

RNA プローブ作製法

文責 基礎生物学研究所脳生物学研究部門 渡我部 昭哉

ver. 1.0 2006年10月1日

ver. 1.1 2007年4月11日

ver. 1.2 2007年5月20日

ver. 1.3 2014年7月3日

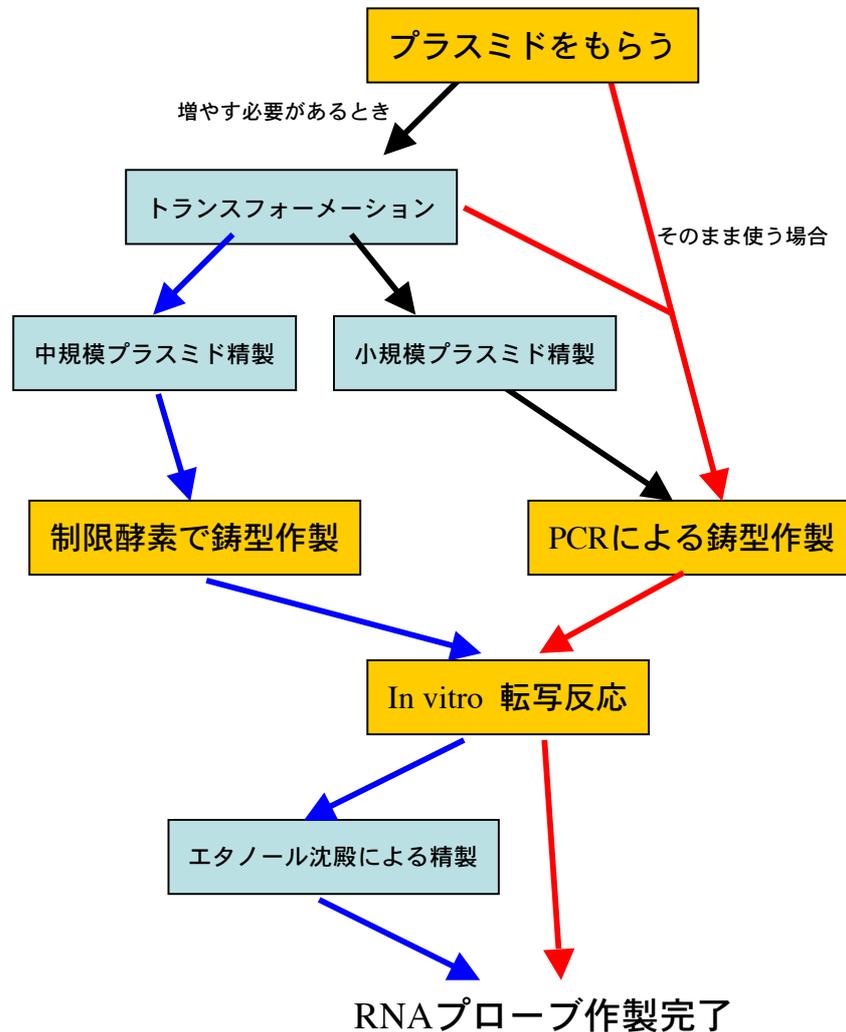
目次

- (0) RNA プローブ作製の概略
- (1) 試薬類
- (2) 基本の実験操作
- (3) プラスミドをもらったら
- (4) PCR による鋳型作製
- (5) 制限酵素で鋳型作製
- (6) in vitro 転写反応
- (7) 備考

注意事項

このプロトコルでは文字化けによる間違いを防ぐためにマイクロを u と表記している。例えば、マイクロリットル、マイクログラムは ul, ug、3 uM は3マイクロモルのこと。

<RNA プローブ作製の概略>



このプロトコルは、プローブづくりの鋳型用プラスミドを他の研究者からもらえることを前提として作製した。RT-PCR で自前で鋳型プラスミドを作製する場合は、PCR cloning.pdf を参照のこと。私たちがルーチンに行っているのは、青い経路で示した作業だが、赤い経路でもプローブ合成は可能。

(1) 試薬類

*一般試薬

MilliQ 水：超純水のこと。Milipore 社の MilliQ が有名。

TE: 10 mM Tris-HCl (pH8.0), 1 mM EDTA

3M NaOAc (pH 7)：酢酸ナトリウム・3水和物を溶かして酢酸で pH 合わせ。

70% エタノール

エタノール

フェノールクロロホルム:TE 平衡化フェノールとクロロホルムを等量混ぜる。

クロロホルム

PEG/NaCl: 20%PEG6000, 2.5M NaCl

DEPC 水 MilliQ 水を DEPC 処理したもの:0.1%相当の DEPC を MilliQ 水に加え、
一晩おく。オートクレーブを 40 分行って DEPC を分解する。

STE: 150 mM NaCl, 10 mM Tris.Cl (pH8.0), 1 mM EDTA

TE970ul に 5M NaCl を 30ul 足す

DMSO：和光などから生化学用を購入、分注して冷凍保存。

*分子生物学試薬

PCR の酵素：

私たちは ExTaq (Takara)とそれに付属するバッファ、dNTP を使用しているが、
基本的にどんな PCR 酵素でも OK.

ExTaq: Takara #RR001A

RNA ポリメラーゼ

T3/T7/SP6 ポリメラーゼ

我々は Roche 社のものを使用している。10x バッファは添付。

T3 (#1031163), T7 (#881767)

DIG/FITC 標識 UTP

他の NTP と適量混ぜたラベリングミックスを Roche 社から購入している。

DIG RNA Labeling Mix (#1277073)
Fluorescein RNA Labeling Mix (#1685619)

<その他>

RNasin: RNase inhibitor (Promega #N211A)

RQ1 RNase-free DNase (Promega #PM-M6101)

ProbeQuant G50 spin column (Amersham pharmacia #AP-27-5335-01)

PCR 用プライマー：外注 Sigma, Invitrogen など

制限酵素：Takara, NEB, Toyobo などなど。Roche の Asp718 は KpnI と同じ配列を認識するが 5'突出なので、頻用している（オススメ）。

電気泳動用 10xloading dye：メーカーから添付で手に入る。自作も可。

*大腸菌関係

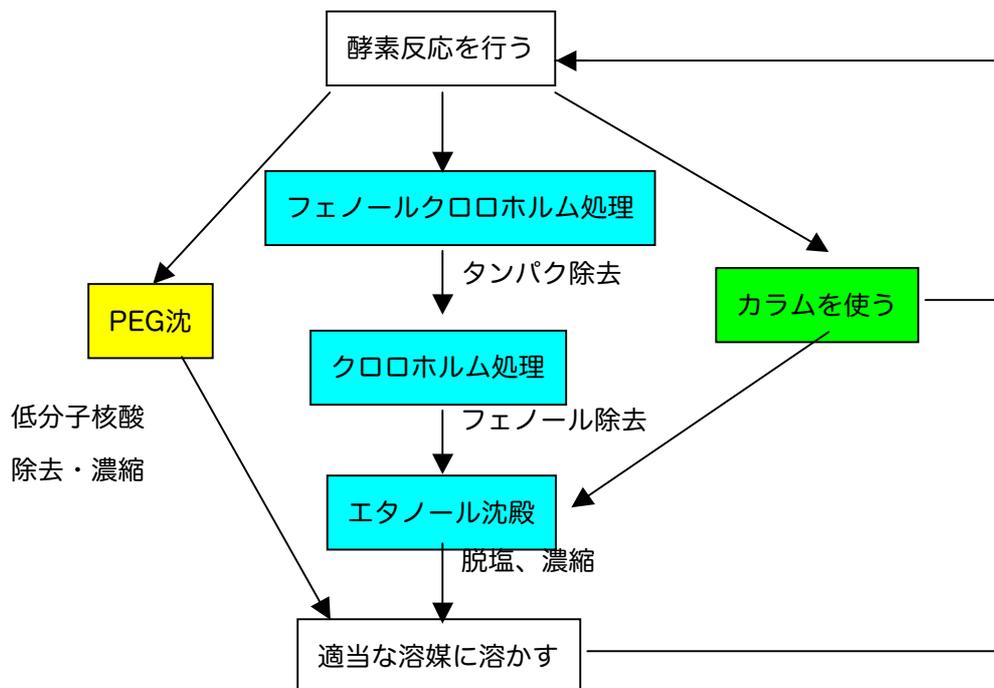
コンピテントセル：Takara, Toyobo などから購入可能（DH5 α など）。自作も可。

LB 培地：Difco LB Broth Lennox (Becton Dickinson #240230) パウダーを溶かして、オートクレーブ滅菌。

アンピシリン：注射用ビクシリン（明治製菓）。粉を 100 mg/ml の濃度で滅菌水に溶かし、1 ml ずつ分注して冷凍保存。終濃度 50-100ug/ml で使用。

(2) 基本の実験操作

分子生物学的手法の基本は、酵素を使って核酸に操作を加えること、そこから核酸を精製することの繰り返りで、概念的には下図のようになる。



最も一般的な精製の仕方は、フェノールクロロホルムからエタノール沈殿までのステップ。ただし、低分子の核酸を除去したい場合は、PEG沈を行うか、カラムを使う。コストはかかるが、各種のカラムを使えば、実験ステップを簡素化できる。以下に各ステップの操作について述べる。

酵素反応をする (一般的な注意)

- ・ 液を混ぜる時は、バッファ→水→核酸→酵素の順番に入れる。
- ・ 大事なのは DNA と水は混ぜない方がいいことと、酵素は最後に入れること。
- ・ 酵素は失活しないよう、フリーザーから取り出したら必ず氷上に保管。
- ・ タッピングで混ぜるときに泡が出るくらい激しく混ぜると酵素が失活する。
- ・ 混ぜたあと軽く遠心で液を底に落として適当な温度で保温する。

フェノールクロロホルム処理

酵素反応後、タンパクを失活、除去するための基本方法。核酸を含む液（100-200 ul 程度）に等量のフェノールクロロホルムを加えよく混合。遠心機で5分まわし、水層とフェノール層に分離する。中間層を吸わないように注意して、上層を分取し、新しいチューブに移す。なお、この操作は核酸が「汚い」ときに「きれいに」するときによく行う。

クロロホルム処理

フェノール処理後、フェノールを除去するために行う。フェノールクロロホルム処理後は、必ずしも必要ではないが、私たちの研究室では通常行っている。核酸を含む液と等量のクロロホルムを混ぜ、遠心機で2分～5分まわす。上層を分取し、新しいチューブに移す。

エタノール沈殿

核酸の精製、濃縮によく行う。核酸を含む液に10分の1量の3M NaOAcを加え、2.5倍量のエタノールを加えよく混ぜる。 -20°C で15分（場合によってはすぐ）静置後15000rpmで遠心15分行う（核酸が数十グラムある時は2～5分の遠心で十分）。核酸は沈殿するので、液を捨てて、75%エタノールでリンス(500 ul 加えて、遠心ののち除く)し、風乾（チューブの口を開けて放置：キムワイプなどで軽くフタをしておく）後、適量の水、もしくはTEに溶かす。

エタノール沈殿は分子生物の基本の操作だが、初心者がもっとも失敗しやすい操作でもある。核酸の沈殿（ペレット）は10ug くらいあればかろうじて見えるが、数ug 以下だとまず見えないので、液を捨てるときに沈殿と一緒に捨ててしまわないように注意する。チューブを平底のものにして、1回目はP1000のピペットマンを使って数十マイクロリットル程度は残すように上澄みを捨て、2回目はペレットの反対側の底にP200の細いチップを押し当ててゆっくり吸うようにすれば、ペレットが見えなくてもなくすことはない。

なおエタノール沈殿を行えば、少量のヌクレオチドや、オリゴヌクレオチドは除去できるが、大量に存在している場合は核酸と一緒に沈殿するので除去できない。

PEG 沈

プライマーなどの低分子核酸を除去するために行う。核酸を含む液と等量の

PEG/NaCl を混ぜ、15000rpm で 15 分遠心。液を捨てた後、70%エタノールでよく洗い、もう一度5分遠心して、液を捨て沈殿を風乾させた後、適量の水や TE に溶かす。

(3) プラスミドをもらったら

プラスミド DNA は、通常水か TE に溶けた溶液の状態ですられてくるか、濾紙にしみこませて送られてくる。送られてきたプラスミドをもとに、そのまま PCR で鑄型を作製することができる(次章参照)が、自分でプラスミドを大量に精製したい時は、トランスフォーメーション(形質転換)する。

A) トランスフォーメーション(形質転換)

* 濾紙の場合

- (1) TE 50 ul をチューブに入れておく。
- (2) DNA がしみこんでいる部分をきれいなハサミで切り抜き、チューブに移す。
- (3) 5分ほど放置する。
- (4) 2 ul を適量のコンピテントセルと混ぜる。
- (5) 氷上で 20-30 分放置。
- (6) 42°C で 1 分間処理し、すぐに氷に戻す。
- (7) LB 培地で薄め、一部をアンピシリンプレートにまく。
- (8) 37°C で一晩インキュベートする。

使う DNA 量、コンピテントセルの量、まく量は、適宜調節し、コロニーがよく分離するようにすること。

* 溶液の場合

DNA 溶液を TE で 1-10 ng/ul に薄める。1 ul 使ってトランスフォーメーションする。

B) コロニーのチェック

鑄型づくりをする前に、コロニーが正しいプラスミドを持っていることを確認すること。ミニプレップでプラスミド精製をしても良いが(次セクション)、コロニーから PCR でプラスミドのインサート部分を増幅して配列決定が可能。

* コロニー PCR

>チェックしたいコロニーの数に必要な分量の PCR 反応液を用意する

	Per sample
10xExTaq buffer	2
2.5 mM 4dNTP	1.6
MilliQ water	13.3
Primer mix (5uM each for M13 forward and reverse primers)	2
DMSO	1
ExTaq	0.1

	20 (ul)

>PCR チューブに 20 ul ずつ PCR 反応液を分注

>滅菌したピペットチップでコロニーをつつき、マスタープレートに接種したあと、PCR チューブにつっこむ。必要な数だけ繰り返す。全部ついたら、ピペットチップを反応液から出し捨てる。

>PCR 反応（以下のサイクルは目安）

95C 5min

(94C 30 sec, 55C 30 sec, 72C 1 min)x25-30 cycles

4C forever

>反応液から 1-2ul 分取し、1xloading dye と混ぜる。1%アガロースゲルで泳動し、サイズをチェック

>予想されたインサートサイズのバンドが確認できたら精製ステップへ

* 精製

PEG 沈による精製。私たちは通常このプロトコルで精製している。

>PCR 反応液と等量の PEG-NaCl (20% PEG6000, 2.5 M NaCl) をチューブに加える。

>よく混ぜてすぐに 14000rpm で遠心 15 min.

- >液を捨てる。
- >1 ml の 75% エタノールでリンスする（PEG を除くためにチューブの壁をよく洗うこと）
- >5 分間遠心してまた液を除く。
- >室温 10 分で、ペレットを乾燥させる。
- >乾燥した DNA のペレットを 10 ul TE に溶かす。
- >シーケンス反応には 1 ul を使用。

PEG 沈の代わりにカラム精製しても良い。プロトコルはセクション（3）「PCR による鋳型精製」参照。

* シーケンス反応

Perkin Elmer の BigDye ver 1.1 を使用。。

5xBuffer	1.2 (添付)
BigDye v1.1	0.5
Primer (4-50uM)	1.2
DMSO	0.4
DNA+MilliQ water	3.7

	7 (ul)

>PCR 反応

95C 1min
 (96C 10 sec, 50C 5 sec, 60C 4 min)x25 cycles
 4C forever

- >反応液に 0.7ul 3M NaOAc, 20ul エタノールを加えて混ぜる。
- >氷上で 10 分。遠心 15 分。
- >液を捨てて、70%エタノールでリンス。液を捨てて真空ポンプで乾燥。
- >ホルムアミド 13ul に溶かしてシーケンサー（ABI Prism 310）にかける。

注 1：GC リッチな場合などは、読めないことがある。その場合は増量する。

C) 小規模プラスミド精製 (ミニプレップ)

普通のアルカリ法のプロトコル。以下のプロトコルは簡略バージョンなので、多少大腸菌ゲノム DNA が混入する。変性したアルカリバンドもやや多い。制限酵素チェック、シーケンスなどにはそのまま使える。

>> 試薬

Sol I 50 mM Glucose, 25 mM Tris.HCl (pH8.0), 10 mM EDTA (pH 8.0)

Sol II 0.2 N NaOH, 1 % SDS

Sol III 酢酸カリウム 58.9 g を MilliQ 水に溶かす。氷酢酸 (100%酢酸) を 23 ml 加え, MilliQ 水で 200 ml にする。Sol III は冷やしておくが良い。

- 1) 2 ml of LB 培地 (アンピシリン入り) にシングルコロニーを接種し、37°C で一晩振とう培養する。
- 2) 1.5 ml のチューブにデカントで移す。
- 3) トップスピードで遠心 1 分。菌をペレットにする。
- 4) 液を捨てる。
- 5) ペレットを 100 ul の Sol.I にサスペンド (ボルテックスなど)。ここでしっかりサスペンドしておくこと。
- 6) 200 ul の Sol II を加える。菌が溶けて粘性が出てくるので入れたらすぐ混ぜること。多少激しく振っても大丈夫なのでできるだけすばやく混ぜる
- 7) 150 ul の Sol III を加える。何回か振ってよく混ぜる。白い残滓 (カリウムと SDS の複合体にタンパクやゲノム DNA が絡まったもの) が出る。
- 8) 400 ul のフェノールクロロホルムを加え、振って混ぜる。遠心 3 分。
- 9) 上層を新しいチューブに移す。
- 10) エタノールを 1 ml 加える。良く振って、遠心 2 分。
- 11) 液を捨てる。
- 12) ペレットを 75% エタノールでリンス。
- 13) ペレットを室温 10 分で乾燥。
- 14) ペレットを 50 ul の RNase A (20 ug/ml)入り TE に溶かす。

Sol III を入れた後は、氷上で 20 分ほど置いておいた方が、アルカリ変性バンドは少ない。またフェノールクロロホルムを入れる前に、遠心をして残滓を除いておい

た方がゲノム DNA の混入は少ない。最終サンプルには RNase が入っているので、扱いには注意すること（RNA プローブを泳動する泳動槽は使わないなど）。

D) 中規模プラスミド精製 (midscale)

大量にプラスミドを精製したいときには、50-200ml の培養液から数十 ug~数百 ug のプラスミド DNA が精製できる。Qiagen 社などのプラスミド精製キットを使うと良い。私たちはキットを使わず精製している (midscale.pdf 参照)。

(4) PCR による鋳型精製

10xExTaq buffer	2
2.5 mM 4dNTP	1.6
Primer mix	2
(5uM each for M13 forward and reverse primers)	
DMSO	1
DNA+MilliQ 水	13.3
ExTaq	0.1

	20 (ul)

これはコロニーPCRと同じ反応系。DNAとしては、コロニーでも可。プラスミドDNAの溶液を使う場合、量が多すぎるとPCRがかからないので、20ul系なら50ngくらいの量を使うと良い。PCRの「かかり」が悪い時は、適当な制限酵素で直鎖化しておくとうまくかかる。

>PCR 反応 (以下のサイクルは目安)

95C 5min

(94C 30 sec, 55C 30 sec, 72C 1 min)x 20-30 cycles

4C forever

>反応液から1-2ul分取し、1xloading dyeと混ぜる。1%アガロースゲルで泳動し、サイズをチェック

>予想されたインサートサイズのバンドが確認できたら精製ステップへ

* 精製

Probe QuantG50 カラムを使う。

>カラムの底を折ってチューブにセット。カラムのフタは軽くゆるめておく。

>3000rpmで1分間遠心。

>新しいチューブにカラムをセット。

- >PCR 反応液に STE を足して 50ul にする。
- >PCR 反応液をカラムにアプライ。壁に直接液がつかないように注意すること。
- >3000rpm で 2 分間遠心。
- >PCR 反応物がチューブに回収される。
- >シーケンス反応には 3.7ul 使用。In vitro 転写には 5ul 使用。

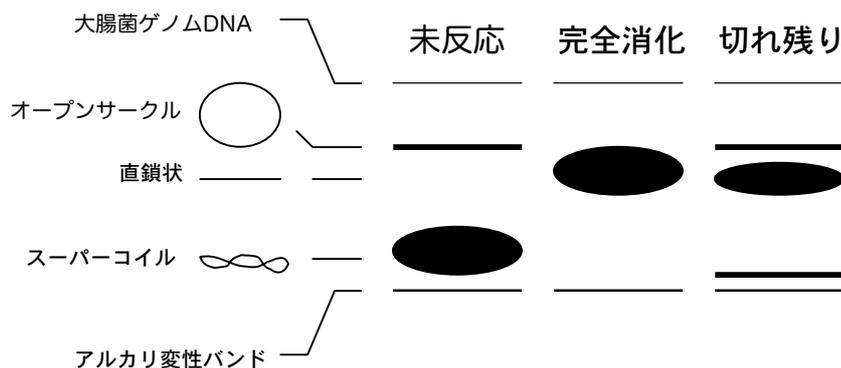
(5) 制限酵素で鑄型作製

中規模プラスミド精製で数十マイクログラムのプラスミドを精製したのち、制限酵素で DNA を直鎖化し in vitro 転写反応の鑄型とする。これが私たちの研究室の標準の方法。

- 1) センス鎖用とアンチセンス鎖用に、適当な制限酵素を選ぶ(注1)。プローブ内部に制限酵素の認識サイトがないことを確認すること。
- 2) 10 ug のプラスミドを制限酵素で消化。37°C 2時間~終夜反応。

10XBuffer	5 ul	(制限酵素に通常は添付)
MilliQ water	適量	
DNA	10 ug	
制限酵素	3-5 ul (20 unit-30 unit)	
		50 ul

- 3) 反応液の一部を電気泳動し、完全に直鎖化していることを確認。もしまだ切れのこりがあれば、酵素を足して反応を延長する。



図の説明：大腸菌内ではプラスミドはねじれた状態（スーパーコイル）状態で存在しているが、精製の過程で2本鎖の片側に切れ目（ニック）が入ると、ねじれ状態がほどけた「オープンサークル」状態になって、電気泳動の状態が変わる。制限酵素で切断すると、完全に直鎖化し、スーパーコイル、オープンサークルのバンドは消える。精製の状況によっては、スーパーコイルのバンドよりわずかに早く流れるバンドが観察されることがある。これは、アルカリで変性した DNA のバンドで、制限酵素による切断を受けない。これらのバンドの他に、プラスミドがダイマー化したバンドが、オープンサークルの付近に観察される時がある。

- 4) 130 ul MilliQ 水, 20 ul 3M NaOAc, 200 ul フェノールクロロホルムを加え、

よく混ぜる。

- 5) 遠心 5分
- 6) 上層を新しいチューブに移し、 200 ul クロロホルムと混和。遠心 2分
- 7) 上層を新しいチューブに移し、 500 ul エタノールと混和。
- 8) -20°C 15分静置後、遠心 15分
- 9) 液を捨てる。
- 10) 75%エタノールでリンス。
- 11) 沈殿を風乾、約 10分。
- 11) 沈殿を 15 ul TE に溶かす: これで DNA 濃度は 0.5-0.7 ug/ul の計算。

注 1 : KpnI, SacI, PstI などの 3'突出酵素は避ける。反応効率が良くなかったり、RNA ポリメラーゼが反対鎖の方に回ると言われている。私たちは、KpnI の代用として Asp718 (Roche)を頻用している。

注 2 : 反応液に入れる制限酵素の液量は、全体の 10分の 1 以下にした方が良いと言われている。制限酵素は通常グリセロール液で保存されており、グリセロールの持ち込みが、制限酵素の反応特異性に影響することがあるからである。制限酵素の「ユニット」は、至適条件下でラムダファージ DNA を 1時間で 1ug 完全消化できる量と定義されることが多い。スーパーコイルしたプラスミド DNA を消化するには、通常この 2~3 倍量の制限酵素が必要である（酵素によって異なる）。

(6) In vitro 転写反応

RNA の取扱について

RNA は非常に壊れやすいので取扱に注意が必要。これは RNA が化学的に不安定だからではなく、RNA 分解酵素(RNase)が非常に安定 (RNase はオートクレーブしても失活しない) で、そこら中に存在しているからである。一般的注意として以下の事項に留意すること。

- 1 RNA の作業は、手袋着用。つばが飛ぶので、しゃべりながら作業しない。
- 2 できれば RNA 作業専用のワークエリアを作って、ここでは RNase を取り扱わないようにする。
- 3 でもそれよりもっと大事なのは実験に使う RNase をまき散らさないこと。RNase の濃縮液を扱ったチップ、廃液は専用の捨て場に捨てるなどしてラボ全体を RNase-free に保つ方が重要。
- 4 RNase 除去用洗剤 (RNase-zap (Promega) や Absolve (NEN)など) は有効。

プロトコル

* 反応液の調製

10xTranscription buffer	2 ul
DIG labeling mix (10x)	2 ul (注1)
DEPC 水	11 ul
鋳型 DNA#	2 ul
RNasin	1 ul
T3/T7 RNA polymerase	2 ul

制限酵素で直鎖化したもの、約 1ug 相当。

PCR で鋳型を作った時は、5ul 使用。

*37°Cで 2 hr-5 hr 保温。

*1 ul の RQ1 DNase を加え、さらに 20 分保温。

*30 ul の STE を加えて混和。

- * 1 ul を 1xloading dye と混ぜて電気泳動（注 2）。
- * RNA 合成が確認できたら ProbeQuant G50 カラムで精製。
 - > カラムの底を折ってチューブにセット。カラムのフタは軽くゆるめておく。
 - > 3000rpm で 1 分間遠心。
 - > 新しいチューブにカラムをセット。
 - > STE で薄めた反応液をカラムにアプライ。
 - 壁に直接液がつかないように注意すること。
 - > 3000rpm で 2 分間遠心。
 - > チューブに RNA が回収される。
- * 10 ul 3M NaOAc、40 ul DEPC 水、250 ul エタノールを加えてエタノール沈殿（注 3）。
- * -20°C 15 分ののち、遠心 15 分
- * 75%エタノールでリンス後、風乾 10 分（注 4）
- * 50 ul の DEPC 水に溶かす。
- * 260/280/320nm の OD 値を測定し、精製度と RNA 量を見積もる。
 - > pH によって OD260 の値は変わるので、OD 測定用には水ではなく TE で薄めること。
 - > 260/280 の比率は 2.0 を越えるはず。
 - > OD320 はバックグラウンドと考える。
 - > 原液の RNA 濃度=(OD260-OD320)x40 x 希釈率（50 倍など） ng/ul
 - > RNA は 5-10ug 程度回収できるはず。

注 1：Fluoresein (FITC)、biotin 標識にはそれぞれの 10x 溶液を使用。

注 2：泳動には RNA 専用の泳動槽を使う。RNA は一本鎖なので、通常のアガロースゲルで泳動すると、複数のバンドになることがある。分子量の小さい方向へスメアになっていなければ OK。RNA が壊れているように見えるときは、泳動の問題であることが多いので、泳動バッファ、1xloading dye などを変えて流し直すと良い。

注 3：エタノール沈殿しなくても良い。ただし、エタノール沈殿をしないと、OD 値が少しおかしい。

注 4：乾かしすぎると溶けなくなる。

プローブの加水分解プロトコル

プローブの長さが 1000 塩基前後なら加水分解しなくても十分 ISH に使える。1200 塩基くらいまでのプローブは普通はそのまま使う。少しでもシグナルを強くしたい場合(800 塩基以上の場合)や、2000~3000 塩基以上の長い RNA プローブの場合は以下のプロトコルで加水分解して用いると良い。ただしバックグラウンドが上がる可能性があるのでコントロールには気をつけること。

試薬:

0.25M NaHCO₃

0.25M Na₂CO₃

加水分解バッファ

2 ml NaHCO₃

3 ml Na₂CO₃

5.75 ml DEPC 水

(以上を混ぜると 0.1M Na-CO₃ バッファ, pH 10.2 になる)

>In vitro 転写反応 (20 ul 系) を RQ1 処理まで行う。

>180 ul の加水分解バッファを加え 60°Cでプローブの長さに合わせて保温。

プローブ長 (kb)	0.8	1.0	1.2	1.5	2	2.5
時間 (分)	7	9	11	12	14	15

> 所定の時間後すぐにチューブを氷で冷やし、1ul の氷酢酸を加え中和する。

> 3M NaOAc を 20 ul , EtOH を 500 ul 加え混和。

> すぐに 14000 rpm で 15 min 遠心。

> 液を捨てて、ペレットを 50 ul STE に溶かす。

(このペレットの大部分は free のヌクレオチド)

> 上述のように ProbeQuant G-50 カラム、エタノール沈殿で精製。