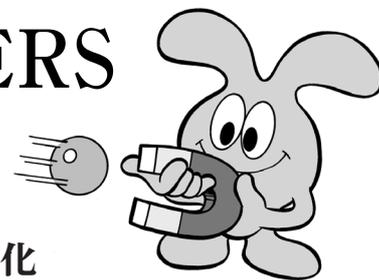


DYNABEADS LETTERS



RARGIP法によるDNAクローニングの効率化

熊本大学 医学部 遺伝発生医学研究施設
阿部訓也

1. はじめに

遺伝子のクローニングは、ライブラリーの作製、スクリーニングを必要とする煩雑な作業である。PCR(Polymerase Chain Reaction)は、直接目的のDNA断片を増幅する優れた方法だが、プライマーに挟まれた既知のDNA配列しか増やすことができない。Dynabeads M-280 Streptavidin を用いた、両者の利点を併せもつ高効率液相スクリーニング法、RARGIP(Random Access Retrieval of Genetic Information through modified PCR)法について述べたい。

2. 原理及び利点

ローンリンカーと呼ぶ¹⁾、リンカー・アダプターを両端に結合させたDNAとビオチン標識したプローブDNAを液相でハイブリダイズする。プローブと標的(target)DNAのハイブリッドを Dynabeads M-280 Streptavidin にて回収後、target DNAを増幅しクローニングする(図1)。したがってこの方法では通常のライブラリー作製を行う必要がなく、また通常のPCRのように配列特異的なプライマーも使用しない。さらに通常のPCR同様、微量材料からのクローニングが可能である。この際得られるDNA断片は、プローブ以外の配列も含み、通常のPCRに比し得られる情報が多い²⁾。

3. 方法

この方法は、genomic DNA、cDNA 双方のクローニングに適用可能だが、ここではcDNAの単離の例について述べたい。

RNA調製：cDNA合成のためのRNA試料中にgenomic DNAの混入が認められる場合は、RNase free DNaseによるRNA試料の前処理が必要である。

cDNA合成：cDNAの合成は、ごく普通の方法でよい。我々の用いる方法を以下に示す。

1st strand cDNA synthesis

total RNA (not poly(A)+selected)	100ng - 1 μ g
NotI-oligo(dT) primer adaptor (5'-AATTCGCGGCCGC(T) ₁₅ -3')	100ng
sterile H ₂ O	to 11 μ l

これを70℃で10分間加熱し、その後氷中に置く。

軽く遠心し、以下の試薬を加える。:

5 x buffer ^{a)}	4 μ l
0.1 M DTT	2 μ l
mixed dNTP stock (10 mM each)	1 μ l
H ₂ O	to 19 μ l
Super Script RTase (BRL)(200 u/ μ l)	1 μ l

42 ~ 45℃で1時間反応。

2nd strand synthesis

1st strand cDNA mix (20 μ l) に以下の試薬を加える。

10 x buffer ^{b)}	
1 mM β -NAD	10 μ l
0.1 M DTT	3 μ l
10 mM dNTPs	1.5 μ l
DNA polI (4 u/ μ l)	6 μ l
E. coli DNA ligase (40 u/ μ l)	1/2 μ l
RNase H (20 u/ μ l)	1/2 μ l
H ₂ O	to 100 μ l

12 °C で 2 時間、反応する。

1/2 μ l の T4 DNA polymerase (4 u/ μ l) を加え、12 °C で 10 分間、反応させる。凍結して保存できる。

ローンリンカーのリン酸化：

10 x buffer ^{c)}	5 μ l
each of linker oligomers ^{d)}	15 μ g
10 mM ATP	5 μ l
T4 polynucleotide kinase (10 u/ μ l)	4 μ l
H ₂ O	to 50 μ l

37 °C で 15 分間反応。

70 °C に加熱後、ゆっくり室温に戻す。-20 °C で保存可。

ローンリンカーのライゲーション：

10 x buffer ^{e)}	5 μ l
50% PEG6000	5 μ l
T4 DNA ligase (350 TAKARA units/ μ l ; equivalent to 2.8 Weiss unit/ μ l)	3 μ l
ローンリンカー	~ 1.5 μ g each
ds cDNA (先述の2本鎖cDNAの1/10量)	10 μ l
H ₂ O	to 50 μ l

16 °C で一晩反応。

過剰なリンカーの除去はCentricon 100を用いて行い、最終的に50 - 100 μ lになるように濃縮する。

ローンリンカーPCR(LL-PCR)法による増幅：

10 x PCR buffer ^{f)}	10 μ l
1.25 mM dNTPs	16 μ l
ローンリンカープライマー	100 pmol
Gene 32 protein (200 μ g/ μ l ; Ambion, Texas)	1 μ l
AmpliTAQ (5 μ g/ μ l ; Cetus)	0.5 μ l
lone linker linked DNA	
H ₂ O	to 100 μ l

これをDNA Thermal Cycler (Cetus)にて14回、増幅する(94 °C for 45 sec, 53 °C for 2 min, 72 °C for 7 min)

1/10量(10 μ l)の反応溶液を新しい反応溶液に加え100 μ l とし、同じ条件でさらに5回PCR増幅を行う。

プローブのビオチン標識 :

2本鎖DNAの場合 ; 筆者はBionick (BRL) Biotin-labelling kitsを使っている。
未反応のヌクレオチド等はCentricon 30 にて除去する。

オリゴヌクレオチド・プローブの場合 ; オリゴマーのビオチン標識は2つの方法がある。

ひとつは、オリゴマー合成時にAminolink-2 (Applied Bio Systems)等でオリゴマーの5'端を修飾し、その後、biotin-XX-NHS ester (Clontech) を反応させビオチン標識する方法である。この場合、反応効率が100%ではないので未反応のものを、変性ポリアクリルアミドゲルで除き目的のものを精製する必要がある(方法についてはMolecular Cloning ; Sambrook et al.等を参照)。

二番目は、ビオチン標識したphosphoramidite (Biotin-ON phosphoramidite, Clontech) を利用するもので、これを使えばオリゴマーの任意の位置にビオチンを取り込ませることができる。また反応効率が良いため恐らく精製は必要ないと思われる。

ローンリンカー結合DNAとビオチン標識プローブの液相でのハイブリダイゼーション :

プローブ及びcDNAの量はそれぞれ検討するべきで、特にcDNAの量はメッセージのabundancyによって加減する必要がある。例えば10 ngのプローブに対し、10-100 ng の範囲でLL-linked cDNAの量を調整している。また非特異的なDNAへの結合を防ぐため、Salmon sperm DNA や poly dI·dC等をハイブリダイゼーション・バッファーに加えておく。実際のハイブリダイゼーションは、プローブとcDNAを混ぜ、熱変性した後、100 μ lのハイブリダイゼーションバッファー*に加え、エッペンドルフチューブ内で、42 $^{\circ}$ Cで16時間インキュベートする(normal stringency の場合)。

オリゴマーをプローブとする場合は、3M tetramethyl ammonium chloride (TMA-Cl)、0.1M NaPO₄, pH 6.8、1 mM EDTA、5 x Denhardt's sol'n、0.6 % SDS 中で約2時間ハイブリダイゼーションする。

その際の温度はプローブの長さによって決定する。

* 50% formamide, 5 x SSPE, 0.1% SDS, 5 x Denhardt's

Dynabeads M-280 Streptavidin によるハイブリッドキャプチャー:

- 1) 10 mg/ml のDynabeads を1チューブあたり20 μ l使用する。必要な容量のビーズをエッペンドルフチューブに分注する。
- 2) Dynal MPC-E (magnetic particle concentrator)を利用し、ハイブリダイゼーション・バッファーで一度ビーズを洗う。
- 3) ビーズをSalmon sperm DNAを含むハイブリダイゼーション・バッファー中で 1 - 2 時間、室温でインキュベートする。プレハイブリダイゼーションの後、ビーズをprobe - cDNA solution に懸濁する。
- 4) 室温で 15 - 30分 インキュベートする。
- 5) ビーズを適当な条件で洗浄する(normal stringency の例 ; 1 x SSC, 0.1% SDS, 65 $^{\circ}$ C, 15 min x 2, 0.1 x SSC, 0.1 % SDS, 65 $^{\circ}$ C, 15 min x 2)
- 6) 最終的にビーズを 50 μ l の0.1 x SSC に懸濁する。
- 7) 90 $^{\circ}$ C, 2分、加熱する。
- 8) 上清中のDNA を集める。
- 9) LL - PCR によって増幅する**。

** 上清の 1/10 - 1/2 vol. のDNA 溶液をまず20 回増幅する。アガロース電気泳動で増幅をチェックする。何ら増幅が認められなければ、1/10 - 1/5 vol. の PCR産物を新たな反応溶液に加え2 度目の増幅を行う。

PCR 産物のクローニング :

PCR産物は、ローンリンカー中の restriction site を利用してプラスミドにクローニングする。目的の配列をもつDNA 断片が濃縮されているため、希少な cDNA でもごく少数のコロニーをスクリーニングするだけでポジティブクローンが得られる (Table 1)。

Table 1

	RARGIP	通常のスクリーニング法
Actin	436/445 (98%)	n.d.
Tctex 3	66/820 (8%)	none in 4×10^5
Tctex 7	230/610 (38%)	2 in 4×10^5

通常のライブラリースクリーニングでは 40 万のクローン中数個のポジティブしか得られなかったのに対し、この方法では小規模のスクリーニングで多数のポジティブが単離された。

4 . 応用

現在までこの方法を用いて、マウス初期胚や始原生殖細胞等の微量材料から多数 cDNA を単離している。また、プローブとして degenerate oligomer や通常の DNA 断片が利用できることを確認している。また直接コスミドクローン全体をプローブとしてクローン化ゲノム中の転写領域に対応する cDNA の単離にも成功している。この方法は汎用性に富み、アイデア次第でさらに広い領域に応用可能と思われる。

文献 :

- 1) Ko, M.S.H., Ko, S.B.H., Takahashi, N., Nishiguchi, K. and Abe, K. (1990) Unbiased amplification of a highly complex mixture of DNA fragments by 'lone linker' - tagged PCR . *Nucleic Acids Research* 18, 4293-4294.
- 2) Abe, K. (1992) Rapid isolation of desired sequences from lone linker PCR amplified cDNA mixtures : application to identification and recovery of expressed sequences in cloned genomic DNA . *Mammalian Genome* 2, 252-259.

^{a)}250 mM Tris-Cl, pH 8.3
375 mM KCl
15 mM MgCl₂

^{b)}500 mM Tris-Cl, pH 7.6
1 M KCl
50 mM MgCl₂
100 mM (NH₄)₂SO₄

^{c)}500 mM Tris-Cl, pH 7.6
100 mM MgCl₂
50 mM DTT
1 mM Spermidine
1 mM EDTA

^{d)} ローリンリンカーの配列

LL-SalIA 5'-pATTGAC GTCGAC TATCCAGG-3'

LL-SalIB 3'-CTG CAGCTG ATAGGTCCp-5'

Sal I

^{e)} 66 mM Tris-Cl, pH 7.6

10 mM MgCl₂

10 mM DTT

0.3 mM ATP

1 mM Spermidine

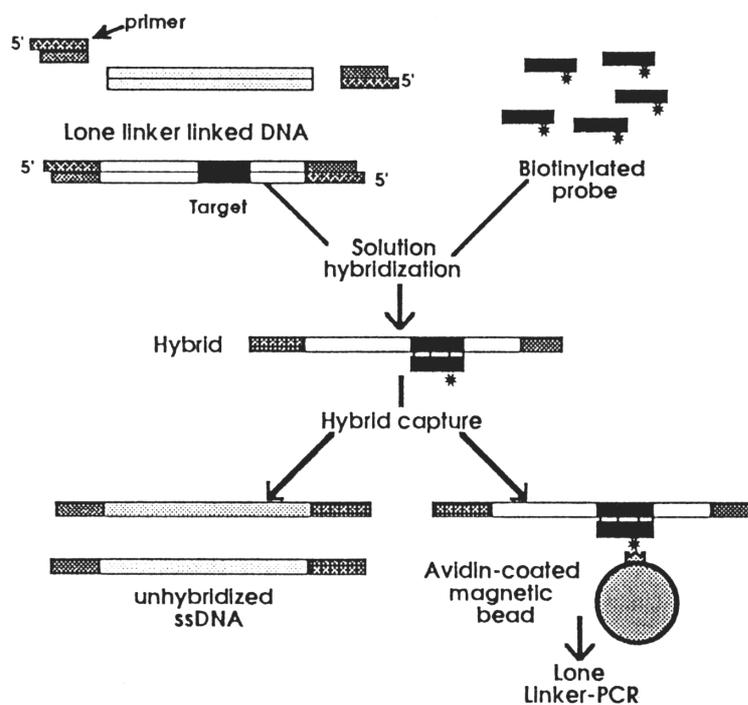
^{f)} 100 mM Tris-Cl, pH 8.3

500 mM KCl

25 mM MgCl₂

100 mM β-mercaptoethanol

0.1% gelatin



お問い合わせは 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) 3593-3211 [代] FAX (03) 3593-3216