

## Edit-R 化学合成ガイドRNA再溶解プロトコル (チューブ用)

化学合成したDharmacon Edit-R crRNA/sgRNA/tracrRNAの再溶解用プロトコルです。

1. RNAを含むチューブを短時間遠心し、RNAペレットを底に集めます。
2. 表1に示した推奨容量の滅菌済みRNaseフリーの10 mM Tris-HCl Buffer pH 7.4を用いてRNAを再溶解しストック溶液を調製します。
3. ピペットを用いて溶液をチップに3~5回出し入れします。泡立えないように注意してください。チューブの蓋をしっかりと閉めます。
4. オービタルシェーカー（ミキサー）を使用して、溶液を室温で30分間混合します。  
※この混合により、より確実にRNAを再溶解することができます。
5. RNAを含むチューブを短時間遠心し、チューブの底に溶液が集まるようにします。
6. 紫外分光光度計でRNAの濃度を測定します（260 nmにおける吸光度を測定）。  
※濃度計算に際しては2ページの“よくある質問 (FAQ)”を参照ください。
7. RNA溶液を小分けし、 $-20^{\circ}\text{C}$ あるいは $-80^{\circ}\text{C}$ にて保存します。最良のパフォーマンスを得るために、小分けしたチューブの凍結融解の回数は5回までにとどめてください。

### 技術的な考慮事項

- crRNA/sgRNA/tracrRNAを効率的に細胞に導入するために、トランスフェクション試薬やエレクトロポレーションを提供するメーカーの取扱説明書の方法にしたがい、お使いの細胞株に適した導入条件を検討することをおすすめします。
- 細胞集団における塩基挿入および削除の検出に最も一般的に使用される方法は、T7エンドヌクレアーゼI (T7EI, NEB) などのミスマッチ検出アッセイです。編集された細胞からクローンが分離された場合、遺伝子編集を確認するために最も一般的に使用される方法は、サンガーシーケンスです。
- DharmaFECTトランスフェクション試薬またはエレクトロポレーションを使用するプロトコルについては、<https://horizondiscovery.com/> において確認いただけます。

表1. crRNA/sgRNA/tracrRNAの再溶解用バッファー容量とストック溶液濃度

crRNA/sgRNA/ tracrRNA量 (nmol)	目的の終濃度とするために加える再溶解バッファー (10 mM Tris-HCl Buffer pH 7.4) の液量 ( $\mu\text{l}$ )	
	100 $\mu\text{M}$ ストック溶液†	20 $\mu\text{M}$ ストック溶液
2.0	20	100
5.0	50	250
10	100	500
20	200	1,000
50	500	
100	1,000	チューブ容量超過*

\* チューブ容量が超過する場合は、100  $\mu\text{M}$  ストック溶液を調製後、10倍に希釈して10  $\mu\text{M}$  ストック溶液として下さい。

† 96ウェルフォーマットのエレクトロポレーションには、高濃度の200  $\mu\text{M}$  ストック溶液の使用をおすすめします。

### 関連製品

滅菌済みRNaseフリーの10mM Tris-HCl Buffer pH 7.4 (Cat.No. B-006000-100) は、<https://horizondiscovery.com/> で購入できます。

## よくある質問 (FAQ)

質問	回答
再溶解したcrRNAあるいはtracrRNAはどのように定量したらよいのでしょうか？	RNAを滅菌RNaseフリー水に再溶解し、デュアルビーム分光光度計を用いて260 nmにおける吸光度 ( $A_{260}$ ) を測定することにより、最も正確にRNAを定量することができます。
crRNAあるいはtracrRNA溶液の濃度はどのように計算したらよいのでしょうか？	Lambert-Beerの法則：吸光度 (260 nm) = $\epsilon \times \text{モル濃度 (M)} \times \text{光路長 (cm)}$ より、RNA溶液の濃度は次のように求められます。 モル濃度 (M) = 吸光度 (260 nm) / ( $\epsilon \times \text{光路長 (cm)}$ ) ( $\epsilon$ : crRNAのモル吸光係数は製品添付のProduct Data Sheetに記載があります。tracrRNAのモル吸光係数は757,400L/mol-cmです)
再溶解したガイドRNA量の計算値と、製品仕様書に記載の値が異なるのはなぜでしょうか？	<ul style="list-style-type: none"><li>RNAを定量する装置により測定値が異なることがあります。デュアルビーム紫外可視分光光度計の使用をおすすめします。</li><li>RNA溶液の濃度が高すぎる可能性があります。吸光度は0.15から0.6の間で、標準曲線が直線的な領域にある値が正確です。</li><li>RNA溶液の濃度が低すぎる可能性があります。小容量 (1~1.5 <math>\mu\text{l}</math>) の溶液を希釈して定量する場合、ばらつきが大きくなりやすくなります。</li><li>RNAが十分に再溶解されていない可能性があります。オービタルシェーカー (ミキサー) を使用して、RNA溶液を室温でさらに15~30分間混合してください。</li></ul>
届いた凍結乾燥状態のcrRNAあるいはtracrRNAサンプルを室温にて1週間置いておきました。RNAはまだ使えますか？	はい、使えます。crRNA/sgRNA/tracrRNAは乾燥ペレットとして出荷され、室温にて2~4週間安定です (室温輸送/冷凍保存)。お受け取りになりましたら、RNAは $-20^{\circ}\text{C}$ 、あるいは $-70^{\circ}\text{C}$ から $-80^{\circ}\text{C}$ にて保存してください。
crRNA/sgRNA/tracrRNAの平均分子量は？	<ul style="list-style-type: none"><li>crRNAの平均分子量は13,500 g/molです。</li><li>sgRNAの平均分子量は32,327 g/molです。</li><li>tracrRNAの分子量は23,759 g/molです。</li></ul>
crRNA/sgRNA/tracrRNAの量をnmol単位から $\mu\text{g}$ 単位に、あるいはその逆に変換するにはどうしたらよいのでしょうか？	製品に添付のProduct Data Sheetに記載の分子量を使用して変換してください。分子量が分からない場合には、平均分子量を使用することができます。例えば、5 nmolのcrRNAについては、以下のような変換になります。 $(5 \text{ nmol})(13,500 \text{ g/mol}) (\text{mol}/10^9 \text{ nmol})(10^6 \mu\text{g/g}) = 67.5 \mu\text{g}$
crRNA/sgRNA/tracrRNAをRNaseフリー水あるいは1 x siRNA Bufferに再溶解することはできますか？	crRNA/sgRNA/tracrRNAは、RNaseフリー水あるいは1X siRNA Bufferではなく、pHを7.4に調整したヌクレアーゼフリーのTris bufferに再溶解することをおすすめします。それにより、凍結融解を繰り返した際にRNAをより安定に保つことができます。

For more information

ホライゾン・ディスカバリー株式会社  
[horizondiscovery.com/contact-us](https://horizondiscovery.com/contact-us)

©2022 Horizon Discovery Group Ltd and its affiliated companies. All rights reserved.

PerkinElmer is a trademark of PerkinElmer, Inc., registered in the United States and other countries. Horizon Discovery is a trademark mark of Horizon Discovery Ltd. Dharmacon is a trademark of Dharmacon, Inc.. All PerkinElmer, Inc., Horizon Discovery Ltd and Dharmacon, Inc. trademarks are used with permission. Other product names and brand names may be trademarks or registered trademarks of their respective owners.

本文書は英語版プロトコルを元にした日本語版です。内容は英語版プロトコルの最新バージョンとは異なることがあります。

B028-2005-v3

**horizon**  
a PerkinElmer company