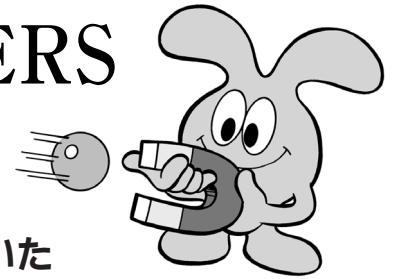


# DYNABEADS LETTERS



## Dynabeads Oligo(dT)<sub>25</sub> から得た mRNA を用いた Solid-phase RT-PCR 法

東海大学医学部分子生命科学系遺伝情報部門  
成瀬 妙子、猪子 英俊

### 1. 目的

mRNA を逆転写させて得られた cDNA を増幅する RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction) 法は、DNA からの増幅に比べて偽遺伝子の影響を受けないためバックグラウンドが低く、目的の領域を特異的に増幅できる。この RT-PCR 法は遺伝子発現の有無やウイルスの検出などに有効な方法であるが、有核細胞や組織片からの total RNA や mRNA の抽出操作が複雑で、さらに逆転写後には cDNA を精製しなければならず、時間と労力を要した。そこで今回はこれらの点が改良された、Dynabeads oligo(dT)<sub>25</sub> を用いて、組織からダイレクトに mRNA を分離し、RT-PCR を行う solid-phase RT-PCR 法について述べる。

### 2. 原理と利点

Dynabeads oligo(dT)<sub>25</sub> は有核細胞や組織から直接、しかも短時間に高純度の mRNA を分離できる。このビーズに逆転写酵素を加えると、ビーズ上の oligo(dT)<sub>25</sub> に結合した状態の poly(A)+RNA が鋳型となり、一本鎖 cDNA が合成される。このとき、ビーズ上の oligo(dT)<sub>25</sub> が 5' 側のプライマーとなるため、逆転写用のプライマーを加える必要がない。さらに今回は cDNA の合成と増幅を一つの酵素で行うことができる rTth DNA polymerase を使用することで、mRNA の分離から PCR までを一本のチューブ内で行うことができ、cDNA の精製も不要である。すべての操作は約 3 時間で終了する。

### 3. 材料

ここでは培養細胞を用いた方法を紹介します。また使用する試薬類は DEPC (diethyl pyrocarbonate) 処理水を用いるなどして RNase - free の状態のものを用いること(今回は特に kit を用いたが、buffer 類を各自で作製する場合も同様)。

- a) Dynabeads mRNA DIRECT kit
- b) Dynal MPC - E
- c) 1 ~ 2 ml ディスポシリンジ
- d) PBS (pH 7.4)
- e) rTth DNA polymerase with buffer pack (Perkin Elmer)
- f) Distilled water

## 4. 方法

### 1. mRNAの分離

- 1) 1.5 mlチューブに $1 \times 10^6$  個の細胞を入れ、すぐに4℃に保冷しておいたPBSで希釈して5000 x g、1分間遠心する。
- 2) 上清をチップで丁寧に吸い取り、PBSを加えて洗浄する。
- 3) 5000 x g で1分間遠心後、上清をチップで丁寧に吸い取り、Lysis / Binding buffer 200  $\mu$ lを加えてよくサスペンドする。このときに細胞塊を完全にほぐしておく。
- 4) 1 ~ 2 ml のディスポーザブルシリンジを、チューブの底に垂直に立ててピストンを上下させ、なるべく泡立てないように一気にサスペンドし、さらさらの状態にする。
- 5) 10000 x g、30秒遠心する。
- 6) 5 ~ 10  $\mu$ l のoligo (dT)<sub>25</sub>を新しい1.5 ml のチューブに取りだし、MPC - E にセットしてビーズを集める。
- 7) 上清を捨て、200  $\mu$ l のLysis / Binding buffer で1回洗浄する。
- 8) 上清を捨て、5) の全量をビーズの入っているチューブに入れ、蓋をしてから穏やかにサスペンドする。
- 9) 室温で3 ~ 5分間静置後、MPC - E にセットして2分間置き、ビーズを集める。
- 10) 上清を丁寧に取り除き、200  $\mu$ l のWash buffer with LiDS で2回洗浄する。
- 11) さらに200  $\mu$ l のWash buffer で3回洗浄する。

### 2. RT-PCR

RT-PCR についてはHot Start 法を用いた方が効率が良い。ここでは増幅器にGeneAmp PCR System 9600 ( Perkin Elmer ) を使用した。

- 1) 9600用のプレートにチューブをセットし、Reaction mix A \* を加えて70℃ 10分間インキュベートする。
- 2) 温度は70℃を保ち、プレートをブロックにセットしたままチューブの蓋を取り、素早く Reaction mix B \*\* を加えて蓋をしてさらに70℃ 10分間インキュベートする。終了後すぐにプレートのまま5分間氷冷する。
- 3) 80  $\mu$ l の PCR mix \*\*\* を素早く加えて2 temperature PCR を行う。

#### PCR Program

95	1 min		
95	10 sec		
60 ~ 65 <sup>注1)</sup>	15 sec	x	35 cycles
60 ~ 65	6 min		

注1) 増幅領域に合わせて調製する。

- 4) アガロースゲル(1.5 ~ 2%)電気泳動で増幅のチェックを行う。(写真1)

#### \* Reaction mix A

10 x rTth Reverse transcriptase buffer	2 $\mu$ l
Distilled water	11.4 $\mu$ l

上記のmixを上清を取り除いたビーズに加える。

## \*\*Reaction mix B

10 mM MnCl <sub>2</sub> Solution	2 μl
10 mM dGTP	0.4 μl
10 mM dATP	0.4 μl
10 mM dCTP	0.4 μl
10 mM dTTP	0.4 μl
rTth DNA polymerase	2 μl
Total	5.6 μl

## \*\*\*PCR mix

10 x Chelating buffer	8 μl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	6 ~ 10 ml <sup>注2)</sup>
10 pM 5' Primer	1 μl
10 pM 3' Primer	1 μl
Distilled water	
Total	80 μl

注2) MgCl<sub>2</sub> の濃度は増幅領域に合わせて調製する。

## 5. 備考

mRNAの発現が少ないと思われる時にはビーズの使用量を増やすか、RT - PCR 後の産物を一部取り、再 PCR を行うことが望ましい。

## 6. 結果

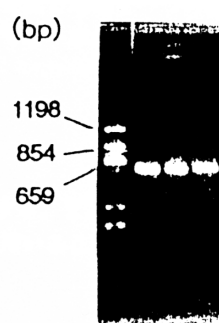


写真 1) Solid - Phase RT - PCR によるHLA - C 抗原遺伝子の増幅

お問合せは 日本総代理店

株式会社

**ベリタス**

〒105-0001 東京都港区虎ノ門 2-7-14 八洲ビル  
TEL( 03 )593-3211【代】 FAX( 03 )593-3216