

チャム RNA 増幅を用いた 1 個のヒト細胞 cDNA ライブラリー作成法

大阪大学微生物病研究所 野島 博・東岸任弘 (とうがん たかひろ)

(A) 試薬などの準備 {注意 1}

{注意 1} Stratagene の cDNA ライブラリー作製キットには以下に列挙する試薬類の多くが入っていて便利であるので購入を勧める。ただしリンカープライマーとアダプターはデザインが異なるのでキットの品はこのプロトコールでは使わない。

- [1] 逆転写酵素 (RTase): 生化学工業、TOYOBO または BRL(Superscript II)、Strata Script RT、Super ScriptIII(Invitrogen) など
- [2] *E. coli* RNase H: TOYOBO、タカラバイオなど
- [3] *E. coli* DNA Polymerase I: TOYOBO、タカラバイオなど
- [4] T4 DNA Polymerase: TOYOBO、タカラバイオなど
- [5] T4 DNA Ligase: TOYOBO、タカラバイオなど
- [6] 制限酵素: *XhoI*, *NotI* (50U/ml、高濃度:タカラバイオ) など、Linker Primer の切断用
- [7] 10x First Strand Buffer: 500mM Tris-HCl(pH8.3), 750mM KCl, 30mM MgCl₂
- [8] First Strand Mixture: 10mM dATP,dGTP,dTTP, 5mM 5-methyl-dCTP
- [9] 0.1M dithiothreitol (DTT)
- [10] Linker Primer: 1.6 mg/ml (GA)10ACGCGTCTCGACTCGAGCGGCCGCGGACCG(T)₁₈
(HPLC グレードで外注する)。
- [11] RNase Inhibitor: 40 U/μl Promega など
- [12] 10x Second Strand Buffer: 188mM Tris-HCl(pH8.3), 906mM KCl, 46mM MgCl₂
- [13] Second Strand Nucleotide Mixture: 10mM dATP,dGTP,dTTP, 25mM dCTP
- [14] フェノール/クロロホルム: 1:1 容量比にて水で飽和したフェノール(ナカライ: 核酸抽出用特級試薬: Cat.No.26728-45)とクロロホルムを混ぜ、遮光して 4°C に保存。
- [15] 3M Sodium Acetate
- [16] エタノール: (ナカライなど)
- [17] 10x T4 DNA Polymerase Buffer: 500mM Tris-HCl(pH8.3), 100mM MgCl₂
500mM NaCl, 100mM DTT
- [18] 2.5 mM dNTP mixture
- [19] 10x Ligase Buffer: 500mM Tris-HCl(pH7.5), 70mM MgCl₂, 10mM DTT
- [20] 10 mM rATP
- [21] Adaptor: *Bam*HI(*Bg*III)-*Sma*I d(GATCCCCGGG)
p*Sma*I linker: d(pCCCCGGG) (タカラバイオ)
- [22] *NotI* Buffer Supplement: 278 mM NaCl, 8 mM MgCl₂, 1.8mM DTT,

0.018%BSA, 0.018%Triton X-100

- [23] 10 X *NotI* Buffer : 100mM Tris-HCl (pH7.5), 1.5 M NaCl, 70mM MgCl₂,
10mM DTT, 0.1%Triton X-100
- [24] 10 X *Bgl*II Buffer : 100mM Tris-HCl(pH7.5), 1.0 M NaCl, 70mM MgCl₂,
10mM DTT
- [25] 10 X Bacterial Alkaline Phosphatase (BAP) Buffer :
500mM Tris-HCl (pH8.0), 10mM MgCl₂
- [26] 10x STE : 1M NaCl, 100mM Tris-HCl(pH8.0), 10mM EDTA
- [27] Spin Column : CROMA SPIN-400(CLONTECH : TOYOBO 販売)
- [28] Vector DNA : pAP3*neo* など
- [29] TE : 10mM Tris-HCl(pH7.5), 1mM EDTA
- [30] 1/10 TE : 1mM Tris-HCl(pH7.5), 0.1mM EDTA
- [31] tRNA : Sigma 社の TypeXX (大腸菌 tRNA) をフェノール抽出し、エタノール沈
殿してから 2 mg / ml となるように H₂O に溶かして -20°C に保存しておく。
- [32] Electro MAX DH12S Cells : GIBCO-BRL-Invitrogen 社(#18312-017)
- [33] T7 RNA polymerase (10~50 U/μl) タカラバイオなど
- [34] Rnase-free Dnase I タカラバイオなど
- [35] 10 X T7 Pol Buffer: 400mM Tris-HCl(pH8.0), 80mM MgCl₂, 20mM spermidin,
50mM DTT (別チューブ入り)
- [36] 25 mM NTP Mix : タカラバイオなどより ATP, CTP, GTP, UTP (各 100 mM)を購入し、
このまま等量ずつ混ぜる。分注して冷凍保存する。
- [37] QuickPrep Micro mRNA Purification Kit (Quiagen)(#27-9255-01)
- [38] Millipore filter (UFCP3TK50; MILLIPORE)あるいは東ソー(TOSOH MINICENT-30;08627)
- [39]Chum-RNA チャム RNA (Chum-RNA) : ジーンデザイン(株)より購入。

(B) プロトコール (操作手順)

(B-1) ベクターの調製

① 次のように混ぜる。

ベクターDNA(pAP3neo)	(100 μ g)
10 X <i>NotI</i> Buffer {注意 2 a}	20 μ l
H ₂ O {注意 2 b}	全量を 200 μ l にする

{注意 2 a} *NotI* で切断するときには付属の BSA を加えるようにカタログにかかれてある (たとえばタカラバイオなど) が、市販の BSA には大腸菌の DNA が混入していることが判明したので、BSA を加えることはしないように注意すること。また、我々の従来のプロトコールにも BSA を 10 X *NotI* Buffer や 10 X *Bgl/II* Buffer に加えていたが、これも同様の理由で加えないように訂正して欲しい。

{注意 2 b} 水は RO 水を 2 段蒸留してから MilliQ 水とするのが望ましい。これをエッペンチューブに分注し、使用するまで凍結保存する。凍結融解は可。室温保存は不可。

- ② 50 ユニットの *NotI* を加え、37°C で 2 時間 (120min) 保温する。ついでもう 20 ユニットの *NotI* を加えてさらに 1 時間 37°C で保温する。切断が完全であることをアガロース電気泳動にて確かめる。
- ③ 等量 (210 μ l) のフェノール・クロロホルム混液 (1 : 1) を加え混ぜる。
- ④ マイクロフュージにて 1 分間遠心。
- ⑤ 上澄をミリポアフィルター(ウルトラフリーC3; UFC3LTK または UFC3THK)あるいは東ソーフィルター(MINICENT-30)にのせ (カップが満杯ならば遠心後また追加する)、15 分間マイクロフュージ (10 K rpm) にて遠心する。10 K rpm 以上のスピードで遠心するとフィルターが変形するので注意する。
- ⑥ フィルターカップに 100 μ l の TE を加え、20 分間マイクロフュージ (10 K rpm) にて遠心する。この操作をあと 2 回繰り返す。
- ⑦ 上澄を新しいマイクロフュージチューブに移し③~④を繰り返す。その後、上澄を新しいマイクロフュージチューブに移し 0.08 倍量 (17 μ l) の 3M 酢酸ナトリウムと 約 2 倍量 (420 μ l) のエタノールを加えドライアイス中で 15 分 (あるいは零下 20°C で一夜) 冷却する。
- ⑧ マイクロフュージで 15 分間遠心し、沈殿を 500 μ l の 70% エタノールで軽く洗ったあと 2 秒間遠心する。上澄を良除き、もう一度 2 秒間遠心する。イエローチップで底に溜まった少量の 70% エタノールを除く。沈殿は決して乾かさず湿ったままの状態ですべて次に進むこと。

⑨ 次のように混ぜる。

ベクターDNA(pAP3neo)	(100 μ g)
10 X <i>NotI</i> Buffer {注意 2 a}	20 μ l
H ₂ O {注意 2 b}	全量を 200 μ l にする

⑩ 20 ユニットの *NotI* を加えて1時間37°Cで保温する。

⑪ ③~④と同様にしてフェノール/クロロホルム抽出を2回繰り返したあと、エタノール沈殿操作を行う

⑫ 沈殿物を70%エタノールにて洗浄後、つぎのように混ぜる。

ベクターDNA(pAP3neo)	沈殿物
10 X BAP Buffer	20 μ l
H ₂ O	全量を 200 μ l にする

⑬ 1 ユニットの Bacterial Alkaline Phosphatase (BAP)を加え、65°C で30分間保温する。

⑭ ③~⑥と同様にしてフェノール/クロロホルム抽出を2回繰り返したあと、エタノール沈殿操作を行う。

⑮ 沈殿物に次のものを加える。

ベクターDNA(pAP3neo)	沈殿物
10 X <i>Bgl</i> III Buffer	20 μ l
H ₂ O	全量を 200 μ l にする

⑯ 1000 ユニットの *Bgl*III を加え、37°Cで2時間保温する。

⑰ 10 μ l の10% SDS, と20 μ l の0.25M EDTAを加えて混ぜたのち、230 μ l のフェノール・クロロホルム混液を加え混ぜる。攪拌後マイクロフュージにて2分間遠心する。

⑱ 上澄を新しいマイクロフュージチューブに移し、100 μ l のクロロホルムを加え、よく攪拌してから1分間マイクロフュージにて遠心する。

⑳ 上澄をミリポアフィルター(ウルトラフリーC3; UFC3LTK または UFC3THK)あるいは東ソーフィルター(MINICENT-30)にのせ (カップが満杯ならば遠心後また追加する)、15分間マイクロフュージ (10 K rpm)にて遠心する。10 K rpm 以上のスピードで遠心するとフィルターが変形するので注意する。

㉑ フィルターカップに 100 μ l の TE を加え、20分間マイクロフュージ (10 K rpm)にて遠心する。この操作をあと2回繰り返す。

㉒ フィルターカップに 90 μ l の 1/10 TE を加え、よく攪拌あるいはイエローチップで溶液を上下させることでフィルターの底をよく洗い DNA を回収して新しいマイクロフ

- ⑮ 反応液に 10 μ l の 10x STE を加えてから、下記のプロセスにより CHROMA SPIN-400 を用いて、切断された *NotI*-*Bgl*III 断片を除く。
- ⑯ チューブに出てきたサンプルに対して、③～⑥と同様にしてフェノール/クロロホルム抽出・エタノール沈殿・洗浄操作をし、沈澱物に 50 μ l の TE を加え DNA の濃度を UV メーターで測定して、TE で薄めるなどして、0.1 μ g/ μ l にあわせておく (OD260=1.0 のとき 50 μ g)。

CHROMA SPIN-400 の使い方

- ①まず CHROMA SPIN-400 を均一にサスペンド (カラムを上下して混ぜること) してから上下の蓋を取ったのち、付属のチューブ (あるいは蓋を切り落とした 1.5 ml 容量の小さいマイクロフュージチューブ) にのせ、10 分間静置して余分の TE 液を排出しておく。カラムに 1ml のバッファー (1 x STE) を加え、それを 15 ml のプラスチックチューブに入れた状態で 700 x g にて 3 分間、低速遠心 (半径 20cm のスイングバケットローターで 1,800 rpm [rotation per minute]) する。
- ②遠心後、チューブに出てきたバッファーは棄てる。もう一度同じチューブを 700 x g にて 3 分間、低速遠心する。
- ③遠心後、さらにチューブに出てきた少量のバッファーも棄てる。
- ④この CHROMA SPIN-400 を新しい付属のチューブ (1.5 μ l 容量) に差し込み、カラムの中心の樹脂の上にサンプル⑧を少量 (10 μ l) ずつ加える。このとき、壁に液が付かないように注意する (なぜなら、壁に付いた分は樹脂を通過しないで遠心されるため、分画除去操作の効果が薄れるから)。さらにそれを 15 ml のチューブに入れた状態で、700 x g にて 5 分間、低速遠心する。
- ⑤チューブに出てきたサンプル (約 50 μ l) に 等量のフェノール/クロロホルム混液を加え、良く攪拌してから B-I-③～⑥と同様にしてフェノール/クロロホルム抽出をし、10 μ g のキャリア tRNA と 4 μ l の 5M NaCl および 100 μ l のエタノールを加えることでエタノール沈殿・洗浄操作を行う。沈澱物を乾燥させずにそのまま以下のステップに使う。

(B-2)チャムRNAの調整

① 次のように混ぜる。

ベクターDNA(pDuR1)	(10 μ g)	{図2参照}
10 X <i>NotI</i> Buffer	20 μ l	
H ₂ O	全量を 200 μ l にする	{注意3}

{注意3} 水は RO 水を2段蒸留してから MilliQ 水とするのが望ましい。これをエッペンチューブに分注し、使用するまで凍結保存する。凍結融解は可。室温保存は不可。

- ② 5ユニットの *NotI* を加え、37°C で2時間 (120min) 保温する。切断が完全であることをアガロース電気泳動にて確かめる。不完全であればもう2ユニットの *NotI* を加えてさらに1時間37°Cで保温する。
- ③ 等量 (210 μ l) のフェノール・クロロフォルム混液 (1 : 1) を加え混ぜる。
- ④ マイクロフュージにて1分間遠心。
- ⑤ 上澄を新しいマイクロフュージチューブに移し 0.08 倍量 (17 μ l) の 3M 酢酸ナトリウムと 約2倍量 (420 μ l) のエタノールを加えドライアイス中で15分 (あるいは零下20°Cで一夜) 冷却する。
- ⑥ マイクロフュージで15分間遠心し、沈殿を 500 μ l の70%エタノールで軽く洗ったあと2秒間遠心する。上澄を良除き、もう一度2秒間遠心する。イエローチップで底に溜まった少量の70%エタノールを除く。沈殿は決して乾かさず湿ったままの状態ですぐに進むこと。
- ⑦ 沈殿物に次のものを加える。

ベクターDNA(<i>NotI</i> -cut pDuR1)	沈殿物
10 X T7 Pol Buffer	20 μ l
25 mM NTP mix	16 μ l
H ₂ O (全量を 200 μ l にする)	160 μ l

- ⑧ 50ユニット (約1~5 μ l) の T7 RNA ポリメラーゼを加え、37°C で60分間保温する。
- ⑨ これに5U (約1 μ l) の Dnase I (Rnase free) を加え、さらに37°C で20分間保温する。
- ⑩ ③~⑥と同様にしてフェノール/クロロフォルム抽出、エタノール沈殿、70%エタノール洗浄操作を行う。
- ⑪ 沈殿物に 100 μ l の TE を加え、dRNA の濃度を UV メーターで測定する (OD₂₆₀=1.0 のとき 40 μ g)。5 μ g/ μ l となるように TE で薄める。分注して-20°Cあるいは-80°Cの冷凍庫で保存する。

(B-3) 極微量の mRNA の精製

QuickPrep Micro mRNA Purification Kit (Quiagen)(#27-9255-01)を利用する。以下では、そのプロトコールを少し改変したかたちで進める操作法を示す。

- ① 採取した極少数の細胞に 0.4 ml の Extraction Buffer を加え、総計で 30 秒以上強くボルテックス（攪拌）する。
- ② ここに 0.8 ml の Elution Buffer を加え、ボルテックス（攪拌）する。
- ③ ビンの中にある Oligo(dT)-cellulose を均一の混ぜた後、1 ml をチューブに移す。
- ④ ②と③を同時に卓上遠心機、最高速（16,000 x g）で 1 分間遠心する。
- ⑤ ③の Oligo(dT)-cellulose の上清を除き、②のサンプル上清を全て（1.2ml）加える。さらに 5 μ g のダミーRNAを加える。
- ⑥ 3 分間、転倒混和したのち、卓上遠心機、最高速（16,000 x g）で 10 秒間遠心する。
- ⑦ 上清を除き、1 ml の High Salt Buffer を加えて数回転倒混和したのち、卓上遠心機、最高速（16,000 x g）で 10 秒間遠心する。
- ⑧ ⑦の操作を総計で 5 回繰り返す。
- ⑨ 上清を除き、1 ml の Low Salt Buffer を加えて数回転倒混和したのち、卓上遠心機、最高速（16,000 x g）で 10 秒間遠心する。
- ⑩ もう一度、上清を除き、1 ml の Low Salt Buffer を加えて数回転倒混和したのち、卓上遠心機、最高速（16,000 x g）で 10 秒間遠心する。
- ⑪ 上清を除き、0.3 ml の Low Salt Buffer を加えたのちマイクロスピンのカラムに移し、それを受け取りチューブ（2 ml エッペン）にセットする（右図参照）。
- ⑫ 卓上遠心機、最高速（16,000 x g）で 5 秒間遠心したのち、受け取りチューブに落ちてきた液を捨てる。
- ⑬ ⑪と⑫の操作を総計で 3 回行う。
- ⑭ 新しい受け取りチューブ（2 ml エッペン）にマイクロスピンのカラムをセットする。
- ⑮ 65°Cに暖めておいた Elution Buffer を 0.2 ml マイクロスピンのカラムに加える。
- ⑯ 卓上遠心機、最高速（16,000 x g）で 5 秒間遠心し、mRNA を含む抽出液を回収する。⑮と⑯の操作をもう一度繰り返して回収率を上げる。
- ⑰ 受け取りチューブにたまった 0.4 ml の Elution Buffer に 5 μ g のダミーRNAと 40 μ l の 5M NaCl を加えてボルテックスし、それに 0.8 ml のエタノールを加えてドライアイス中で 15 分（あるいは零下 20°C で一夜）冷却（エタノール沈殿）する。
- ⑱ マイクロフュージで 15 分間遠心し、沈殿を 500 μ l の 70%エタノールで軽く洗ったあと 2 秒間遠心する。上澄を良く除き再度 2 秒間遠心する。イエローチップで底に溜まった少量の 70%エタノールを除く。沈殿は乾かさず湿ったままの状態ですぐに進む。

(B-4) cDNA 合成と平滑末端化

① (B-3)-⑩で回収したダミーRNA を含んだ 1 ng 程度の極少量の mRNA に 7.5 μ l の 5mM Tris-HCl (pH7.5) を加え、65°C のヒートブロックで 5 分間加熱した後、氷冷する。

② これに以下の試薬を混和する (試薬は以下の順に添加する。)

10x First Strand Buffer	2.5 μ l	
0.1M DTT	2.5 μ l	
First Strand Mixture	1.5 μ l	
Linker Primer	1 μ l	(1.6 μ g)
RNase Inhibitor	0.5 μ l	
H ₂ O	7.5 μ l	(最終容量を 25 μ l とする)

③ 室温で 10 分間放置する (その間に mRNA とプライマーが結合 {anneal} する)。

④ 1 μ l の Strata Script RT(Stratagene cDNA synthesis Kit 50 U/ μ l) および Super Script III (Invitrogen) を 0.5 μ l 加え、42°C で 45 分反応させる。その後さらに、Super Script III を 0.5 μ l 加え、50°C で 30 分反応させる。その後さらに、55°C で 30 分反応させる。

⑤ 反応終了後、反応液を氷中に移す。

⑥ 氷中で次の試薬を加える。

10x Second Strand Buffer	20 μ l	
0.1M DTT	7.5 μ l	
Second Strand Nucleotide Mixture	3 μ l	
H ₂ O (氷冷しておく)	132.5 μ l	(最終容量を 200 μ l とする)

⑦ 氷中に 5 分間保冷する {注意 4}

{注意 4 : DNA polymerase I を加える反応において、16°C 以上の温度だとヘアピン構造をとる可能性があるため、反応液を 16°C 以下に保つ必要がある}。

⑧ 1.5 μ l (2 unit) の RNase H と 10 μ l (50 unit) の *E.coli* DNA Polymerase I を加える。

⑨ 16°C で 150 分間反応させる。

⑩ 200 μ l のフェノール/クロロホルム混液を加え、良く攪拌してから B-I③~⑥と同様にしてフェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿操作を行う。

⑪ 沈殿物に次の試薬を混ぜる。

10x T4 DNA Polymerase Buffer	10 μ l	
2.5 mM dNTP mixture	5 μ l	
H ₂ O	81.5 μ l	(最終容量を 100 μ l とする)

⑫ 3.5 μ l (約 5 unit) の T4 DNA Polymerase を加える。

⑬ 37°C で 30 分間反応させる。(30 分間を超えない様に注意する。)

- ⑭ 100 μ l のフェノール/クロロホルムを加え、良く攪拌してから 2 分間微量遠心機で遠心する。
- ⑮ 上層の水層を新しいチューブに移し、100 μ l のフェノール/クロロホルム混液を加え、良く攪拌してから B-I③~⑥と同様にしてフェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿・洗浄操作を行う。沈澱物を乾燥させずにそのまま以下のステップに使う。

(B-5) 増幅アダプターの連結、制限酵素切断とスピнкаラムによる分画

- ① 沈澱物に次のサンプルおよび試薬を混ぜる。

サンプル(B-II-⑮)	沈澱物	
10x Ligase Buffer	2 μ l	
10 mM rATP	2 μ l	
増幅 Adaptor {注意 5}	1 μ l	(0.35 μ g)
H ₂ O	13.5 μ l	(最終容量を 18.5 μ l とする)

{注意 5}

増幅アダプターの塩基配列：

Sense T7 : 5'- CACTAGTACGCGTAATACGACTCACTATAGGGAATCCCCGGG-3'

Antisense T7 : 5'-pCCCCGGGAATTCCTATAGTGAGTCGTATTACGCGTACTAGTGAGCT-3'

増幅アダプターは、モル比 1:1 の Sense T7 と Antisense T7 を 0.35 μ g/ μ l となるようにアニーリングバッファー (10mM Tris-HCl[pH7.5], 1mM EDTA, 10mM MgCl₂) に溶かし、そのまま 65 °C 2 分 ⇒ 37 °C 10 分 ⇒ 室温 5 分反応により、結合 (アニーリング) させておく。アニーリングののちは-20°Cに保存しておく。

- ② 1.5 μ l (約 4 unit) の T4 DNA Ligase を加える。
- ③ 8°Cで一晩反応させる。
- ④ 70°Cで 30 分間加熱処理する。
- ⑤ 5 秒間遠心する。
- ⑥ 上澄みを新しい 0.6ml のチューブに移し、そこへ次の試薬を加える。

NotI Buffer Supplement	27 μ l
NotI	3 μ l

- ⑦ 37°Cで 90 分間反応させる。
- ⑧ 10x STE を 5 μ l および tRNA を 2 μ g 加える。
- ⑨ CROMA SPIN-400 によるサイズ分画の準備をする (右図)。まず CHROMA SPIN-400 を均一にサスペンド (カラムを上下して混ぜること) してから上下の蓋を取ったのち、付

属のチューブ（あるいは蓋を切り落とした 1.5 ml 容量の小さいマイクロフュージチューブ）にのせ、10 分間静置して余分の TE 液を排出しておく。カラムに 1ml のバッファー (1 x STE) を加え、それを 15 ml のプラスチックチューブに入れた状態で 700 x g にて 3 分間、低速遠心（半径 20cm のスイングバケットローターで 1,800 rpm [rotation per minute]）する。

- ⑩ 遠心後、チューブに出てきたバッファーは棄てる。もう一度同じチューブを 700 x g にて 3 分間、低速遠心する。
- ⑪ 遠心後、さらにチューブに出てきた少量のバッファーも棄てる。
- ⑫ この CHROMA SPIN-400 を新しい付属のチューブ (1.5 μ l 容量) に差し込み、カラムの中心の樹脂の上にサンプル⑧を少量 (10 μ l) ずつ加える。このとき、壁に液が付かないように注意する（なぜなら、壁に付いた分は樹脂を通過しないで遠心されるため、分画除去操作の効果が薄れるから）。さらにそれを 15 ml のチューブに入れた状態で、700 x g にて 5 分間、低速遠心する。
- ⑬ チューブに出てきたサンプル (約 50 μ l) に 等量のフェノール/クロロホルム混液を加え、良く攪拌してから B-I-③~⑥と同様にしてフェノール/クロロホルム抽出をし、10 μ g のキャリア tRNA と 4 μ l の 5M NaCl および 100 μ l のエタノールを加えることでエタノール沈殿・洗浄操作を行う。沈殿物を乾燥させずにそのまま以下のステップに使う。

(B-6)cDNA とダミーRNA の増幅 (B-6 と 7 を 4 回繰り返す)

① 沈澱物に次の試薬を混ぜる。

B-4-⑬ のサンプル	沈澱物
ダミーRNA (5 μ g/ μ l)	1 μ l
10 X T7 Pol Buffer	10 μ l
25 mM NTP mix	8 μ l
H ₂ O (全量を 95-99 μ lにする)	76-80 μ l

② 50ユニット (約 1 ~ 5 μ l) の T7 RNA ポリメラーゼを加え、37°C で 90 分間保温する。

③ 5ユニットの T7 RNA ポリメラーゼを加え、37°C でさらに 30 分間保温する。

上記 B-4-⑧~⑬ のプロセスにより CHROMA SPIN-400 を用いて増幅されたダミーRNA を除去する。プロセス⑬の後に生じた沈澱物は乾燥させずに以下のステップに使う。

(B-7) cDNA 合成と平滑末端化

① (B-6) ④で回収したダミーRNA を含んだ増幅後の mRNA に 7.5 μ l の 5mM Tris-HCl (pH7.5) を加え、65°Cのヒートブロックで 5 分間加熱した後、氷冷する。

② これに以下の試薬を混和する (試薬は以下の順に添加する。)

10x First Strand Buffer	2.5 μ l	
0.1M DTT	2.5 μ l	
First Strand Mixture	1.5 μ l	
Linker Primer	1 μ l	(1.6 μ g)
RNase Inhibitor	0.5 μ l	
H ₂ O	7.5 μ l	(最終容量を 25 μ lとする)

③ 室温で 10 分間放置する (その間に mRNA とプライマーが結合 {anneal} する)。

④ 1 μ l の Strata Script RT(Stratagene cDNA synthesis Kit 50 U/ μ l)および Super ScriptIII (Invitrogen)を 0.5 μ l 加え、42°Cで 45 分反応させる。その後さらに、Super ScriptIIIを 0.5 μ l 加え、50°Cで 30 分反応させる。その後さらに、55°Cで 30 分反応させる。

⑤ 反応終了後、反応液を氷中に移す。

⑥ 氷中で次の試薬を加える。

10x Second Strand Buffer	20 μ l	
0.1M DTT	7.5 μ l	
Second Strand Nucleotide Mixture	3 μ l	
H ₂ O (氷冷しておく)	132.5 μ l	(最終容量を 200 μ lとする)

- ⑦ 氷中に 5 分間保冷する。
- ⑧ 1.5 μ l (2 unit) の RNase H と 10 μ l (50 unit) の *E.coli* DNA Polymerase I を加える。
- ⑨ 16°C で 150 分間反応させる。
- ⑩ 200 μ l のフェノール/クロロホルム混液を加え、良く攪拌してから B-I③～⑥と同様にしてフェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿操作を行う。
- ⑪ 沈澱物に次の試薬を混ぜる。

10x T4 DNA Polymerase Buffer	10 μ l
2.5 mM dNTP mixture	5 μ l
H ₂ O	81.5 μ l (最終容量を 100 μ l とする)

- ⑫ 3.5 μ l (約 5 unit) の T4 DNA Polymerase を加える。
- ⑬ 37°C で 30 分間反応させる。(30 分間を超えない様に注意する。)
- ⑭ 100 μ l のフェノール/クロロホルムを加え、良く攪拌してから 2 分間微量遠心機で遠心する。
- ⑮ 上層の水層を新しいチューブに移し、100 μ l のフェノール/クロロホルム混液を加え、良く攪拌してから B-I③～⑥と同様にしてフェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿・洗浄操作を行う。沈澱物を乾燥させずにそのまま以下のステップに使う。

(B-8) アダプターの連結、制限酵素切断とスピンカラムによる分画

① 沈澱物に次のサンプルおよび試薬を混ぜる。

サンプル(B-II-⑮)	沈澱物
10x Ligase Buffer	2 μ l
10 mM rATP	2 μ l
Adaptor {注意6}	1 μ l (0.35 μ g)
H ₂ O	13.5 μ l (最終容量を 20 μ l とする)

{注意6}

アダプターは、前もって以下の組成で 65 °C 2 分、37 °C 10 分、室温 5 分反応により、結合 (アニーリング) させておく。アニーリングのちはそのまま -20°C に保存しておく。

*Bam*HI(*Bg*III) adaptor: 10mM Tris-HCl(pH7.5), 1mM EDTA, 10mM MgCl₂,

モル比 1:1 の *Bam*HI (*Bg*III)-*Sma*I と *pSma*I linker を 0.35 μ g/ μ l とするよう

にとかす。

② 1.5 μ l (約 4 unit) の T4 DNA Ligase を加える。

③ 8°C で一晩反応させる。

④ 70°C で 30 分間加熱処理する。

⑤ 5 秒間遠心する。

⑥ 上澄みを新しい 0.6ml のチューブに移し、そこへ次の試薬を加える。

<i>Not</i> I Buffer Supplement	27 μ l
<i>Not</i> I	3 μ l

⑦ 37°C で 90 分間反応させる。

⑧ 10x STE を 5 μ l および tRNA を 2 μ g 加える。

⑨ 上記 B-4-⑧~⑬ のプロセスにより CHROMA SPIN-400 を用いて、増幅された残存ダミーRNA などを除去する。プロセス⑬の後に生じた沈澱物は乾燥させずにそのまま以下のステップに使う。

⑩ 沈澱物に次の試薬を混ぜる。

10x Ligase Buffer	3 μ l
10 mM rATP	3 μ l
<i>Not</i> I/ <i>Bg</i> III cut Vector (B-I-⑭)	1 μ l (100 ~300ng)
H ₂ O	22 μ l (最終容量を 30 μ l とする)

⑪ 1 μ l (4 unit) の T4 DNA Ligase を加える。

⑫ 12°C で一晩反応させる。

(B-9) エレクトロポレーション法による形質転換

- ① ステップ[B-8-⑫] の連結後の DNA サンプルを 70°C で 30 分間加熱する。
- ② 70 μ l の TE および 100 μ l のフェノール・クロロフォルム (PC) を加え、よく攪拌してから 1 分間マイクロフュージ (15,000 rpm) にて遠心する。
- ③ 上澄を新しいマイクロフュージチューブに移し、100 μ l のクロロフォルムを加え、よく攪拌してから 1 分間マイクロフュージにて遠心する。
- ④ 上澄 100 μ l をミリポアフィルター (UF3TK50) あるいはそれに類似のフィルターにのせ、5 分間マイクロフュージ (10,000 rpm) にて遠心する。10,000 rpm 以上のスピードで遠心するとフィルターが変形するので注意する。
- ⑤ フィルターカップに 100 μ l の TE を加え、20 分間マイクロフュージ (10,000 rpm) にて遠心する。この操作をもう 2 度繰り返す。
- ⑥ フィルターカップに 25 μ l の TE を加え、よく攪拌あるいはイエローチップで溶液を上下させることでフィルターの底をよく洗う。
- ⑦ フィルターカップを逆さにして蓋を切り取ったマイクロフュージチューブに押し込み、5 秒間マイクロフュージ (5,000 rpm) にて遠心する。回収された溶液はチューブの底にたまる。これを新しい 0.6 ml 容量の小さいマイクロフュージチューブに移す。このサンプルをすぐに形質転換しないときは -20°C に保存しておく。
- ⑧ まず 1.5 ml のプラスチックチューブに 2 ml ずつの SOC を分注して 37°C で保温しておく。ElectroMAX DH12S Cells (GIBCO-BRL 社) {注意 7} のうち 1 本 (100 μ l) を 2 つに分注し、(7) の DNA サンプルを 5 μ l ずつ加え、そっと攪拌する。
{注意 7} cDNA ライブラリー作製法のうち品質を決定づけるのは高効率エレクトロポレーション用濃縮大腸菌の作製だが、 10^{10} cfu/ μ g-pRB322DNA という高効率のものを自分で作製するのは困難なので購入した方がよい。
- ⑨ これを先の細いプラスチックチップを用いて氷上で冷やしておいたキュベットに速やかに移し、2.5 kV, 129 オームの条件下で電圧 (電流) パルスを加える {注意 8}。
{注意 8} エレクトロポレーション装置としては、たとえば BTX ; ELECTRO CELL MANIPULATOR 600 等があるが、どこの会社でも同等な結果が得られるはずである。キュベットとしては (BIO-RAD Gene pulser 2mm 間隔) を使用する。
- ⑩ パスツールピペットを用いて、事前に 37°C で保温しておいた SOC に速やかに移す。パスツールピペットに SOC を吸い取り、それでキュベットの底を洗うようにすると良い。
- ⑪ 37°C で 1 時間激しく (200-250 r.p.m.) 震盪培養する。
- ⑫ 100 ml の LB/Amp (L-broth に 50 mg/Liter のアンピシリンを加えたもの) に移す。そのうち 10 μ l, 100 μ l とりだし 3 ml の 50°C に保温した L-broth トップアガーを加え、LB/Amp プレートにまき 37°C で一夜培養する。

⑬ 100 ml の LB/Amp 培養液は 37°C で数時間 ($OD_{600nm}=1.0$ くらいになるまで) 震盪培養する。ライブラリー液 30 ml あたり 2.1 ml の DMSO を加え、保存チューブに分注して液体窒素中、あるいは超低温冷凍庫に保存する。残りのライブラリー液 (70 ml) はプラスミド DNA の調製に用いる。pAP3neo ベクターを用いた場合はここから約 0.5mg のプラスミド DNA がとれる筈である。

⑭ 翌朝プレートにはえてきたコロニーの数をカウントする {注意 9}。5 μ l のプレートに 10 個以上のコロニー (全体で 1 0 0 万個の独立コロニーが存在する計算になる) が観察できれば次のステップに進む。それ以下のコロニーしか観察出来なければそのライブラリーは不良品なので廃棄する。

{注意 9} 5 ml のサンプルを加えたプレートに 1 0 0 個のコロニーが生えてきたとき、この cDNA ライブラリーの複雑度 (complexity) は 10^7 cfu である。そこから 10-20 個のコロニーをピックアップし、ラピッドライシス法によりプラスミド DNA を調製して cDNA インサートを挟む制限酵素 (*EcoRI/NotI*; *BamHI*; *XhoI* など) で切断してそのサイズ分布を調べておく。

参考文献

- 1) 野島博、小堀正人：リンカー・プライマー法。バイオマニュアルシリーズ 2、遺伝子ライブラリーの作製法 (野島博編)、羊土社、東京、1994.
- 2) 野島博：ライブラリーの作成とクローニング、基礎生化学実験法 (大島泰郎編)、第 4 巻 核酸・遺伝子実験 II, p.31-64, 東京化学同人、2000.
- 3) 恩田弘明, 野島博：高効率 cDNA サブトラクション技術、実験医学、23(2), 2005
- 4) 恩田弘明, 野島博：段階的サブトラクション法、実験医学、23(3), 2005