

RNase H-Dependent PCR Primers and Enzyme

RNase H-Dependent PCRとは

RNase H-Dependent PCR (以下、rhPCR) とは、IDTが独自に開発した高感度PCRシステムで、RNase H2という酵素を利用することからRNaseH依存型PCRと呼ばれています。

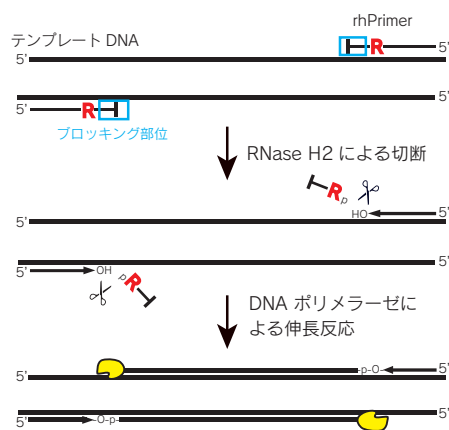
RNase H2は、「RNA/DNAヘテロ2本鎖を認識し、RNAの5'末端側DNAとのホスホジエステル結合を切断する」酵素です。

この高感度PCRシステムでは、プライマーの1塩基をRNAに変更することでテンプレートDNAとRNA/DNAヘテロ2本鎖を形成させ、さらにRNAの3'側にヌクレアーゼが結合できない領域(ブロッキング部位)を設けることにより、RNase H2がRNA/DNAヘテロ2本鎖を認識/切断した場合のみPCRが進行します。

この酵素がRNAとDNAのホスホジエステル結合を切断するには、以下の2つの条件を満たす必要があります。

- (1) プライマー内のRNAがテンプレートDNAの相補塩基であり、ミスマッチではないこと
 - (2) プライマーのRNAの上流10塩基と下流4塩基がテンプレートのDNAと相補であること
- 上記の(1)(2)の条件を満たさない場合はPCRが進行しないため、極めて配列特異的なPCRを行う事が出来ます。

rhPCRの作用スキーム



1. 通常のPCRの準備を行います。
ただし、プライマーをrhPCR用のrhPrimerに置き換え、マスターミックスにRNase H2を加えます。
2. 左図はrhPrimerが、テンプレートDNAにアニーリングし、ヘテロ2本鎖を形成している様子です。
3. RNase H2がrhPrimerのRNAの5'末端側のホスホジエステル結合を切断する事で、ブロッキング部位が乖離し、プライマーの3'末端のOHが露呈します。
4. プライマーの3'末端が露呈したことで、溶液中の遊離DNAとのホスホジエステル結合が出来るようになり、DNAの伸長反応が進みます。
※ RNase H2による切断が起こらなければ、ブロッキング部位がポリメラーゼの結合を阻害するため、PCR産物は産生されません。

rhPCRで出来ること

1) SNPs検出

RNA/DNAが相補配列でなければ、プライマーのブロッキング部位がRNase H2によって切断されないため、PCR産物は産生されません。そのため、ターゲットとなるSNPとrhPrimer中のRNAがマッチする様に設計すれば、ターゲットとなるSNPを持つDNAに対してのみPCR産物が産生され、SNPの有無を識別できます。

2) 高感度PCR

rhPrimerのRNAの上流10塩基と下流4塩基もテンプレートのDNAと相補である必要が有るため、この部位にDNAのミスマッチがあればPCR反応は進みません。そのため、非特異PCR産物の産生を抑える事ができます。サンプルが少ない場合等に特に有用です。

3) マルチプレックスPCR

PCRを進めるためには、RNase H2の認識部位である「DNA14塩基及びRNA1塩基」がテンプレートDNAに対して相補鎖である必要があります。配列の相補性がポリメラーゼだけでなく、RNase H2によってもチェックされますので、非特異産物が厳密に制限され、一度に多数のPCR反応を行うことが出来ます。社内検討では14種のPCR産物を一度に検出できております。

rhPrimerについて

rhPrimerには、GEN1及びGEN2という2種類があります。

右図はGEN1タイプのプライマーです。

GEN1は、RNAがテンプレートのDNAと相補の場合、低濃度のRnase H2でも機能します。このため、反応系の構築が比較的安易かつ安価です。

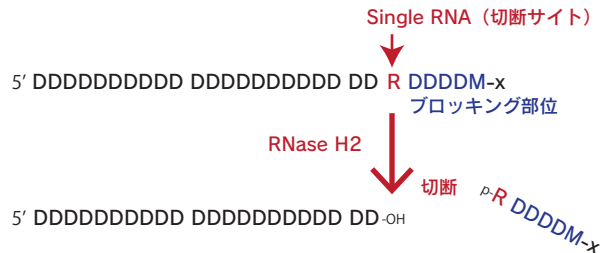
GEN2は3'末端側の配列が、「RDxxDM」という形になります。GEN1に比べてRNA/DNAサイトの特異性が高く、qPCRを用いたレアアルレル検出実験では、GEN1が1:1,000程度なのに比べ、GEN2は1:10,000という検出結果が得られています。

この様にGEN2は高い特異性が求められる実験に有用ですが、反応系の最適化のための条件検討と高濃度のRNase H2が必要となります。

(GEN1: 2-10 mU/10 µL, GEN2: 5-200 mU/10 µL)

そのためrhPCRを行う際は、まずGEN1をお試し頂くことをお勧め致します。

GEN1 rhPrimer



D = テンプレートに相補的な DNA
R = RNA
M = テンプレートに ミスマッチ している DNA 塩基 (ブロッキング部位の一部)
x = ブロッキングのための C3 スペースター修飾

プライマーデザインについて

効果的な rhPCR を行うためには、rhPrimer の RNA の 5' 側に 10 塩基、3' 側に 4 塩基の相補配列が必要です。特に RNA の近接にミスマッチした DNA 配列がある場合には、RNase H2 の切断効率は顕著に減少します。

PCR の一端のみを rhPrimer に置き換えた場合でも rhPCR は機能しますが、両端に rhPrimer を用いる事をお勧め致します。

また、RNase H2 による切断後の配列 (RNA の 5' 側) がプライマーとして機能するため、この プライマーの Tm 値は通常お客様が用いているプライマーと同じになるように設計して下さい。

※ GEN2 rhPrimer の場合には、RNA にウラシルの使用を避けることを推奨します。ウラシルを用いると、より多くの RNase H2 Enzyme が必要となるためです。

価格/納期

カテゴリ	製品名	内容物	価格	納期
プライマー	rhPrimers GEN1 脱塩グレード	…… RDDDDMx のプライマー	¥5,000	5 ~ 10 営業日
	rhPrimers GEN1 HPLC 精製	…… RDDDDMx のプライマー	¥15,400	
	rhPrimers GEN2 脱塩グレード	…… RDxxDM のプライマー	¥7,000	
	rhPrimers GEN2 HPLC 精製	…… RDxxDM のプライマー	¥17,400	
酵素&溶解バッファー (初回発注時にオススメ)	RNase H2 Enzyme Kit	RNase H2 Enzyme Small (50 U at 2 U/μL) 2 mL Dilution Buffer	¥40,000	10 ~ 15 営業日
酵素のみ	RNase H2 Enzyme Small	50 U at 2 U/μL	¥40,000	5 営業日
	RNase H2 Enzyme Large	500 U at 20 U/μL	¥400,000	
バッファーのみ	2 mL RNase H2 Enzyme Dilution Buffer		¥800	5 営業日
	10 x 2 mL RNase H2 Enzyme Dilution Buffer		¥7,000	

- ・ プライマーの合成スケールは、100 nmole 合成スケールです。
- ・ 保証収量は、配列と精製グレードに応じて変わります。事前確認希望の場合、IDT に確認が必要です。
- ・ DNA、RNA 合わせて全体で 60 bases まで合成可能です。
- ・ 他の修飾の付加など、プライマーの形態が異なる場合は、rhPrimer (上記の価格表) ではなく、カスタム DNA 合成サービスでの対応となります。
- ・ GEN1 では 2-10 mU/10 μL、GEN2 では 5-200 mU/10 μL の酵素が必要となります。

使用方法

一般的な PCR の手順とほぼ変わりません。RNase H2 を加え rhPrimer を用いるだけです。

IDT ウェブサイトにプロトコールが掲載されています。

[IDT DNA] で検索 または IDT ウェブサイト (<http://sg.idtdna.com/>) より

products & services > Genotyping > Rnase H-Dependant PCR (<http://sg.idtdna.com/pages/products/genotyping/rnase-h2-dependent-pcr>) の support タブ

上記ウェブサイトには、各社マスターミックスとの条件も記載しております。

※本製品に含まれる RNase H2 は 好熱性古細菌である *P. abyssi* 由来のため、高温下でなければ活性を示しません。そのため、ホットスタートミックスを使う必要はありません。

ご注文方法

oligo@mbl.co.jp までメールにて下記の情報をお送りください。

- ・ お客様情報 (名前 (ふりがな)、メールアドレス、所属先、所属先住所 (ふりがな)、電話番号)
- ・ 代理店様情報 (代理店名、担当者名)
- ・ 納品方法 (直送もしくは代理店納品)
- ・ rhPrimer (配列、配列名)、Enzyme & Dilution Buffer (製品名、容量)

※ GEN1 と GEN2 で、x (C3 スペース) の記載方法が異なりますので、ご注意ください。アルファベットの前に "r" を付けることで、RNA を表します。

GEN1 例: GCGTCTCGTCTTACTGAAATCTrGAGTCG/3SpC3/

GEN2 例: GCGTCTCGTCTTACTGAAATCTrGA/iSpC3//iSpC3/CG

rhPrimer の 3' 末端の M (ミスマッチ) の推奨塩基について

M (ミスマッチ) には、下記の塩基を推奨しています。設計の参考にしてください。

テンプレート	Mismatch
G	→ G
A	→ C
T	→ C
C	→ C

■ 参考文献

- 1) Dobosy JR, et al. RNase H-dependent PCR (rhPCR): improved specificity and single nucleotide polymorphism detection using blocked cleavable primers. BMC Biotechnol. 11, 80 (2011) [Open Access]
- 2) Boucard AA, et al. Latrophilins function as heterophilic cell-adhesion molecules by binding to teneurins: regulation by alternative splicing. J Biol Chem. 289, 387-402 (2014)

DsiRNA 合成サービス

RNA干渉 (RNA Interference) とは

RNA干渉とは、短いRNAがターゲットとなるmRNAに作用し分解を促進することにより、そのmRNAの調節を行う機構です。

細胞中では、RNA干渉を引き起こす短い2本鎖RNA (総称して small interfering RNAs = siRNAs) は、RNase III class エンドヌクレースであるDicerによって長い2本鎖RNAが断片化されることで作られます。この機構を利用して、化学合成した短い2本鎖RNAを用いて細胞内で特定のmRNAに対してRNA干渉を引き起こし、その発現を人為的にノックダウンする方法が、広く一般的な分子生物学実験として行われています。

このDicerによる断片化プロセスで、siRNAはRISC (RNA Induced Silencing Complex) と結合します。RISCの中で、2本鎖のうちの1つである passenger strand と呼ばれるセンス鎖が、乖離してRISCから離れます。もう一方の guide strand と呼ばれるアンチセンス鎖は、RISCの中に留まり Ago2 タンパク質に取り込まれます。guide strand がその相補配列を含むターゲット mRNA に RISC を誘導し、相補鎖を形成すると、RISC 内の Ago2 タンパク質のヌクレアーゼ活性が mRNA を分解し、その結果、細胞中の mRNA の量が減り、ノックダウンが起こります。

27mer DsiRNA (Dicer-Substrate RNAi)

IDTは、City of Hope 研究所の Dr. John Rossi と一緒に、27mer と 25mer からなる 27mer DsiRNA を開発し、その合成品を提供しています。

この 27mer DsiRNA には、21mer siRNA と比較して 2 つの長所があります。それは RNA 干渉のプロセスにより高頻度に取り込まれること、及び 2 本鎖の RNA のうちターゲット mRNA に対してアンチセンスとして働く側の鎖を特定できること、の 2 つです。

27mer DsiRNA の場合、Dicer により 21mer の siRNA の形に切断され、その後 RISC にローディングされます。この Dicer の基質になり切断されるステップを経ることで、RISC に認識されやすくなります。一方で、通常使われる 21mer siRNA は直接 RISC に入るのですが、Dicer の基質となるステップを経ないために RISC に認識される頻度が減る、すなわち RISC に入る頻度が減ることが予想されます。

また、左右非対称な 27mer は、Dicer にその基質として認識される際に、3' 末端にオーバーハングがある鎖がアンチセンス鎖 (下側の鎖) であると認識し、3' 末端の 2 塩基が DNA になっている鎖がセンス鎖 (上側の鎖) と認識します。この形態の左右非対称性により、Dicer が基質として DsiRNA を取り込む際に、一律の方向で認識されます。誤ってセンス鎖がアンチセンス鎖として働いてしまうオフターゲットを防ぐことができます。

RISC に入った後は、27mer DsiRNA も通常の 21mer siRNA も同様の経路をたどりますが、その前のプロセスでの上記 2 つの利点から、27mer DsiRNA は、21mer siRNA と比較して、より高いノックダウン能をもつことが予想され、その報告もされています¹⁻³⁾。

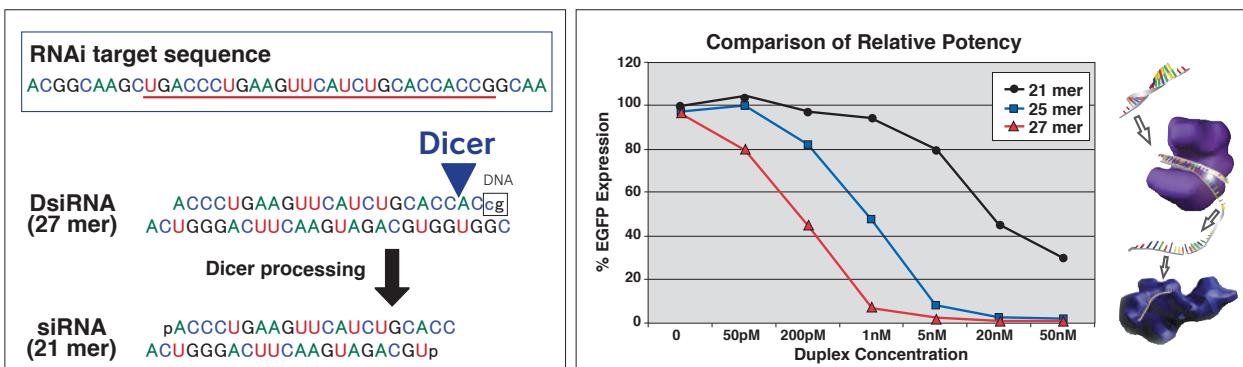
27mer DsiRNA の性能

上記の説明から 27mer DsiRNA は、高い効率と特異性でノックダウンが可能と考えられています。

特異性のチェックのためには siRNA の配列のチェックが必要です。IDT の 27mer DsiRNA は、推奨セットを購入した場合、納品時に配列情報を開示しますので特異性について検証することができます。

安定性という観点では、IDT の 27mer DsiRNA は通常の RNA および DNA です。特に高い安定性は期待できません。しかし IDT は、培養細胞での使用を想定している通常の 27mer DsiRNA では、特別な化学修飾は必要ないと考えています。ただし、培養細胞で検証実験を行った後、それを *In vivo* の系に移行させて使用したいという要望がある場合には、移行の前に 2-O-Met 塩基や 5'リン酸化などの修飾を施した DsiRNA を使用することを推奨しています。

細胞毒性という観点では、通常の RNA と DNA です。分子自体の毒性はありません。また 25mer と 27mer からなる短い 2 本鎖ですので、インターフェロン反応も起こさないと考えられています。



参考文献

27mer DsiRNA についての基礎論文

Dicer-Substrate siRNA (27mer DsiRNA) は、IDT と Beckman Research Institute of the City of Hope National Medical Center, Dr. John Rossi らとの共同研究成果です。27mer DsiRNA は、Dicer の基質として認識され切断されることで 21mer siRNA となり、21mer siRNA そのものを導入した場合と比べ、ノックダウン効率が高くなることが報告されています。

- 1) Amarzguioui M, *et al.* Rational design and in vitro and in vivo delivery of Dicer substrate siRNA. *Nat Protoc.* 1, 508-517 (2006)
- 2) Rose SD, *et al.* Functional polarity is introduced by Dicer processing of short substrate RNAs. *Nucleic Acids Res.* 33, 4140-4156 (2005)
- 3) Kim DH, *et al.* Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy. *Nat Biotechnol.* 23, 222-226 (2005)

TriFECTa™ DsiRNA Kit

プレデザイン の 27 mer DsiRNA 3種類セット+コントロール3本、ノックダウン保証付き

価格	内容	発注に必要な情報	納期
¥63,500	3種類の Screening DsiRNA duplexes (27 mer DsiRNA、2 nmole × 3種類) 導入効率確認用コントロール (TYE™ 563標識、1 nmole × 1本) ノックダウン確認用陽性コントロール (HPRT-S1 DS Positive Control、1 nmole × 1本) 陰性コントロール (NC1 Negative Control、1 nmole × 1本) 溶解用 RNase Free duplex buffer (100 mM KAc/30 mM HEPES pH7.5)	RefSeq データベース番号 (Accession No.)	5 ~ 10 営業日

2種類以上の27 mer DsiRNAでノックダウンが確認されなければ、無償で3種類の追加提供いたします。ノックダウンの確認方法はお問い合わせください。対象となる種は、ヒト、マウス、ラット、ニワトリ、チンパンジー、ウシ、イヌです。

27 mer DsiRNA 3種類の具体的な配列は、納品時にお知らせします。

Screening DsiRNA duplex (27mer DsiRNA)

納品量	価格		形態	修飾	精製	発注に必要な情報	納期
	チューブ納品	プレート納品 (24本以上発注)					
2 nmole	¥15,200	¥12,000	・ 2本鎖 RNA (24 ~ 30 mer) ・ アニーリング処理後に精製 ・ 空気乾燥品	センス鎖 5' リン酸化修飾 無し ※ <i>In vitro</i> 実験用	Affinity 精製 ※ 40 nmole 品 は脱塩グレード	Accession No. または具体的な 2本鎖配列	5 ~ 10 営業日
10 nmole	¥23,300	¥18,500					
40 nmole	¥36,200	設定なし					

Screening DsiRNA duplexは、センス鎖の5'末端がリン酸化修飾されておりません。IDTにて、*in vitro*実験の際にはセンス鎖5'末端のリン酸化修飾の有無はノックダウン効率に影響を与えないことを確認しております。

RNAi duplex oligos (21mer siRNA)

納品量	価格	形態	精製	発注に必要な情報	納期
2 nmole	¥28,100	・ 2本鎖 RNA (18 ~ 23 mer) ・ アニーリング処理後に精製 ・ 空気乾燥品	Affinity 精製 ※ 40 nmole 品は脱塩グレード	具体的な2本鎖配列	5 ~ 10 営業日
10 nmole	¥41,800				
40 nmole	¥63,500				

検証済みコントロール、溶解用バッファー

導入効率確認用コントロール

RNAi実験に成功するためには、トランスフェクション効率がとても重要です。効率を確認する際に用いる蛍光色素で修飾された陽性コントロールです。

製品名	納品量	価格
Cy®3 DS Transfection Control	1 nmole	¥15,100
	5 nmole	¥37,600
TYE™ 563 DS Transfection Control	1 nmole	¥12,500
	5 nmole	¥31,300
TEX™ 615 DS Transfection Control	1 nmole	¥12,500
	5 nmole	¥31,300

陰性コントロール

Human/mouse/rat の各ゲノムに存在しない検証済み陰性コントロールです。NC1が現在のIDT推奨の陰性コントロールです。

製品名	納品量	価格
NC1	1 nmole	¥9,600
	5 nmole	¥24,100
DS Scrambled Neg	1 nmole	¥9,600
	5 nmole	¥24,100

ノックダウン確認用陽性コントロール

HPRT (hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1)のmRNAを90%以上ノックダウンすることが既に証明されている陽性コントロールです。

製品名	納品量	価格
HPRT-S1 DS Positive Duplex Control (Human/Mouse/Rat/Chinese hamster)	1 nmole	¥9,600
	5 nmole	¥24,100

溶解用バッファー

製品名	容量	価格
溶解用 RNase Free duplex buffer (100 mM KAc/30 mM HEPES pH7.5)	2 mL x 10本 もしくは 300 mL	¥3,000
	1 L	¥4,800

注文方法

oligo@mbl.co.jpまでメールにて下記の情報をお送りください。

- ・お客様情報 (名前 (ふりがな)、メールアドレス、所属先、所属先住所 (ふりがな)、電話番号)
- ・代理店様情報 (代理店名、担当者名)
- ・納品方法 (直送もしくは代理店納品)
- ・発注に必要な情報 (製品名など)

