

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2006-189359
(P2006-189359A)

(43) 公開日 平成18年7月20日(2006.7.20)

(51) Int. Cl.

GO 1 N 27/447 (2006.01)

F I

GO 1 N 27/26 3 1 5 H
GO 1 N 27/26 3 1 5 Z

テーマコード (参考)

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 9 頁)

(21) 出願番号 特願2005-2336 (P2005-2336)
(22) 出願日 平成17年1月7日(2005.1.7)

(71) 出願人 504229284
国立大学法人弘前大学
青森県弘前市文京町1番地
(74) 代理人 100087745
弁理士 清水 善廣
(74) 代理人 100098545
弁理士 阿部 伸一
(74) 代理人 100106611
弁理士 辻田 幸史
(72) 発明者 牛田 千里
青森県弘前市文京町1番地 国立大学法人
弘前大学 農学生命科学部内

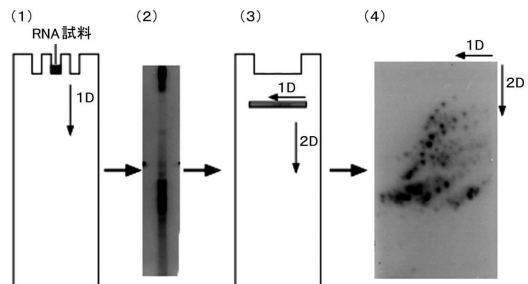
(54) 【発明の名称】 低分子RNAの分析方法

(57) 【要約】

【課題】 50nt以下の低分子RNAを簡便に再現性よく分離することができる二次元電気泳動法を用いた、その分析方法を提供すること。

【解決手段】 アクリルアミド濃度が12.5%~13.5%のスラブ状ポリアクリルアミドゲルを用いて試料の一次元目の電気泳動を行った後、泳動レーン中の前記低分子RNAを含む領域のゲルをストリップ状に切り出す際、ゲル板全体を疎水性透明フィルムで密着包囲し、切り出すゲルの部分の形状と略同一形状であって、少なくとも一方の面に疎水性面を有する薄板状部材のいずれかの面を、切り出すゲルの部分の表面に位置する疎水性透明フィルムに当接させ、ゲルを疎水性透明フィルムとともに薄板状部材の周縁部に沿って切り込み、次に、薄板状部材を、切り込んだゲルの底面にその疎水性面が当接するようにゲルの下に潜り込ませ、薄板状部材を支持体にしてゲルを取り出し、このようにして切り出したゲルを二次元目の電気泳動を行うためのゲルと重合させた後、電気泳動を行うことを特徴とする。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】**【請求項1】**

二次元電気泳動法を用いた50ヌクレオチド以下の低分子RNAの分析方法であって、アクリルアミド濃度が12.5%~13.5%のスラブ状ポリアクリルアミドゲルを用いて試料の一次元目の電気泳動を行った後、泳動レーン中の前記低分子RNAを含む領域のゲルをストリップ状に切り出す際、ゲル板全体を疎水性透明フィルムで密着包囲し、切り出すゲルの部分の形状と略同一形状であって、少なくとも一方の面に疎水性面を有する薄板状部材のいずれかの面を、切り出すゲルの部分の表面に位置する疎水性透明フィルムに当接させ、ゲルを疎水性透明フィルムとともに薄板状部材の周縁部に沿って切り込み、次に、薄板状部材を、切り込んだゲルの底面にその疎水性面が当接するようにゲルの下に潜り込ませ、薄板状部材を支持体にしてゲルを取り出し、このようにして切り出したゲルを二次元目の電気泳動を行うためのゲルと重合させた後、電気泳動を行うことを特徴とする分析方法。

10

【請求項2】

薄板状部材の疎水性面を疎水性透明フィルムに当接させ、ゲルを疎水性透明フィルムとともに薄板状部材の周縁部に沿って切り込むことを特徴とする請求項1記載の分析方法。

【請求項3】

少なくとも2種類の特定の条件下にある個体または細胞を用いて調製した試料の泳動パターンを比較することで、前記低分子RNAの発現特性を比較分析することを特徴とする請求項1または2記載の分析方法。

【請求項4】

請求項1乃至3のいずれかに記載の分析方法を行うためのキットであって、一次元目の電気泳動を行うためのゲル板とゲル形成用試薬、二次元目の電気泳動を行うためのゲル板とゲル形成用試薬、一次元目の電気泳動を行う際にゲルに試料注入溝を形成するための櫛、疎水性透明フィルム、少なくとも一方の面に疎水性面を有する薄板状部材を少なくともも含んでなることを特徴とするキット。

20

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、二次元電気泳動法を用いた低分子RNAの分析方法に関する。

【背景技術】**【0002】**

近年、RNA干渉(RNA interference, RNAi)の発見と、その作用機構に22~26ヌクレオチド(nt)の低分子RNAが深く関与していることが明らかにされたことをきっかけに、数多くの低分子RNAあるいは非翻訳RNA(non coding RNA, ncRNA)が細胞に存在すること、低分子RNAの機能は非常に多岐にわたることが解明されつつある。生命の全体像を把握するためには、ゲノムDNAや蛋白質と同様に、細胞に存在する低分子RNAについても理解を深めることが必要であるところ、このような状況下において、低分子RNAの研究を精力的に進めていくためには、低分子RNAを優れた再現性のもとに分離して分析することができる方法が不可欠となる。従って、研究の現場では、このような方法が待ち望まれている。低分子RNAの分析方法としては、いくつかの方法が考えられるが、その1つに二次元電気泳動法を用いた方法がある。この方法については既に非特許文献1において提案がされている。しかしながら、非特許文献1においては、人工的に合成したいくつかの20数ヌクレオチドの低分子RNAの混合物が、二次元電気泳動法により分離されることを確認しているに過ぎず、天然に存在する低分子RNAの混合物を実際に分離して分析するまでには至っていない。また、非特許文献1においては、二次元電気泳動法を行うための具体的な手法の詳細については明らかにされていない。二次元電気泳動法を用いたRNAの分析方法としては、非特許文献1において提案されている方法以外にも、例えば、非特許文献2において提案されている方法がある。しかしながら、非特許文献2において提案されている方法は、低分子RNAの分析に適用した場合、個々のRNA同士の分離が悪く、また、分離の再現性を確保するためには、熟練した技術が必要であり、誰もが簡便に行うことができるものではない。

30

40

50

【非特許文献1】Two dimensional fractionation of complex mixture of oligonucleotides in microRNA size range: Hideaki Shiraishi, 2004 Oxford University Press, Nucleic Acids Symposium Series No.48, 293 294

【非特許文献2】Purification of RNA Molecules by Gel techniques: Toshimichi Ikemura, Methods In Enzymology, Vol.180, pp14 25(1989)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

そこで本発明は、50nt以下の低分子RNAを簡便に再現性よく分離することができる二次元電気泳動法を用いた、その分析方法を提供することを目的とする。

10

【課題を解決するための手段】

【0004】

本発明者は、上記の点に鑑みて鋭意研究を重ねた結果、二次元電気泳動法を用いて50nt以下の低分子RNAの分析を行う際、一次元目の電気泳動を行うために用いるゲルを特定し、かつ、一次元目の電気泳動を行った後に行う、泳動レーン中の前記低分子RNAを含む領域のゲルの切り出し方法を特定することで、二次元目のゲル上で前記低分子RNAを簡便に再現性よく分離することができることを見出した。

【0005】

上記の知見に基づいてなされた本発明の二次元電気泳動法を用いた50nt以下の低分子RNAの分析方法は、請求項1記載の通り、アクリルアミド濃度が12.5%~13.5%のスラブ状ポリアクリルアミドゲルを用いて試料の一次元目の電気泳動を行った後、泳動レーン中の前記低分子RNAを含む領域のゲルをストリップ状に切り出す際、ゲル板全体を疎水性透明フィルムで密着包囲し、切り出すゲルの部分の形状と略同一形状であって、少なくとも一方の面に疎水性面を有する薄板状部材のいずれかの面を、切り出すゲルの部分の表面に位置する疎水性透明フィルムに当接させ、ゲルを疎水性透明フィルムとともに薄板状部材の周縁部に沿って切り込み、次に、薄板状部材を、切り込んだゲルの底面にその疎水性面が当接するようにゲルの下に潜り込ませ、薄板状部材を支持体にしてゲルを取り出し、このようにして切り出したゲルを二次元目の電気泳動を行うためのゲルと重合させた後、電気泳動を行うことを特徴とする。

20

また、請求項2記載の分析方法は、請求項1記載の分析手法において、薄板状部材の疎水性面を疎水性透明フィルムに当接させ、ゲルを疎水性透明フィルムとともに薄板状部材の周縁部に沿って切り込むことを特徴とする。

30

また、請求項3記載の分析手法は、請求項1または2記載の分析手法において、少なくとも2種類の特定の条件下にある個体または細胞を用いて調製した試料の泳動パターンを比較することで、前記低分子RNAの発現特性を比較分析することを特徴とする。

また、本発明の請求項1乃至3のいずれかに記載の分析手法を行うためのキットは、請求項4記載の通り、一次元目の電気泳動を行うためのゲル板とゲル形成用試薬、二次元目の電気泳動を行うためのゲル板とゲル形成用試薬、一次元目の電気泳動を行う際にゲルに試料注入溝を形成するための櫛、疎水性透明フィルム、少なくとも一方の面に疎水性面を有する薄板状部材を少なくとも含んでなることを特徴とする。

40

【発明の効果】

【0006】

本発明によれば、50nt以下の低分子RNAを簡便に再現性よく分離することができる二次元電気泳動法を用いた、その分析方法が提供される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0007】

本発明の二次元電気泳動法を用いた50nt以下の低分子RNAの分析手法は、アクリルアミド濃度が12.5%~13.5%のスラブ状ポリアクリルアミドゲルを用いて試料の一次元目の電気泳動を行った後、泳動レーン中の前記低分子RNAを含む領域のゲルをストリップ状に切り出す際、ゲル板全体を疎水性透明フィルムで密着包囲し、切り出すゲルの部分の形状と略

50

同一形状であって、少なくとも一方の面に疎水性面を有する薄板状部材のいずれかの面を、切り出すゲルの部分の表面に位置する疎水性透明フィルムに当接させ、ゲルを疎水性透明フィルムとともに薄板状部材の周縁部に沿って切り込み、次に、薄板状部材を、切り込んだゲルの底面にその疎水性面が当接するようにゲルの下に潜り込ませ、薄板状部材を支持体にしてゲルを取り出し、このようにして切り出したゲルを二次元目の電気泳動を行うためのゲルと重合させた後、電気泳動を行うことを特徴とする。

【 0 0 0 8 】

本発明では、試料の二次元目の電気泳動を行うために用いるゲルをアクリルアミド濃度が12.5%~13.5%のスラブ状ポリアクリルアミドゲルと特定する。ゲルの種類をポリアクリルアミドゲルと特定するのは、分析対象の50nt以下の低分子RNAの混合物に対する分離能に優れるからである。アクリルアミド濃度を12.5%~13.5%と特定するのは、濃度が12.5%を下回ると、それは50ntよりも大きいRNAの混合物に対する分離能を向上させるような条件になってしまい、反対に50nt以下の低分子RNAの混合物に対する分離能が低下するからである。一方、濃度が13.5%を上回ると、後述するような条件で二次元目の電気泳動を行う場合、二次元目の電気泳動に用いるゲルのアクリルアミド濃度との差が縮まってしまうことで、二次元目の電気泳動を行った後に得られるRNAスポットの分離能が悪くなり、個々のスポットの把握が困難になるからである。

【 0 0 0 9 】

本発明では、試料の二次元目の電気泳動を行った後、泳動レーン中の前記低分子RNAを含む領域のゲルをストリップ状に切り出す際、ゲル板全体を疎水性透明フィルムで密着包囲し、切り出すゲルの部分の形状と略同一形状であって、少なくとも一方の面に疎水性面を有する薄板状部材のいずれかの面を、切り出すゲルの部分の表面に位置する疎水性透明フィルムに当接させ、ゲルを疎水性透明フィルムとともに薄板状部材の周縁部に沿って切り込み、次に、薄板状部材を、切り込んだゲルの底面にその疎水性面が当接するようにゲルの下に潜り込ませ、薄板状部材を支持体にしてゲルを取り出す。ゲルをストリップ状に切り出す際、その切り出し長さは二次元目の電気泳動に用いるゲルの横幅より短くするのが好ましく、切り出し幅は泳動レーンの幅より狭くするのが好ましいが、ゲルの切り出しを上記のようにして行うことで、例えば、切り出し長さが10~20cmで切り出し幅が0.3~0.7cmといったような極細のストリップ状のゲルを切り出す場合でも、簡便に精度よく切り出すことが可能となる。

【 0 0 1 0 】

ゲル板全体を密着包囲するために用いる疎水性透明フィルムとしては、例えば、ポリ塩化ビニリデン製の食品包装用透明ラップフィルムが挙げられる。仮に、疎水性透明フィルムに代わりにセロハンのような親水性透明フィルムを用いた場合、当該フィルムがゲルの表面に残存する電気泳動用バッファ由来の水分を含んで軟化膨張したりしてゲル板全体を密着包囲することが困難となり、その結果、ゲルの切り出しを精度よく行えないといった問題を招来する。

【 0 0 1 1 】

少なくとも一方の面に疎水性面を有する薄板状部材は、後に行う、切り込んだゲルを取り出す際に必要となる疎水性面を有するものであればどのようなものであってもよいが、ゲル板全体を密着包囲するために用いる疎水性透明フィルムに当接させる薄板状部材の面は、疎水性透明フィルムと親和性を有することが好ましい(疎水性透明フィルムとしてポリ塩化ビニリデン製の食品包装用透明ラップフィルムを用いる場合、薄板状部材の疎水性面は、疎水性透明フィルムと親和性を有する)。ゲルを疎水性透明フィルムとともに薄板状部材の周縁部に沿って切り込む際、疎水性透明フィルムと薄板状部材の間での滑りが抑えられ、直線状の切口を有するゲルを簡便に精度よく切り出すことが可能となるからである。また、薄板状部材を、切り込んだゲルの底面にその疎水性面が当接するようにゲルの下に潜り込ませ、薄板状部材を支持体にしてゲルを取り出すことで、薄板状部材を支持体にして、切り込んだゲルを崩すことなく容易に移動させることができる。仮に、薄板状部材が親水性面を有し、この親水性面を利用して同様の操作を行ってゲルを取り出そうとし

た場合、ゲル表面に存在する水分が邪魔をして、薄板状部材を切り込んだゲルの下に正確に潜り込ませることが困難になることで、ゲルを二次元目の電気泳動に用いるゲル板にセットすることが困難となるといった問題を招来する。

【 0 0 1 2 】

二次元目の電気泳動を行うために用いるゲルは、例えば、アクリルアミド濃度が21.0%~23.0%で尿素濃度が6.0M~8.0Mのスラブ状ポリアクリルアミドゲルが好ましい。ゲルの種類をポリアクリルアミドゲルとすることが好ましいのは、分析対象の50nt以下の低分子RNAの混合物に対する分離能に優れるからである。アクリルアミド濃度を21.0%~23.0%とすることが好ましいのは、濃度が21.0%を下回ると、一次元目の電気泳動に用いるゲルのアクリルアミド濃度との差が縮まってしまうことで、二次元目の電気泳動を行った後に得られるRNAスポットの分離能が悪くなり、個々のスポットの把握が困難になるからである。一方、濃度が23.0%を上回ると、50nt付近のRNAの分離能が悪くなったり、ゲルが壊れやすくなることで、その取り扱いが困難になったりするからである。尿素濃度を6.0M~8.0Mとすることが好ましいのは、低分子RNAの二次構造の違いによる二次元目の電気泳動への影響をなくすることができるからである。一次元目の電気泳動に用いるゲルに尿素を添加せず、二次元目の電気泳動に用いるゲルに濃度が6.0M~8.0Mの尿素を添加することで、同じ大きさの異なる低分子RNAを二次構造の違いにより分離することができる。

10

【 0 0 1 3 】

なお、50nt以下の低分子RNAを含む試料やゲルの調製方法、電気泳動の操作方法は自体公知の方法で行えばよい(必要であれば " Polyacrylamide Gel Electrophoresis " in Molecular Cloning, a laboratory manual, second edition: J. Sambrook, E. F. Fitch and T. Maniatis (1989) , pp. 6.36 6.48, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.を参照のこと)。

20

【 0 0 1 4 】

本発明によれば、二次元目のゲル上で、50nt以下(おおよそ15nt~50nt)の低分子RNAを簡便に再現性よく分離することができる。従って、少なくともいくつかの50nt以下の低分子RNAについては、それらをゲル上の各スポットとして高い精製度の下に取得することができることから、その配列決定を容易にし、よって、新規な50nt以下の低分子RNAの効率的な探索が可能となる。また、少なくとも2種類の特定の条件下にある個体または細胞を用いて調製した試料の二次元電気泳動を行い、その泳動パターンを比較することで、低分子RNAの発現特性を比較分析することができることから、多細胞生物における老化、行動、神経発生、胚発生などの高次生命現象にどのような低分子RNAがどのように関わっているのかについての解明が容易となる。

30

【 0 0 1 5 】

本発明の二次元電気泳動法を用いた50nt以下の低分子RNAの分析方法は、一次元目の電気泳動を行うためのゲル板とゲル形成用試薬、二次元目の電気泳動を行うためのゲル板とゲル形成用試薬、一次元目の電気泳動を行う際にゲルに試料注入溝を形成するための櫛、疎水性透明フィルム、少なくとも一方の面に疎水性面を有する薄板状部材を少なくとも含んでなるキットを用いることで、誰もが簡便に再現性よく行うことができる。ここで、一次元目の電気泳動を行うためのゲル板と、二次元目の電気泳動を行うためのゲル板は、例えば、縦50cm×横20cm程度のガラス製または樹脂製である。一次元目の電気泳動を行うためのゲル形成用試薬としては、例えば、下記の成分を混合して滅菌水で総量213mlに調製したアクリルアミド溶液が挙げられる。

40

【 0 0 1 6 】

アクリルアミド	26.6g
N,N' メチレンビスアクリルアミド	1.4g
トリス塩基	0.65g
ホウ酸	0.33g
0.5M EDTA (pH8.0)	0.24ml
過硫酸アンモニウム	0.2g

50

N,N,N',N' テトラメチルエチレンジアミン (TEMED) 230ml

【0017】

また、二次元目の電気泳動を行うためのゲル形成用試薬としては、例えば、下記の成分を混合して滅菌水で総量240mlに調製したアクリルアミド溶液が挙げられる。

【0018】

アクリルアミド	50.2g	
N,N' メチレンビスアクリルアミド	2.6g	
尿素	100g	
トリス塩基	0.78g	
ホウ酸	0.40g	10
0.5M EDTA (pH8.0)	0.29ml	
過硫酸アンモニウム	0.1g	
N,N,N',N' テトラメチルエチレンジアミン (TEMED)	230ml	

【0019】

一次元目の電気泳動を行う際にゲルに試料注入溝を形成するための櫛としては、例えば、一方に縦1cm×横1cmの歯を0.2cm間隔で10本もち、他方には歯をもたない、厚さ0.2cmのテフロン（登録商標）製の板が挙げられる。疎水性透明フィルムとしては、例えば、ポリ塩化ビニリデン製の食品包装用透明ラップフィルムが挙げられる。少なくとも一方の面に疎水性面を有する薄板状部材としては、例えば、両面が疎水性である（両面が疎水処理された）プラスチック板や、後述する実施例で用いた、一方の面が疎水性面で他方の面が親水性面であるPharmacia Biotech社製の商品名：Gel Bond PAG filmが挙げられる。

10

20

【実施例】

【0020】

以下、本発明を線虫 (*C. elegans*) を用いた実施例によって詳細に説明するが、本発明は、以下の記載に何ら限定して解釈されるものではない。

【0021】

実験1:

(泳動用RNA試料の準備)

線虫10gをTRIzol試薬 (Invitrogen社製) 10mlで処理し、粗RNA抽出物0.5mgを得た。これをステップワイズの2プロパノール沈殿法により分画し、100nt以下のRNAを含む画分5 μ gを得た。RNAの3'末端を放射性同位体で標識するために、このRNA画分2.5 μ gに、6.5 μ lの³²P pCp (111TBq/mmol)、20unitのT4 RNA ligase (宝酒造社製)、終濃度50mMのTris HCl (pH7.5)、10mMのMgCl₂、10mMのDTT、1mMのATPを加え、滅菌水で15 μ lにあわせて、4で16時間~20時間反応させた。このようにして3'末端を標識したRNA画分15 μ lに、電気泳動用グリセロールバッファー (50%グリセロールと0.25%プロモフェノールブルーと0.25%キシレンシアノール含有) を5 μ l、滅菌水を5 μ l加えて泳動用RNA試料とした。

30

【0022】

(二次元電気泳動)

一次元目の電気泳動を行うために、以下のようにしてアクリルアミド濃度が13.1%のスラブ状ポリアクリルアミドゲルを作製した。即ち、40%アクリルアミド溶液 (アクリルアミド380gとN,N' メチレンビスアクリルアミド20gを水に溶かして1000mlにした溶液) 70ml、10×TBE (トリス塩基108g、ホウ酸55g、0.5M EDTA 40ml、pH8.0) 6ml、水135mlを300mlピーカーに加えて泡立てない程度にスターラーで混ぜ、ここにTEMED230 μ lと10%過硫酸アンモニウム2mlを加えて素早く混ぜた後、得られた溶液をセットアップしたガラス製ゲル板 (縦47.5cm×横19.5cm×隙間0.2cm) に流し込んだ。アクリルアミドの重合反応が終了してゲルが固まった後、ゲル板を泳動装置にセットして、1000V (定電圧)、1時間の予備通電を行った。泳動バッファーには0.3×TBEを用い、ゲル板には放熱板を付けて泳動を行った。予備通電終了後、泳動用RNA試料をゲルの試料注入溝 (幅1cm×深さ1cm×厚さ0.2cm) に入れ、10mA定電流で、試料に含まれるプロモフェノールブルーがゲルから流れ出す寸前まで室温で約17時間泳動を行った (図1(1)参照: 図中、1Dは一次元目の電気泳動方向を

40

50

示す。以下同じ)。

【0023】

一次元目の電気泳動が終わった後、ゲル板を泳動装置から外し、ゲル板全体を、疎水性透明フィルムであるポリ塩化ビニリデン製の食品包装用透明ラップフィルムで密着包囲した。蛍光テープの目印をラップフィルム上に付けてから、オートラジオグラフィーを行った(富士写真フィルム社の商品名: FUJI X ray film RAを使用)。感光はインテンシファイニング・スクリーンを用いて80で16時間~24時間行った。ラップフィルム上の蛍光テープの目印と、感光したオートラジオグラムに印された蛍光テープ位置をあわせ、感光検出された50nt以下の低分子RNAを含む領域のゲルの部分(泳動レーンの幅は1cm)の表面に位置するラップフィルムに、薄板状部材として、縦15.5cm×横0.5cmに切断した、一方の面が疎水性面で他方の面が親水性面であるPharmacia Biotech社製の商品名: Gel Bond PAG filmの疎水性面を当接させ、カッターナイフを用いてゲルをラップフィルムとともに薄板状部材の周縁部に沿って切り込んだ。次に、薄板状部材を、切り込んだゲルの底面にその疎水性面が当接するようにゲルの下に潜り込ませ、薄板状部材を支持体にしてゲルを取り出した(図1(2)参照)。なお、ゲルの切り出し幅を泳動レーンの幅より狭くしたのは、後に行う、二次元目の電気泳動を始めてすぐに、ストリップ状に切り出した一次元目のゲル中に存在する50nt以下の低分子RNAを、二次元目のゲルに移動させることで、最終的に二次元目のゲル上で前記低分子RNAを再現性よく分離させるためであった。

10

【0024】

一次元目の電気泳動が終了する2時間前に、二次元目の電気泳動の準備を行った。なぜなら、ゲルは乾燥して壊れやすいものであるため、一次元目のゲルを切り出した後は、すぐにこれを二次元目の電気泳動を行うためのゲルと重合させることができる態勢にしておくことが好ましいからであった。二次元目の電気泳動を行うためのゲルとして、アクリルアミド濃度が22.0%で尿素濃度が7.0Mのスラブ状ポリアクリルアミドゲルを用いることにした。このゲルは、40%アクリルアミド溶液132ml、10×TBE 7.2ml、水7ml、尿素100gの組成で調製した。各成分を300mlビーカーに入れ、約1時間かけて尿素を完全に溶解させた。尿素が完全に溶解した後、得られた溶液を濾過してから脱気し、300mlビーカーに注いで泡立でない程度にスターラーで混ぜ、ここにN,N,N',N' テトラメチルエチレンジアミン(TEMED) 230 µlと10%過硫酸アンモニウム1mlを加えて素早く混ぜた後、得られた溶液を、薄板状部材を用いてストリップ状に切り出した一次元目のゲルをセットした、二次元目の電気泳動に用いるガラス製ゲル板(縦47.5cm×横19.5cm×隙間0.2cm)に、一次元目のゲルの下に気泡が入らないように静かに流し込んで重合させて調製した。

20

30

【0025】

アクリルアミドの重合反応が終了してゲルが固まった後、ゲル板を泳動装置にセットして(少なくともこの段階に至るまでには一次元目のゲルの表面に残ったゲルとともに切り込まれたラップフィルムは除去済みである)、ゲル板上下のバッファ槽を0.3×TBEで満たし、ゲルの最上部に泳動状況識別用電気泳動用尿素バッファ(7M尿素, 0.25%プロモフェノールブルー, 0.25%キシレンシアノール)を約100 µlマウントし、10mA定電流、室温条件下、電気泳動用尿素バッファに含まれるキシレンシアノールが一次元目のゲルから30cm下に移動するまで約24時間泳動を行った(図1(3)参照: 図中、2Dは二次元目の電気泳動方向を示す。以下同じ)。二次元目の電気泳動が終了した後、一次元目の電気泳動が終了した時と同様の手順でオートラジオグラフィーを行った。その結果、二次元目のゲル上で多数の低分子RNAを分離することができた(図1(4)参照)。

40

【0026】

実験2:

embryonic stageの線虫(孵化前の線虫)から調製した試料と、mixed stageの線虫(卵から成虫に至るまでの幼虫期L1~L4のいずれかの段階にある線虫が複数混在しているもの)から調製した試料を、それぞれ実験1と同様にして二次元電気泳動を行い、50nt以下の低分子RNAを二次元目のゲル上で分離した。結果をそれぞれ図2の(1)と(2)に示す(図中、1Dは一次元目の電気泳動方向を示し、2Dは二次元目の電気泳動方向を示す)。両者を比較

50

すると互いに泳動像が異なり、それぞれのステージにおいて生体内における低分子RNAの発現状態が異なることがわかった。検出されたスポットは、embryonic stageに特異的なもの（例えば図2(1)で矢視したもの）が85個、mixed stageに特異的なもの（例えば図2(2)で矢視したもの）が51個、共通に見られるもの（例えば円で囲んだもの）が54個であった。こうして得られたスポットから、新規な50nt以下の低分子RNAの探索などを行うことができた。

【産業上の利用可能性】

【0027】

本発明は、50nt以下の低分子RNAを簡便に再現性よく分離することができる二次元電気泳動法を用いた、その分析方法を提供することができる点において、産業上の利用可能性を有する。

10

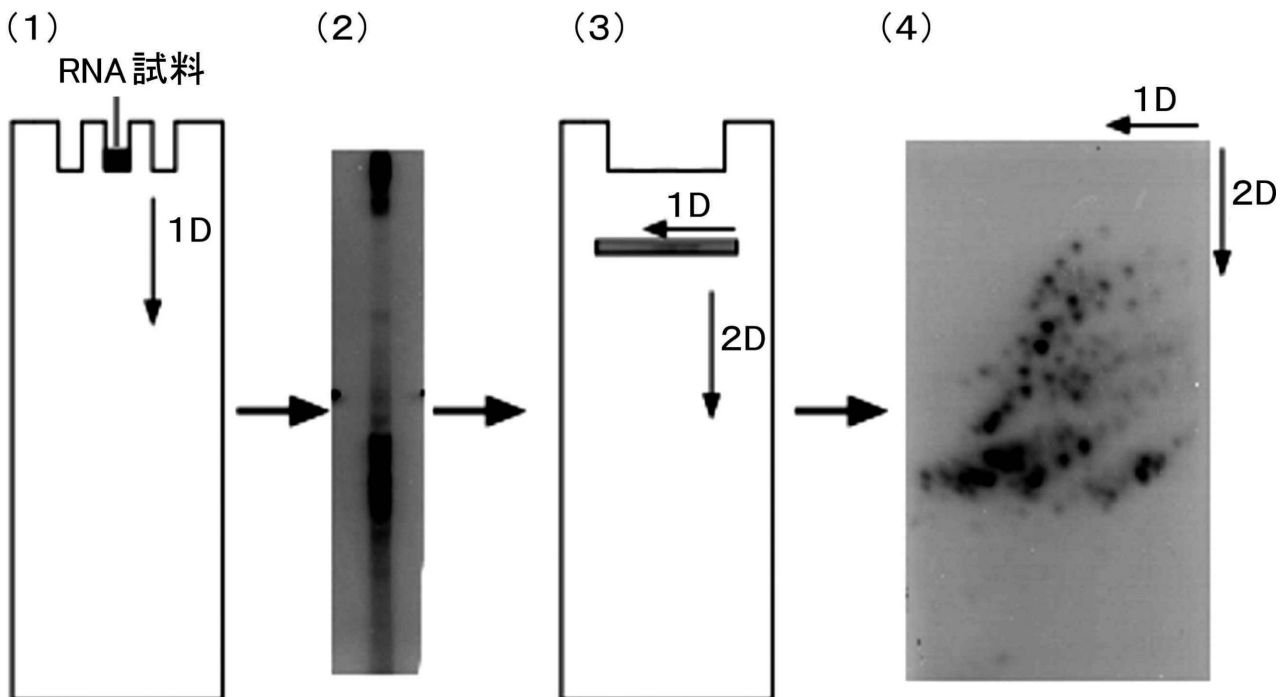
【図面の簡単な説明】

【0028】

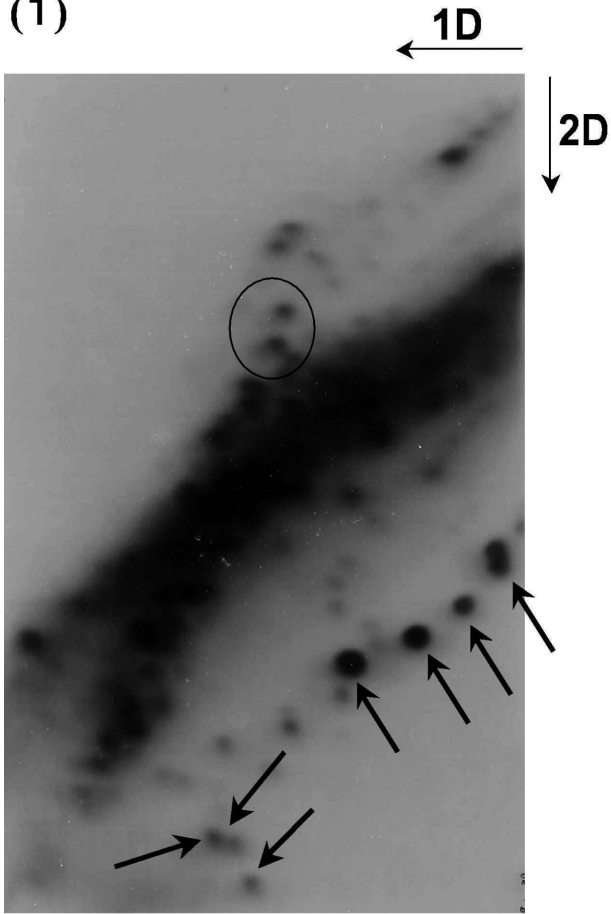
【図1】実施例における本発明の二次元電気泳動法を用いた50nt以下の低分子RNAの分析方法の概略手順を示す図である。

【図2】同、embryonic stageの線虫の低分子RNAの二次元電気泳動像と、mixed stageの線虫の低分子RNAの二次元電気泳動像である。

【図1】

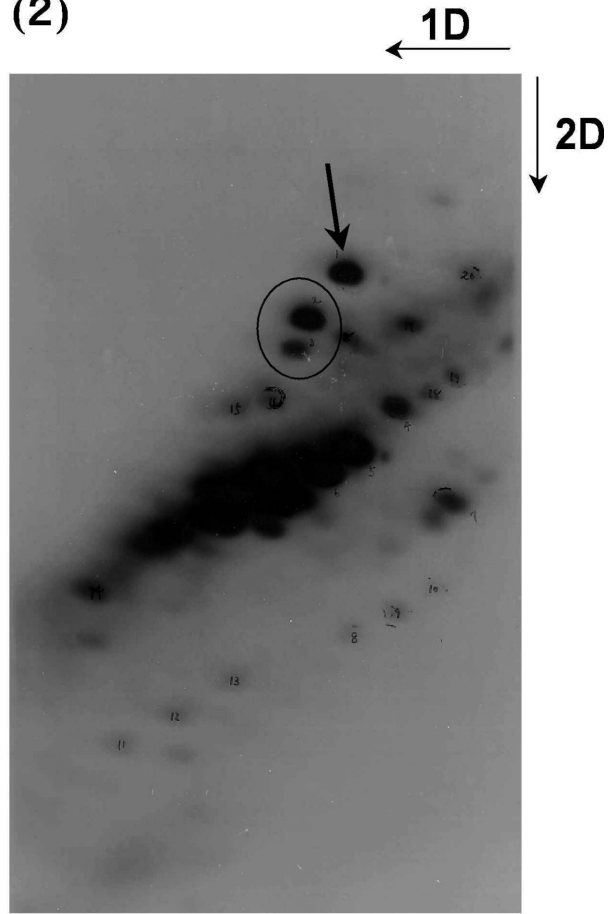


【図2】
(1)



embryonic stageの線虫から
調製した50nt以下のRNA

(2)



mixed stageの線虫から調
製した50nt以下のRNA