です。

 **DO NOT:**
RNAペレットを乾燥しすぎると、完全な再懸濁が困難になります。

2. Nuclease-Free Water 199 μ lにRNase Solution 1 μ lを加えて、製品に添付のRNase Solutionを200倍に希釈します。新しく希釈したRNase Solution 1 μ lおよびRQ1 RNase-Free DNase1 μ lを20 μ l反応に加え、37 °Cで30分間インキュベーションします。この処理により残存する1本鎖RNAおよび鋳型DNAが除去さ、2本鎖RNAのみが残ります。希釈したRNase Solutionは保存、再使用しないでください。

C. 2本鎖RNAの精製

1. 0.1容量の3M 酢酸ナトリウム (pH5.2)、1容量のイソプロパノール (または2.5容量の95% エタノール) を加えて混和後、5分間氷冷します。この段階で反応液は不透明になります。マイクロ遠心機を用いて10分間トップスピードで遠心します。
2. マイクロ遠心チューブの底に白色のペレットが形成されます。慎重に上澄をこぼすか吸引除去した後、0.5mlの冷却70%エタノールでペレットを洗浄し、洗浄後に残る全てのエタノールを除去します。ペレットを15分間 室温で風乾した後、元の反応ボリュームに対して2~5倍量 (少なくとも2倍量) のNuclease-Free WaterにRNAサンプルを懸濁し、-20 °C または-70 °C で保存します。
3. dsRNAは沈殿させた後、G25 microspin column (Amersham Biosciences, Cat# 27-5325-01) を用いてさら精製することもできます。この操作により、残存するrNTPを除去することができ、吸光度 (260nm) 測定による正確な定量が行えます。1つのスピンカラムに40 μ l以上の反応液を処理することはお勧めしません。G25を用いた精製による収量の減少が予想されます (約2/3回収率)。

D. RNA濃度の測定とゲル電気泳動による確認

準備する試薬類

(溶液組成についてはセクションVIIIに記載されています。)

Blue/Orange Loading Dye, 6X (カタログ番号G1881)

RNAサンプルバッファー

RNAローディングバッファー

鋳型DNA、残存する1本鎖RNA、および組込まれなかったヌクレオチド (G25クロマトグラフィーによる) を除去した後、dsRNA濃度はUV吸収により定量することができます。RNAの100倍および300倍希釈液を調製し、波長260nmでの吸光度を測定します。1 A_{260} ユニットはdsRNA ~ 40 μ g/mlに相当します。

DNase処理したdsRNA転写物は1X Blue/Orange Loading Dyeを用いたネイティブゲル電気泳動により、 A_{260} での定量精度および/または完全長dsRNAの完全性を調べることができます。1kb DNA Ladder (カタログ番号G5711) は、dsRNAサンプルのサイズ決定を容易にします (2本鎖RNAは2本鎖DNAよりもゆっくりと移動します)。1レーンあたり1~5 μ lの希釈したRNA (Nuclease-Free Waterで少なくとも50倍に希釈) または50~500ngのRNAを使用します。dsRNAは、既知量の2本鎖DNAと比較することによりゲル上で定量することが可能です。

転写物の長さに合わせてアガロースゲル (1XTAE) またはアクリルアミド ミニゲルを調製します (200 ~ 数千ヌクレオチドの転写物の場合、0.7 ~ 2.0% アガロース)。分離した dsRNA は、0.5mg/ml エチジウムブロマイドまたは SYBR® Green II stain (Molecular Probe) を用いたゲル染色により確認することができます。予め染料をゲルに混ぜておく方法は、dsRNA の移動度が変わり、正確なサイズ決定が困難になることがあるため推奨しません。

1本鎖RNAの完全性は、RNAサンプルバッファーとRNAローディングバッファーを用いた変性ゲル電気泳動で確認することができます。ゲルにRNA Markers (カタログ番号 G3191) を添加すれば、RNAサンプルのサイズおよび完全性の確認を容易にします。

変性ゲル (ホルムアルデヒドおよびグリオキサルまたは8M 尿素を含む) を用いた変性RNAの分離度が最も良好ですが、社内テストでは未変性ゲルに変性RNAを添加した場合でもたいてい許容できる程度の結果が得られました。希釈RNA (Nuclease-Free Water で少なくとも50倍に希釈) 1 ~ 5µlをRNAサンプルバッファー10 ~ 20µlに加え、さらに2 ~ 5µlのRNAローディングバッファーを加えます。ゲルに添加する前に、サンプルを65 ~ 70 °Cで5 ~ 10分間加熱します。DNAサンプルの分析と同様の条件で電気泳動を行い、泳動後 エチジウムブロマイドまたはSYBR® Green II stainでRNAを可視化します。変性 dsRNA は既知量の ssRNA と比較することによりゲル上で定量することができます。

直鎖状のControl DNAは、約2.3kbまたは1.1kbの1本鎖RNA転写物を生成します。これらのRNA鎖は相補的ではないので、アニーリングし、dsRNAを形成することはありません。ネイティブゲル上では拡散して見えます。

V. RNAiアプリケーション

下記のレファレンスはおおよそのガイドとしてお考え下さい。非哺乳動物システムにおけるRNAi用プロトコルは常に改変され最適化されています。最新の技術については、最近の文献を参照ください。

線虫 (*C.elegans*)

インジェクション：参考文献1および12に、インタクトな線虫へのdsRNAインジェクションのガイドラインが記載されています。

浸漬：線虫をdsRNAを含む溶液に浸漬する手法が参考文献13に記載されています。

摂餌：フィーディングベクターからdsRNAを発現するバクテリアを摂餌し、dsRNAを導入するプロトコルが参考文献14 ~ 16に掲載されています。

培養昆虫細胞

培養 *Drasophila* S2細胞を用いたRNAi研究が行われています。T7 RiboMAX™ Express RNAi Systemで合成したdsRNAを参考文献17に記載されているプロトコルに準じて実験した場合もRNAi実験は成功しました。

トランスフェクション試薬を用いた昆虫細胞へのdsRNA導入については参考文献18に記述されています。また、培養したmosquito cell (19)や培養した *Drasophila* 器官(20)でのRNAi法についても記述されています。

このマニュアルに関するお問合せは弊社テクニカルサービスまでお問合せください (E-mail: prometec@jp.promega.com)。

尚、この日本語版マニュアルは英語マニュアル (資料番号 TB316, 4/03) を基に作製されたものです。最も更新された英語マニュアル (TB316) は www.promega.com/tbs/ をご覧ください。

VI. トラブルシューティング

| 症状 | 原因 | 改善点 |
|----------------------------|--|---|
| 標準的な転写プロトコルに従ってもRNA合成量が低い。 | Transcription 2X Bufferに含まれるスベルミジンにより鋳型DNAが沈殿している。 | 反応のセットアップを室温で行うことと構成成分を加える順番を確認する。 |
| | 鋳型DNAに阻害物質が含まれている。 | 典型的な阻害物質は、残存するSDS、塩、EDTA、RNase。鋳型DNAの沈殿に使用されるNaClが残存する場合、RNAポリメラーゼ活性を最大50%阻害する。鋳型DNAはカラムクロマトグラフィーにより脱塩し、DNAの沈殿にその他の塩類を使用する。ペレットは70%エタノールで1~2回洗浄する |
| | | 全てのIn vitro転写反応にRecombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitorの使用を推奨する。RNasin® Ribonuclease InhibitorはEnzyme Mixの中に含まれる。システムに含まれていない溶液類は、0.1% DEPC処理水で調製したものを使用。 |
| | | プロテイナーゼK処理は鋳型の質を向上させる可能性がある。鋳型DNAをプロテイナーゼK (100~200µg/ml) およびSDS (0.5%) で50~30分間処理し、フェノール/クロロフォルム抽出を行った後、エタノール沈殿で回収。SDSの混入を最低限に抑えるために、エタノール沈殿前に核酸を数倍適度希釈する。懸濁前に70%エタノールでペレットを厳重に洗浄する。 |
| | 非効率的な鋳型または2次構造を形成する鋳型の使用 | 標的の異なる部位が転写開始サイトに連結されている鋳型をクローニングする。標的配列に対してT7プロモーターの転写開始点を移動させることにより、転写にともなう問題を解決できる場合がある。 |
| | | 2種類の鋳型を2つの転写反応で用いることにより収量が増加する。 |
| | | インキュベーション温度を37 から42 に上げることで、2次構造を持つ鋳型の転写を向上することができる。 |
| | RNAポリメラーゼの不活性化 | RNAポリメラーゼの活性は、control templateのIn vitro転写により評価することができる。 |

トラブルシューティング (続き)

| 症状 | 原因 | 改善点 |
|--------------------|----------------------------|---|
| 不完全な転写産物が合成される。 | RNAの合成が途中で止まる。 | インキュベーション温度を37 から30 に下げる。いくつかのケースでこの方法により完全長転写産物の割合が上昇したことが示されている(21)。 |
| 予想よりも長い転写産物が合成される。 | 3'突出末端を持つ鋳型DNAを使用 | 3'突出末端を生成する制限酵素で鋳型DNAを直鎖化している場合、目的のRNAよりも長いRNAが顕著に多く合成される。これは鋳型の端から転写が開始されるため(11)。このタイプの制限酵素を使用しなければならない場合、転写反応に使用する前に直鎖状DNAの末端をDNA Polymerase I Large (Klenow) Fragmentで平滑化する。 |
| | サンプル中に直鎖化されていないプラスミドが存在する。 | ゲル電気泳動でサンプルを分析する。未消化のベクターが確認された場合、適切な制限酵素で再度消化する。 |

VII. バッファーおよび溶液の組成

RNA ローディングバッファー

| | |
|------|------------------|
| 50% | glycerol |
| 1mM | EDTA |
| 0.4% | bromophenol blue |

グレードの高いグリセロールを使用してください。グレードの低いグリセロールにはRNA分解活性が存在します。RNAローディングバッファーは分注後-20 で保存してください。

RNAサンプルバッファー

| | |
|--------|---------------------|
| 10.0ml | deionized formamide |
| 3.5ml | 37% formaldehyde |
| 2.0ml | MOPS buffer |

分注後-20 で保存してください。
2回以上凍結/融解を行わないでください。

TE バッファー

| | |
|------|-------------------|
| 10mM | Tris-HCl (pH 8.0) |
| 1mM | EDTA |

TE-飽和 フェノール：クロロフォルム：イソアミルアルコール (25:24:1)

TEバッファーとフェノールを等量混和し、層を分離させる。低層のフェノール容量1に対してクロロフォルム：イソアミルアルコール (24:1) 容量1を混和する。備考：転写後の鋳型DNAの除去にはTEバッファー (pH 8.0) よりもTEバッファー (pH 4.5) を使用してください。

MOPS バッファー (10X)

| | |
|------|----------------|
| 0.2M | MOPS (pH 7.0) |
| 50mM | sodium acetate |
| 5mM | EDTA (pH 8.0) |

VIII. 参考文献

1. Elbashir, S.M. *et al.*(2001) RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* **15**, 188-200.
2. Yang, D., Lu, H. and Erickson, J.W. (2000) Evidence that processed small dsRNAs may mediate sequence-specific mRNA degradation during RNAi in *Drosophila* embryos. *Curr. Biol.* **10**, 1191-200.
3. Fire, A. *et al.*(1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-11.
4. Misquitta, L. and Paterson, B.M. (1999) Targeted disruption of gene function in *Drosophila* by RNA interference (RNA-i): A role for nautilus in embryonic somatic muscle formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 1451-6.
5. Ngo, H. *et al.*(1998) Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 14687-92.
6. Sanchez-Alvarado, A. and Newmark, P.A. (1999) Double-stranded RNA specifically disrupts gene expression during planarian regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 5049-54.
7. Lohmann, J.U. *et al.*(1999) Silencing of developmental genes in Hydra. *Dev. Biol.* **214**, 211-14.
8. Wargelius, A. *et al.*(1999) Double-stranded RNA induces specific developmental defects in zebrafish embryos. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **263**, 156-61.
9. Zamore, P.D. *et al.*(2000) RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* **101**, 25-33.
10. Hammone, S.M. *et al.* (2000) An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* **404**, 293-6.
11. Schenborn, E.T. and Mierendorf, R.C. (1985) A novel transcription property of SP6 and T7 RNA polymerases: Dependence on template structure. *Nucl. Acids Res.* **13**, 6223-36.
12. Grishok, A., Tabara, H. and Mello, C.C. (2000) Genetic requirements for inheritance of RNAi in *C. elegans*. *Science* **287**, 2494-7.
13. Tabara, H., Grishok, A. and Mello, C.C. (1998) RNAi in *C. elegans*: Soaking in the genome sequence. *Science* **282**, 430-1.
14. Timmons, L. and Fire, A. (1998) Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* **395**, 854.
15. Kamath, R.S. *et al.*(2001) Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Biol.* **2**, RESEARCH0002.
16. Fraser, A.G. *et al.*(2000) Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference. *Nature* **408**, 325-30.
17. Clemens, J.C. *et al.*(2000) Use of double-stranded RNA interference in *Drosophila* cell lines to dissect signal transduction pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 6499-503.
18. Caplen, N.J. *et al.* (2000) dsRNA-mediated gene silencing in cultured *Drosophila* cells: A tissue culture model for the analysis of RNA interference. *Gene* **252**, 95-105.
19. Levashina, E.A. *et al.*(2001) Conserved role of a complement-like protein in phagocytosis revealed by dsRNA knockout in cultured cells of the mosquito, *Anopheles gambiae*. *Cell* **104**, 709-18.
20. Biyasheva, A. *et al.*(2001) Glue secretion in the *Drosophila* salivary gland: A model for steroid-regulated exocytosis. *Dev. Biol.* **231**, 234-51.
21. Krieg, P.A. (1990) Improved synthesis of full-length RNA probe at reduced incubation temperatures. *Nucl. Acids Res.* **18**, 6463.

XI. 関連製品

RNAi (RNA干渉)

| 製品名 | カタログ番号 |
|--|--------|
| siLentGene™ U6 Cassette RNA Interference System ^(k-r) | C7800 |

RNA合成

| 製品名 | カタログ番号 |
|---|--------|
| Riboprobe® System SP6 ^(a,b) | P1420 |
| Riboprobe® System T3 ^(a,b) | P1430 |
| Riboprobe® System T7 ^(a,b) | P1440 |
| Riboprobe® System Buffers | P1121 |
| RiboMAX™ Large Scale RNA Production System SP6 ^(a-c) | P1280 |
| RiboMAX™ Large Scale RNA Production System T7 ^(a-d) | P1300 |
| T7 RiboMAX™ Express Large Scale RNA Production Systems ^(a,b) | P1320 |

For Laboratory Use.

DNA精製

| 製品名 | サイズ | カタログ番号 |
|--|-------|--------|
| Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System ^(h,i) | 50回分 | A1330 |
| | 250回分 | A1460 |
| Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System ⁽ⁱ⁾ | 50回分 | A7100 |
| | 100回分 | A7500 |
| | 250回分 | A7510 |
| Wizard® Plus Midipreps DNA Purification System ⁽ⁱ⁾ | 25回分 | A7640 |
| Wizard® Plus Maxipreps DNA Purification System ⁽ⁱ⁾ | 10回分 | A7270 |
| Wizard® Plus Megapreps DNA Purification System ⁽ⁱ⁾ | 5回分 | A7300 |
| Wizard® DNA Clean-Up System ⁽ⁱ⁾ | 100回分 | A7280 |
| Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System ⁽ⁱ⁾ | 50回分 | A9281 |
| | 250回分 | A9282 |

For Laboratory Use.

1本鎖RNA マーカー

| 製品名 | サイズ | カタログ番号 |
|----------------------------|------|--------|
| RNA Markers ^(b) | 50µl | G3191 |

For Laboratory Use.

PCR関連製品

| 製品名 | サイズ | カタログ番号 |
|---------------------------------|---------|--------|
| PCR Master Mix ^(k,l) | 100回分 | M7502 |
| | 1,000回分 | M7505 |

For Laboratory Use.

PCRクローニング

| 製品名 | サイズ | カタログ番号 |
|---|------|--------|
| pGEM® -T Vector System I ^(e,g) | 20回分 | A3600 |
| pGEM® -T Vector System II ^(e,g) | 20回分 | A3610 |
| pGEM® -T Easy Vector System I ^(e,g) | 20回分 | A1360 |
| pGEM® -T Easy Vector System II ^(e,g) | 20回分 | A1380 |

For Laboratory Use.

(a) U.S. Pat. No. 5,552,302, European Pat. No. 0 422 217, Australian Pat. No. 646803 and Japanese Pat. No. 3009458 have been issued to Promega Corporation for the methods and compositions for production of human recombinant placental ribonuclease inhibitor.

(b) U.S. Pat. Nos. 4,966,964, 5,019,556 and 5,266,687, Australian Pat. Nos. 616881 and 641261 and other pending and issued patents, which claim vectors encoding a portion of human placental ribonuclease inhibitor, are exclusively licensed to Promega Corporation.

(c) The method of recombinant expression of Coleopteraluciferase is covered by U.S. Pat. Nos. 5,583,024, 5,674,713 and 5,700,673.

(d) The RiboMAX™ Large Scale RNA Production System T7 (Cat.# P1300) is covered by U.S. Pat. No. 5,256,555 and is sold under a license from Ambion, Inc. It is intended for research use only. Parties wishing to use this product for other applications should contact Ambion, Inc.

(e) U.S. Pat. No. 4,766,072 has been issued to Promega Corporation for transcription vectors having two different bacteriophage RNA polymerase promoter sequences separated by a series of unique restriction sites into which foreign DNA can be inserted.

(f) U.S. Pat. Nos. 5,658,548 and 5,808,041 and Australian Pat. No. 689815 have been issued to Promega Corporation for nucleic acid purification on silica gel and glass mixtures. Other patents are pending.

(g) Licensed under one or more of U.S. Pat. Nos. 5,487,993 and 5,827,657 and European Pat. No. 0 550 693.

(h) U.S. Pat. No. 5,981,235 and Australian Pat. No. 729932 have been issued to Promega Corporation for methods for isolating nucleic acids using alkaline protease. Other patents are pending.

(i) Australian Pat. No. 730718 and Singapore Pat. No. 64532 have been issued to Promega Corporation for an improved filtration system and method. Other patents are pending.

(j) U.S. Pat. Nos. 5,283,179, 5,641,641, 5,650,289 and 5,814,471, Australian Pat. No. 649289, European Pat. No. 0 553 234 and Japanese Pat. No. 3171595 have been issued to Promega Corporation for a beetle luciferase assay method, which affords greater light output with improved kinetics as compared to the conventional assay. Other patents are pending.

(k) 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.

(l) U.S. Pat. No. 6,242,235 has been issued to Promega Corporation for polymerase stabilization by polyethoxylated amine surfactants. Other patents are pending.

(m) Patent Pending.

(n) For research use only. Not for human diagnostics or therapeutics or the commercial sale of transgenic animals. Use for any purpose other than research requires permission from Allele Biotechnology, Inc.
This product is covered under license from Carnegie Institution of Washington. Commercial use of this product may require a separate license from Carnegie.

© 2003 Promega Corporation. All Rights Reserved.

Flexi, pGEM, Riboprobe, RNasin and Wizard are trademarks of Promega Corporation and are registered with the U.S. Patent and Trademark Office. RiboMAX and siLenrGene are trademarks of Promega Corporation.

SYBR is a registered trademark of Molecular Probes, Inc.

All prices and specifications are subject to change without prior notice.

Product claims are subject to change. Please contact Promega Technical Services or access the Promega online catalog for the most up-to-date information on Promega products.