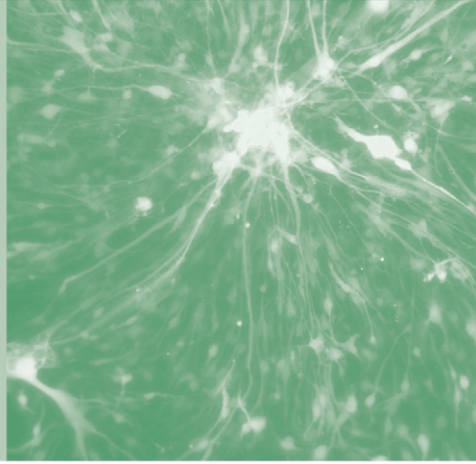


RNA 공학분야 연구에 최적의 제한효소와 marker 등장!



mRN A Interferase™-MazF

TaKaRa Code 2415A 1,000 U

14-30 ssRN A ladder marker

TaKaRa Code 3416 62.5 μl(25 lane)

서열 특이적으로 single strand RNA만을 절단하는 효소 mRNA interferase™-MazF

- Single strand RNA 내의 ACA 서열 5'쪽을 특이적으로 절단하는 endo-ribonuclease이다.
- Double strand RNA, double strand DNA 및 single strand DNA를 절단 하지 않는다.

mRNA Interferase™-MazF는 대장균의 독소(toxin), 항독소(antitoxin) module의 독소 단백질 MazF를 대장균 chaperone의 trigger factor와 융합시켜 발현시킨 효소이다. Single strand RNA 속의 ACA 서열만을 특이적으로 인식하여 절단하는 ribonuclease 활성을 가지고 있다². 특이한 특징을 갖고 있는 본 효소는 RNA interference에 의한 유전자 발현억제 연구분야 등의 RNA 공학분야에서 새롭게 응용될 것으로 보인다. 아래에 본 효소의 실험예와 반응성을 소개한다.

내용

mRNA Interferase™-MazF	1,000 U(20 U/ μl)
5× MazF buffer	1 ml
(200 mM sodium phosphate buffer pH7.5, 0.05 % Tween 20)	

실험예 : mRNA Interferase™-MazF에 의한 oligo RNA 절단 확인

30 base의 oligo RNA(ACA 서열 포함)를 mRNA Interferase™-MazF로 절단한 후, 전기영동으로 잘린 band를 검출하였다.

【방법】

(1) PCR tube에 아래의 반응액을 조제한 후, 37℃에서 10분간 반응시켰다.

Oligo RNA*(100 pmol / μl)	1.0 μl
mRNA Interferase™-MazF(20 U/ μl)	1.0 μl
5× MazF buffer	2.0 μl
DEPC 처리 DW	6.0 μl
Total	10.0 μl

* : Oligo RNA : 5'-UAAGAAGGAGAUUAUCAUAUGAAUCAAUUC-3'

(2) 반응 후, 시료와 동일한 양의 RNA loading buffer¹와 혼합액 1/5 양의 6×Dye¹을 첨가하여 변성 polyacrylamide gel² 전기영동을 하였다.

*1 : 14-30 ssRNA ladder marker(TaKaRa Code 3416) 에 첨부

*2 : 15 % acrylamide : bis-acrylamide(19 : 1), 7M Urea, 0.5 ×TBE

(3) SYBR® Green II nucleic acid gel stain으로 염색한 후, 형광 이미지 analyzer FMBIO®II로 확인하였다.

【결과】

ACA 서열을 포함하는 30 base의 oligo RNA는 mRNA Interferase™-MazF에 의해 ACA 서열의 5'측에서 분해되어 16 base와 14 base 밴드가 검출되었다.

mRNA Interferase™-MazF에 의한 절단 반응으로 얻은 14 base ssRNA oligo는 ssRNA ladder marker의 14 base 위치와 다른데, 이것은 각각의 oligo 염기 성분이 크게 다르고 잘려진 14 base ssRNA oligo가 2', 3'-cyclic phosphate 구조로 되어 있기 때문이다.

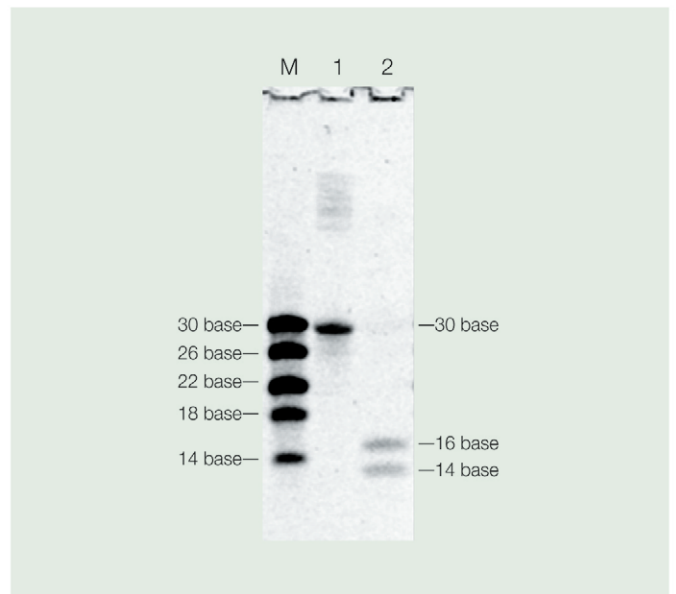


그림 1 mRNA Interferase™-MazF에 의한 oligo RNA의 절단반응

M : 14-30 ssRNA ladder marker(2.5 μl)

1 : 반응 전 ssRNA oligo(30 base)

2 : 반응 후 ssRNA oligo(16 base, 14 base)

mRNA Interferase™-MazF의 반응성에 대하여

1. 반응 pH

본 효소는 pH7.5 부터 8.5에서 높은 반응성을 나타내었다.
Buffer 의 이온 종류는 특별히 영향받지 않았다.

2. 반응 온도

15~40 ℃에서 높은 반응성을 나타내었다.

3. 반응에 영향을 미치는 첨가물

NaCl과 같은 염류는 본 효소의 반응을 억제하고, 특히 MgCl₂는 5 mM으로 도 크게 억제되었다. DTT의 영향은 받지 않았다.

4. 이외의 주의사항

- ① 본 효소는 single strand RNA 내의 ACA 서열을 특이적으로 절단하는 효소이지만, 주변 서열에 따라서는 AC 서열도 절단하는 경우가 있는 것으로 보고되고 있다.
- ② 본 효소는 double strand RNA를 절단하지 않기 때문에, RNA의 고차원적인 구조 영향에 의해 single strand RNA 중에서도 모든 ACA 서열을 절단할 수 없는 경우도 있다.
- ③ 본 효소에 의해 절단된 말단은 2', 3'-cyclicphosphate 및 5'-OH가 되기 때문에, 그대로 RNA ligase로 ligation 할 수 없다.

[참고문헌]

- 1) Zhang, Y. et al.(2005) *J. Biol. Chem.*, 280, 3143-3150.
- 2) Zhang, Y. et al.(2003) *Molecular cell.*, 12, 913-923.
- 3) Munoz-Gomez, A. J. et al.(2004) *FEBS letters*, 567, 316-320

ssRNA MW standard marker

14-30 ssRNA ladder marker

14 ~30 base의 single strand RNA fragment로 구성되는 변성 polyacrylamide gel 전기영동용 RNA marker 이다.
miRNA 를 비롯한 작은 분자 RNA 크기를 확인하는데 적합하다.
변성 polyacrylamide gel 전기영동용 loading buffer 가 첨부되어 있기 때문에, 시료 조제가 쉽다.

내용

14-30 ssRNA ladder marker	62.5 μl(25 lane 분)
RNA loading buffer	1 ml
6× Dye(Orange G를 포함)	1 ml

* Marker에 동일한 양의 loading buffer와 혼합액의 1/5 양의 6×Dye를 첨가한 후 사용해야 한다.

실험예 : 배양세포의 small RNA 검출

배양세포 유래 total RNA 5 μl(25 μg)와 동일한 양의 RNA loading buffer 및 2 μl의 6×Dye를 첨가하고 15% acrylamide : bis-acrylamide(19 : 1) / 7 M Urea / 0.5×TBE gel로 전기영동하여 SYBR® Green II nucleic acid gel stain으로 염색한 후, FMBIO® II로 확인하였다. 18 base부터 26 base의 small RNA 위치를 확인할 수 있었다.

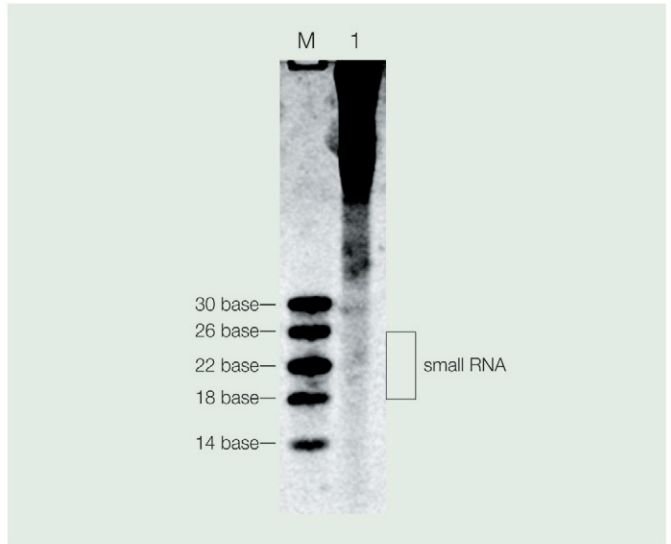


그림 2 배양세포 유래의 small RNA 검출
M : 14-30 ssRNA ladder marker(2.5 μl)
1 : total RNA(25 μg)

관련 제품

- RNA preparation water (1L) 90#
 - SYBR® Green II nucleic acid gel stain (500 μl/2/50 μl×10) 50522/50523
- 본 제품은 Cambrex사 제품입니다.

mRNA Interferase™-MazF 구입시에는 라이선스 동의서가 필요합니다(자세한 내용은 다카라코리아 홈페이지(http://eshop.takara.co.kr)를 참조하기 바랍니다).