

siRNA 試験管内合成法

高木 均、松川 茂 (福井大学 総合実験研究支援センター)

バイオメディカル研究支援分野 バイオ実験機器部門)

TAKAGI Hitoshi, MATSUKAWA Shigeru: The method of siRNA synthesis by in vitro transcription

RNA interference(RNAi) is an eukaryotic cell phenomenon in which a double stranded RNA(dsRNA) potentially reduces the expression of the homologous gene through degrading the specific complementary mRNA. Small interfering RNAs(siRNAs) used for RNAi experiment consisting of 21bp dsRNA are usually provided by chemical synthesis. The exploration of siRNA sequence permitting target gene suppression is of particular importance and time consuming, cost expensive process since all of synthesized siRNAs can not necessarily exert RNAi effect. We established a low cost, easy 2-day method for siRNA preparation by in vitro transcription using conventional laboratory tools only.

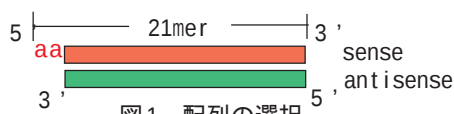
1. はじめに

近年、2本鎖RNAによる特異的な遺伝子発現抑制(RNAi:RNA interference)が注目を浴びている。このRNAi実験に用いられる3'末端に一本鎖UU配列を持つ21塩基長の2本鎖RNA(siRNA:small interfering RNA)は化学合成によって供給されている。しかし、作製したsiRNAが遺伝子抑制効果を示すかどうかは不確定であり、有効な配列を見つけるまでには試行錯誤が必要のため、高価な化学合成を最初から行うのはリスクが高い。そこで、我々はsiRNAを全行程2日間で実験室にある機器を使って簡単に安価に試験管内で合成する方法を確立するのを目的とした。

2. 方法

(1) siRNAの配列選択

AA配列から始まる21merの配列を選択する。(図1)



(2) テンプレート用オリゴの注文

sense template用primerはantisense配列の3'側にアダプター配列(cctgtctc)を付ける。また、5'側にはaaを付ける。antisense template用primerはsense配列の3'側にアダプター配列を付け、オリゴを注文する。また、アダプター配列と相補的な配列を持つT7 promoter primerも注文する。(図2)

(3) テンプレートの作製

PCRによりT7 promoter配列が付いたsense、antisenseテンプレートを別々に作製する。(図2、3表1、2)

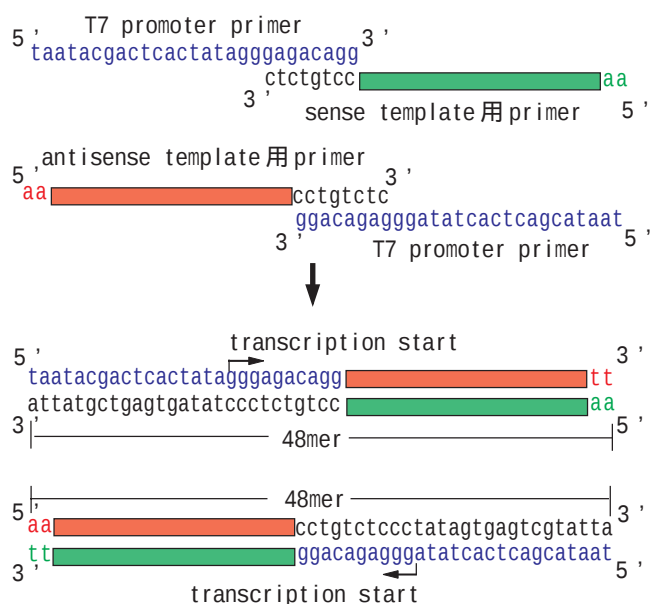


図2 PCRによるテンプレートの作製

T7 promoter primerとsense及びantisense primerがそれぞれアニーリングし、伸長することによりテンプレートが出来る。その後、PCRにより増幅する。

	sense	antisense
DEPC水	8μl	8μl
10 × PCR buffer	2μl	2μl
dNTPs (2mM each)	2μl	2μl
T7 promoter primer (5μM)	4μl	4μl
sense or antisense primer (5μM)	4μl	4μl
enzyme	0.1μl	0.1μl
total	20μl	20μl

表1 PCR反応液

95	15分
↓	
95	20秒
↓	
35	20秒
↓	
95	20秒
↓	
65	20秒

表2 PCRサイクル

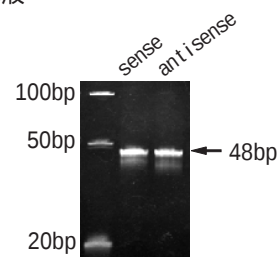


図3 PCRにより作製したテンプレート

(4) RNA 合成

PCR により作製した sense 及び antisense 用テンプレート等を等量ミックスし (表 3) 37 で 3 時間 RNA 合成を行う。(図 4、5)



図 4 RNA 合成により作製された 2 本鎖 RNA
sense 及び antisense テンプレートをミックスして RNA 合成反応を行うため作製された RNA は 2 本鎖となる。

DEPC 水	7μl
5 × buffer	4μl
CTP (100mM)	1.5μl
UTP (100mM)	1.5μl
GTP (100mM)	1.5μl
ATP (100mM)	1.5μl
sense template	1μl
antisense template	1μl
enzyme(CUGA 7)	1μl
total	20μl

表 3 RNA 合成反応液

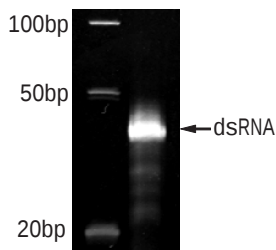


図 5 合成された 2 本鎖 RNA

(5) RNase T1 による消化

合成した RNA に RNase T1 を加え (表 4) 37 で 3 時間反応させて余分な配列を消化する。(図 6、7)

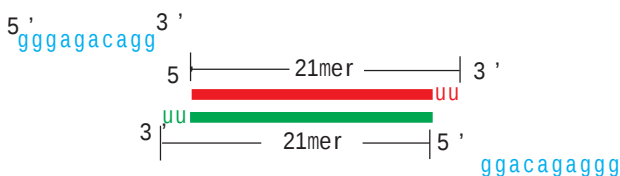


図 6 RNase T1 による消化
RNase T1 は一本鎖 RNA の G 塩基の 3' 側ホスホジエステル結合のみを特異的に切断する。3' 側の UU は GG と結合出来ないため、図の位置で塩基が切断される。

RNA 生成物	20μl
RNase T1(10U/μl)	3μl
DEPC 水	17μl
total	40μl

表 4 RNase T1 反応液

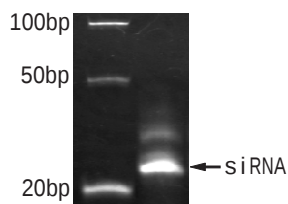


図 7 余分な配列が消化された siRNA

(6) siRNA の精製

ポリアクリルアミドゲル電気泳動により siRNA を分離し、ゲルより抽出し精製する。分離、精製時のポイントは以下の通りである。

マーカーは泳動せずに、定電流 (20mA) で 40 分間泳動する。

泳動終了後、ゲルを両端 1 レーン分カットし両端の

ゲルのみをエチジウムブロマイド溶液で染色する。染色の終わった両端のゲルを残りのゲルと共にハイブリバグの内側に並べ、トランスイルミネーター上で両端の siRNA のバンドを目安にして中央のゲルの siRNA を含むゲルをカットする。(ハイブリバグの下に紙を差し込んでカットの目安にする。) カットしたゲルを細かくして DEPC 水を 300μl 加え、37 でシェイクしながら 1 時間 siRNA を抽出する。抽出液を交換し 2、3 回行う。

Ultrafree MC 精密ろ過メンブレン 0.45μm (ミリポア) でろ過し、濃縮遠心機で 100μl 以下に濃縮後、エタノール沈殿する。

3. 結果

作製した GFP 特異的配列を持つ siRNA と GFP plasmid を培養細胞 (CHO) に cotransfection した結果、GFP 蛋白の発現を特異的に抑制できた。(図 8)

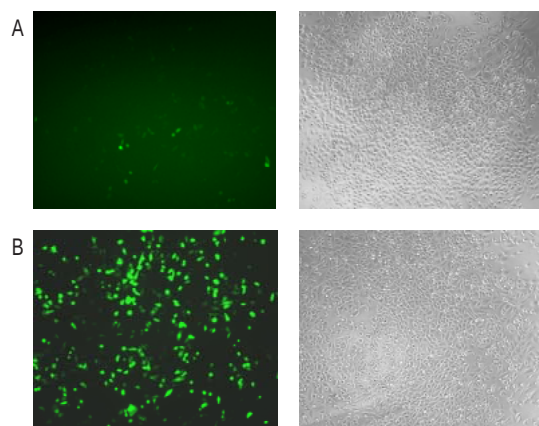


図 8 siRNA と GFP plasmid の cotransfection
A は GFP 特異的配列を持つ siRNA と GFP plasmid、B はネガティブコントロールとしてスクランブル配列の control siRNA と GFP plasmid を導入した。導入試薬: Lipofectamine 2000、siRNA 量: 10nM

4. 考察

トランスフェクションの結果より作製した siRNA が特異的な遺伝子抑制効果があることが確認できた。また、合成に特別な手法は必要とせず、試薬や器具類も実験室にあるものを使用して簡単に作製できた。この方法により高価な化学合成の siRNA を使用するのに比べ簡単に手軽に RNAi 実験を始めることが出来ると思われる。

参考文献

Ambion:Silencer™ siRNA Construction Kit Manual