

リアルタイム PCR による RNAi 効果の確認

特長

- RNAi による mRNA 発現量の低下を正確かつ簡単に測定できる。

原理

逆転写反応とリアルタイム PCR を組み合わせることで、mRNA の発現量を正確に定量することができ、RNAi による mRNA 発現量低下が確認できる。RNAi 効果の確認は、ノザンブロットによる mRNA 発現量の解析・ウェスタンブロットによるタンパク量の解析・表現型の観察などの方法でも行われるが、リアルタイム RT-PCR による mRNA 発現量の定量はもっとも簡便な方法で、siRNA のスクリーニングなど簡単に RNAi 効果をチェックしたい場合に適している。

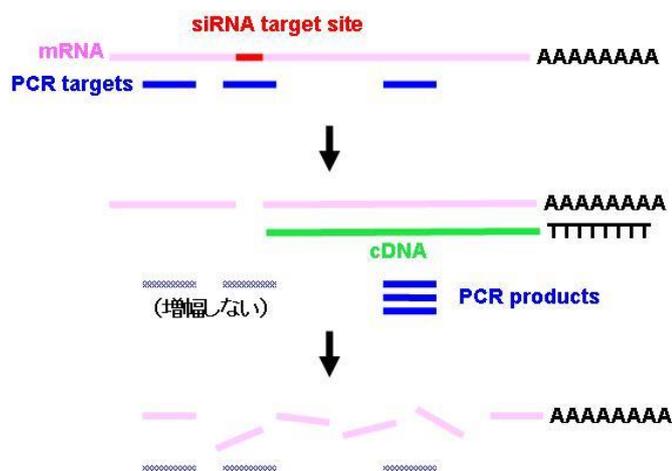
用意するもの (主なもの)

- 逆転写反応試薬 [PrimeScript RT reagent Kit \(Perfect Real Time\) \(製品コード RR037A\)](#) など
- リアルタイム PCR 用試薬 [TB Green Premix Ex Taq II \(Tli RNaseH Plus\) \(製品コード RR820A\)](#) など
- リアルタイム PCR 用プライマー^{*1}
- リアルタイム PCR 装置 (authorized instruments)

***1** プライマー設計位置について

標的 mRNA の切断サイトは、siRNA のガイド RNA 側の 5' 末端側から正確に 10~11 塩基のところであり、siRNA により厳密に制御されている(文献 3)。従って、その切断位置を挟むようにリアルタイム RT-PCR のプライマーペアを設計すれば、より確実に siRNA による mRNA 量の低下を観察できる。しかし、このような設計では、ひとつの siRNA に対し 1 組のプライマーペアが必要になり、スクリーニングなどの用途には適さない。そこで、複数の siRNA について効果を調べたい場合には、mRNA の 5' 末端に近い位置にプライマーペアを設計し、RT-PCR の逆転写反応には oligo dT primer を用いるという方法が有効である。PCR 増幅領域が siRNA の切断位置より 5' 側であれば、siRNA による切断を受けた mRNA では、PCR 増幅領域は逆転写されず PCR で検出されない。ただし、Oligo dT Primer を使用するため、mRNA の全長が長い遺伝子には不向きであり、注意する必要がある。なお、siRNA で切断された mRNA は、構造が不安定になり徐々に mRNA 全体も分解されていくので、十分に時間が経ってから解析する場合には、特に設計位置を気にする必要はない。その場合、プライマーペアは任意の位置に設計すればよく、逆転写反応には、oligo dT primer の他に random primer や specific primer も使用できる。

その他、一般的なリアルタイム PCR 用プライマーの設計方法については、[「リアルタイム PCR 実践編 –プライマー設計ガイドライン–」](#)を参照のこと。



実験例

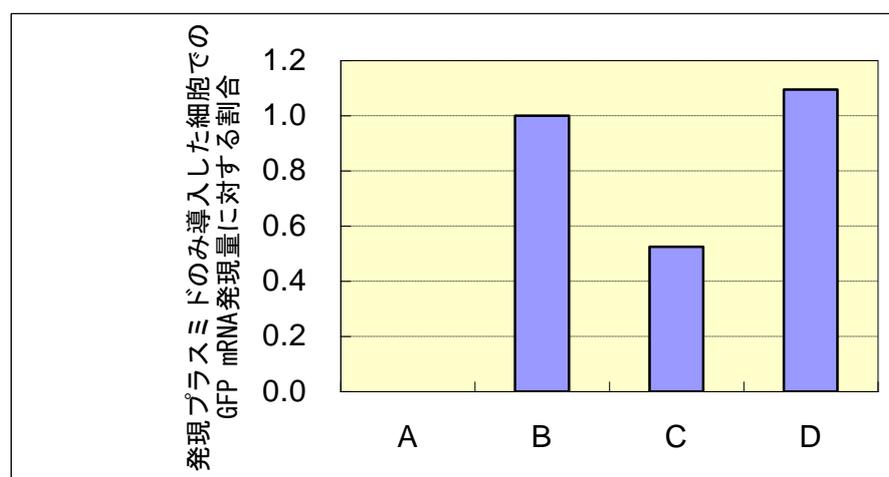
GFP 発現ベクターと GFP に対する siRNA を [TransIT-293 \(製品コード MIR2700\)](#) と [TransIT-TKO \(製品コード MIR2150\)](#) を用いて 293T 細胞に導入し、翌日、FCM (Flow cytometry) にて GFP の蛍光強度を測定した。同時に、siRNA を導入した細胞等から total RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR で GFP の mRNA 発現量を測定し、FCM の結果と比較した。今回、リアルタイム RT-PCR 用のプライマーは、導入した siRNA による切断部位を挟むように設計した。

1. 方法

total RNA 50 ng を鋳型として逆転写反応を行った。次いで、逆転写反応液のうちの 2.5 μ l を用いてリアルタイム PCR を行い (Smart Cycler II System 使用)、siRNA の効果の検証を行った。

GFP の他に、4 種の Housekeeping gene (ACTB、GAPD、B2M、HPRT1) の発現量を測定し、鋳型として用いた total RNA 量を補正した。

2. 結果



A : 293T 細胞

B : 発現プラスミドのみ導入 (negative control)

C : 作製 siRNA 導入

D : 作製 siRNA-shuffle を導入 (negative control)

リアルタイム RT-PCR による mRNA 発現量の測定結果は、FCM 解析の結果とよく一致し、GFP に対する siRNA の効果を確認することができた。

関連製品・関連サービス

[PrimeScript RT Master Mix \(Perfect Real Time\) \(製品コード RR036A\)](#)

[TB Green *Premix Ex Taq* II \(Tli RNaseH Plus\) \(製品コード RR820A\)](#)

[Perfect Real Time サポートシステム](#)

本サポートシステムは、インターカレーター法 (TB Green 検出) によるリアルタイム RT-PCR 用に最適化されたプライマーを検索・オンライン注文するためのシステムです。ヒト、マウス、ラットの RefSeq 登録遺伝子に対して網羅的にリアルタイム RT-PCR 用のプライマーを設計しています。ターゲット遺伝子を検索し、ご希望のプライマーセットを選択すれば簡単にオンラインで注文できます。

参考文献

- 1) 山本純子, 向井博之 (1999) 蛋白質・核酸・酵素 **44**, 189-193.
- 2) 川上文清, 石田由和 (1997) 細胞工学別冊「PCR Tips」94-99.
- 3) Elbashir, S.M. *et al* (2001) *EMBO J.*, **20**, 6877-6888.