

# タカラバイオ RNAi 実験関連製品

## 【 [Label IT siRNA Tracker Intracellular Localization Kit シリーズ](#) 】

### 特長

- ・ ワンステップでの siRNA の標識  
(Cy3, Cy5, CX-Rhodamine, TM-Rhodamine, Fluorescein および Biotin)
- ・ siRNA トランスフェクション効率の最適条件探索が可能
- ・ siRNA のリアルタイムでの細胞内局在の探索が可能
- ・ *TransIT-TKO* を用いた高効率な siRNA トランスフェクション
- ・ 目的遺伝子の発現抑制

### 原理

*Label IT siRNA Tracker Intracellular Localization Kit* は siRNA を標識するための試薬 (*Label IT siRNA Tracker Labeling Reagent*) である。Mirus 社独自のテクノロジーにより開発された試薬で、グアニン塩基に直接、化学反応により標識物質を共有結合させることができる。

標識された siRNA は *TransIT-TKO* を用いて動物細胞に導入することができ、トランスフェクション効率の最適化、導入された siRNA の細胞内局在の追跡を行うことが可能である。また、標識された siRNA はその機能を損なうことはなく、目的遺伝子発現抑制が可能である。標識物質として Cy3, Cy5, CX-Rhodamine, TM-Rhodamine, Fluorescein および Biotin が取り揃えられており、実験目的に応じて選択して使用できる。細胞へのトランスフェクション方法については「二本鎖 RNA を用いた RNAi」の項を参照することとし、本章では siRNA のラベル方法について説明する。

### キットの内容

< *Label IT siRNA Tracker Intracellular Localization Kit* >

1. *Label IT siRNA Tracker Labeling Reagent* (**-20°C保存**)
2. *Label IT Reconstitution Solution* (4°C保存)
3. 10× *Labeling Buffer A* (4°C保存)
4. *siRNA Dilution Buffer* (4°C保存)

### 用意するもの

37°Cインキュベーター、 マイクロチューブ遠心機

*Label IT siRNA Tracker Intracellular Localization Kit*

二本鎖 siRNA

滅菌蒸留水 (DNase/RNase フリー)

5 M NaCl

100% 冷エタノール

*TransIT-TKO siRNA Transfection Reagent*

## プロトコール

### ● siRNA のラベリング反応

1. *Label IT siRNA Tracker Reagent* を室温に戻し、スピンドウンしてペレットを落とす。
2. 1に 50  $\mu$ l の *Label IT Reconstitution Solution* を添加し、緩やかなピペッティングによって *Label IT siRNA Tracker Reagent* を溶解する。
3. ラベリング反応液を下記例の通りに調製する。下記例は 10  $\mu$ g の siRNA のラベル反応例であり、キットは 50  $\mu$ g の siRNA のラベル反応が可能である。***Label IT siRNA Tracker Reagent* は最後に添加すること。**

滅菌蒸留水	60 $\mu$ l
10× Labeling Buffer A	10 $\mu$ l
siRNA duplex (~10 $\mu$ g)	20 $\mu$ l of a 40 $\mu$ M stock
<u><i>Label IT siRNA Tracker Reagent</i></u>	<u>10 <math>\mu</math>l</u>
Total volume	100 $\mu$ l

4. 反応液を 37°C で 1 時間インキュベートする。
5. エタノール沈殿  
100  $\mu$ l のラベリング反応液に対し、10  $\mu$ l の 5M NaCl と 250  $\mu$ l の冷 100%エタノールを添加し、-20°Cフリーザーで 30 分以上放置する。
6. マイクロチューブ遠心機で 15 分間、最高速度で遠心分離し、上清を静かに除く。
7. 500  $\mu$ l の 70%エタノール (室温) を添加し、マイクロチューブ遠心機で 15 分間、最高速度で遠心分離し、上清を静かに除く。さらにスピンドウンし、微量に残った 70%エタノールをマイクロピペットで除く。ペレットは完全には乾かさなないこと。
8. 20  $\mu$ l の siRNA Dilution Buffer で沈殿を溶解する。siRNA の濃度は約 40  $\mu$ M となる。正確な濃度が必要な場合は、分光光度計で濃度を測定する。
9. ラベルした siRNA は直ちに使わない場合は、- 20°C で遮光保存する。

### ● ラベルされた siRNA の検出

Cy3, Cy5, CX-Rhodamine, TM-Rhodamine, Fluorescein については、表 1 の励起波長、発光波長を参照し、蛍光顕微鏡やフローサイトメーターのフィルターを選択して検出を行う。Biotin ラベルに関しては一般に広く使われている試薬と組み合わせての使用が可能であり、トランスフェクション後、細胞を固定した後に標識ストレプトアビジンあるいは抗ビオチン標識抗体と反応させて検出を行う。

表 1

	ラベルされたsiRNAの 励起波長 (nm)	ラベル試薬単独の 励起波長 (nm)	発光波長 (nm)
Cy3	549	550	570
Cy5	648	649	670
CX-Rhodamine	587	576	597
TM-Rhodamine	559	546	576
Fluorescein	495	492	518

## 実験例

プロトコールに従い red shift GFP (rsGFP) のターゲット配列 (GGAGTTGTCCCAATTCTTG) に対する siRNA を Cy5 でラベルした。また、ネガティブコントロールとして Bcr/Abl のターゲット配列 (AGCAGAGTTCAAAAAGCCCT) に対する siRNA を Cy5 でラベルした。これら siRNA を用いて、rsGFP を安定に発現している 293 細胞に *TransIT-TKO* siRNA Transfection Reagent を用いてトランスフェクションし、48 時間後にフローサイトメーターにて GFP の蛍光強度を解析した。Cy5 ラベルした siRNA は未ラベル品と同等の RNAi 効果を示した (図 1)。

また、MoFlo (終売製品) を用いて GFP と Cy5 の 2 色で蛍光分析した結果を図 2 に示す。Cy5 ラベルした siRNA が取り込まれて GFP タンパク質の発現を抑制しているのがわかる。

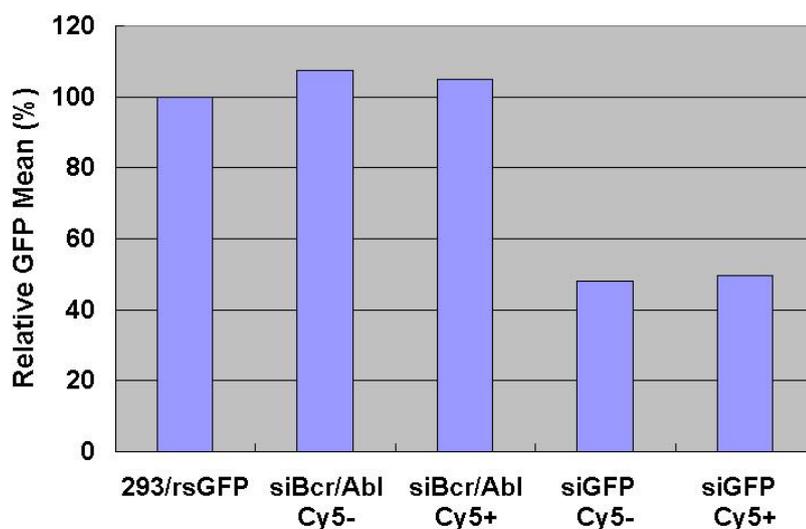


図 1.

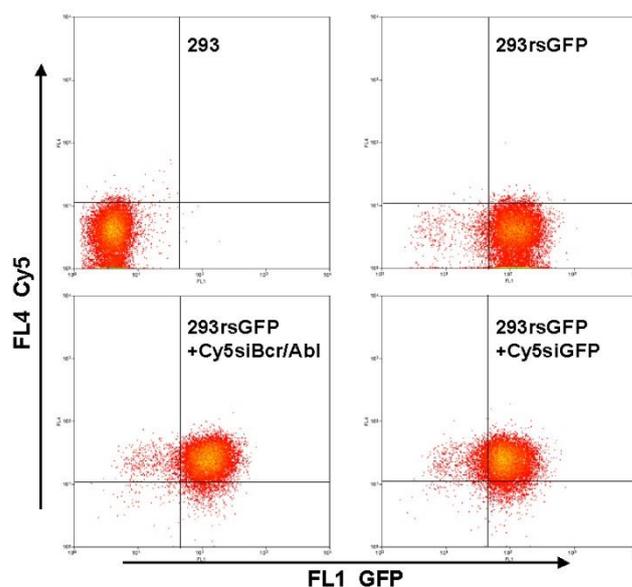


図 2.

## 関連製品

[LabelIT Tracker Cy3 Kit \(製品コード MIR7020\)](#)

[LabelIT Tracker Cy5 Kit \(製品コード MIR7021\)](#)

[LabelIT Tracker CX-Rhodamine Kit \(製品コード MIR7022\)](#)

[LabelIT Tracker TM-Rhodamine Kit \(製品コード MIR7023\)](#)

[LabelIT Tracker Biotin Kit \(製品コード MIR7024\)](#)

[LabelIT Tracker Fluorescein Kit \(製品コード MIR7025\)](#)

[TransIT-TK0 Transfection Reagent \(製品コード MIR2150\)](#)

[TransIT-LT1 \(製品コード MIR2304\)](#)

[TransIT-293 \(製品コード MIR2700\)](#)

[TransIT-Keratinocyte \(製品コード MIR2800\)](#)

[TransIT-HeLaMONSTER \(製品コード MIR2900\)](#)

[TransIT-CHO \(製品コード MIR2170\)](#)

[TransIT-Jurkat \(製品コード MIR2120\)](#)

[TransIT-Oligo \(製品コード MIR2160\)](#)

以上 Mirus 社製