
Cap Site cDNA[®] Manual

~ Human, Mouse, Rat, Chicken 用 ~

第 2 版

NIPPON GENE

目次

| | |
|--|------|
| 製品説明 | p.2 |
| 内容 | p.3 |
| 保存 | p.3 |
| Cap Site cDNA®を用いた Cap Site® Hunting | p.4 |
| Appendix | p.11 |
| Q&A | p.13 |
| 参考文献 | p.16 |
| 製品一覧 | p.17 |
| 関連製品 | p.18 |

本品は試験研究用試薬ですので、医薬品、その他の目的にはご使用になれません。
また、試薬についての基本的な知識のある方以外は取り扱いしないでください。

製品説明

Cap Site cDNA[®]は、真核生物の mRNA の 5'末端に特徴的に存在するキャップ構造を合成オリゴヌクレオチドで置換した後、ランダムプライマーを用いて逆転写反応を行って得た第一鎖 cDNA ライブラリーである。

真核生物の mRNA の 5'末端はキャップ(m⁷Gppp)と呼ばれる特徴的構造をもっている。このキャップ構造は転写開始点(transcription start point:TSP,別名 Cap Site とも呼ばれている)の塩基に転写後かなり早い段階で酵素的な修飾により形成される。タバコ酸性ピロホスファターゼ(Tabacco Acid Pyrophosphatase:TAP)は、このキャップ構造を特異的に開裂する。そこで、まず高純度に精製した TAP によって、キャップ構造を開裂して生じる 5'末端りん酸残基と特別に設計した合成オリゴヌクレオチド(rOligo;注 1)を、RNA リガーゼによって連結する。これを鋳型として、ランダムプライマーを用いて M-MLV 逆転写酵素によって第一鎖 cDNA を合成する。^{1)~5)}このようにして得られた cDNA は、mRNA の 5'末端側の情報に富んだ cDNA ライブラリーである。

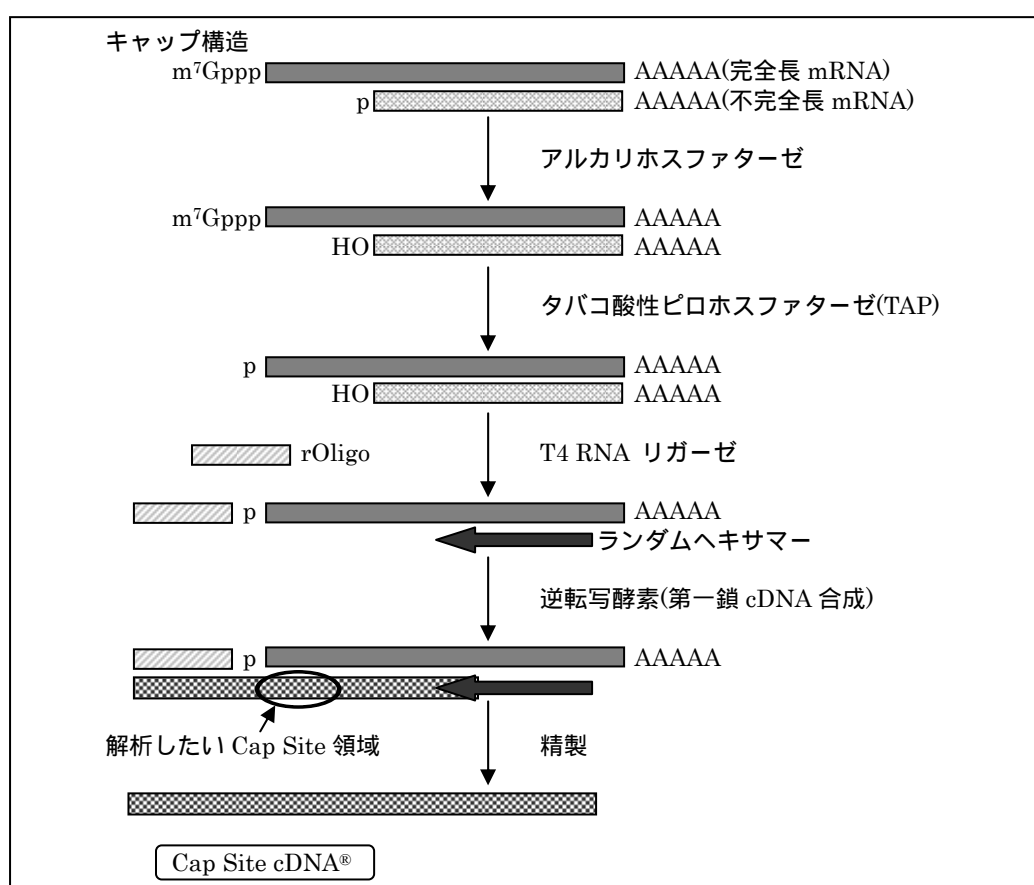


図1 Cap Site cDNA[®]作製の原理

Cap Site cDNA[®]を用いて高い効率で転写開始点を含む領域をクローニングし、その配列を決定することができる。この場合、Cap Site cDNA[®]を鋳型として rOligo 相補的配列部分に特異的なプライマー(添付)と、解析したい目的遺伝子に特異的なアンチセンスプライマーを用いて PCR を行う。この方法を CapSite[®] Hunting と呼ぶ(詳細は 章参照)。CapSite[®] Hunting はゲノム解析における発現遺伝子の転写開始点のマッピングや正確なコーディング領域の決定に有効な方法である。

注 1) 合成オリゴヌクレオチド(rOligo)の配列については「 Appendix 1」を参照。

内容

- | | | |
|----|--|--------|
| 1. | Cap Site cDNA [®] 25ng の poly(A)+RNA を鋳型として調製したもの | 10 μl |
| 2. | 1RC Primer(10 μM) Cap Site cDNA [®] の rOligo 相補的配列部分に特異的なプライマー1(全種類共通) | 100 μl |
| 3. | 2RC Primer(10 μM) Cap Site cDNA [®] の rOligo 相補的配列部分に特異的なプライマー2(全種類共通) | 100 μl |
| 4. | Control Primer1(10 μM) コントロール遺伝子特異的なプライマー1 | 10 μl |
| 5. | Control Primer2(10 μM) コントロール遺伝子特異的なプライマー2 | 10 μl |
| 6. | マニュアル | |

《添付プライマーの塩基配列》

1RC Primer

5'...CAAGGTACGCCACAGCGTATG...3'

2RC Primer

5'...GTACGCCACAGCGTATGATGC...3'

* Control Primer1,Control Primer2 の塩基配列は、各製品に添付されている能書に記載されています。

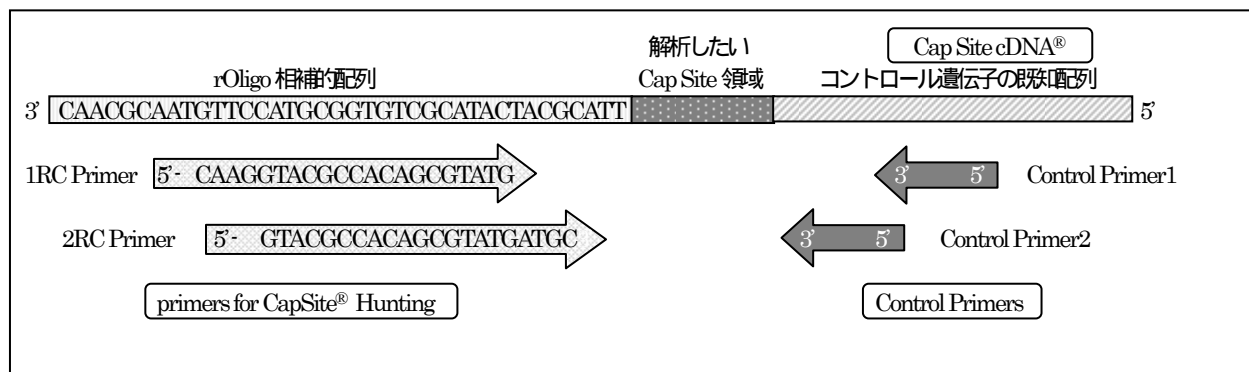


図2 Cap Site cDNA[®]とプライマーの位置関係

保存

- 20

* 不要な凍結解凍の繰り返しは避けてください。

Cap Site cDNA[®]を用いた CapSite[®] Hunting

1. Cap Site cDNA[®]を用いた CapSite[®] Hunting ガイド

(CapSite[®]Hunting を行う前に必ずお読みください。)

1) Cap Site cDNA[®]の製品コンセプトと CapSite[®] Hunting を行う際の考え方

Cap Site cDNA[®]は、mRNA の 5'末端のキャップ構造を合成オリゴリボヌクレオチド(rOligo)に置換後、ランダムプライマーを用いて逆転写して合成した第一鎖 cDNA であるため、mRNA 由来の 5'末端配列を特異的に検出するようにデザインされている。従って、

mRNA の 5'末端を正確に解析することを目的としているため、この製品で mRNA の 3'末端配列情報を得ることは不可能である。

Cap Site 配列を得る目的で行う PCR(CS-PCR)の成否は、目的遺伝子の発現量やその増幅サイズに依存する。CS-PCR による増幅サイズは 500bp 以下にすることが大切である。

また、Cap Site cDNA[®]を用いた CapSite[®] Hunting を行うには次のような注意が必要である。

必ず nested PCR を行う。使用するプライマーによっては 1st PCR のときにミスアニ-リングに起因する増幅産物が観察される。発現量が多くないのに 1st PCR で増幅産物が検出される場合は、発現量の多い遺伝子にミスアニ-リングしていることがある。そこで、目的遺伝子の特異的に増幅する目的で nested PCR を行うのである。従って、ノーザン解析の結果、発現が確認されている場合でも、少なくとも 2 本のプライマー(TGP1 及び TGP2)を設計することが必要である。目的遺伝子に対する情報が少ない場合には、6 本程度のプライマーを設計し、組み合わせて nested PCR を行う。この場合、増幅サイズが 500bp 以下になる ように設計することが大切である。

ノーザン解析で発現が確認されない場合、発現量が低いと予想される場合、GC 含量が高いことがわかっている場合、さらに上流の Cap Site 領域までの距離が推定できない場合は、CapSite[®] Hunting で特異的な増幅産物を得ることは困難であると予想される。このような場合は、プライマー設計が非常に重要である。次の「2)プライマー設計の条件」に、添付の rOligo 相補的配列部分に特異的なプライマー(1RC 及び 2RC)と組み合わせて PCR を行った際に、高い効率で増幅することが確認されたプライマー(TGP)の設計基準を示す。

CS-PCR の特異性を高めるために”hot start”法を行うことは非常に有効である^{6)~8)}。

2) プライマー設計の条件

Cap Site cDNA[®]を用いた Cap Site[®] Hunting で使用するプライマーの位置関係を図 3 に示す。ここで、TGP-Sense は目的遺伝子のセンスプライマーで、これと TGP2 との組合せで得られる増幅バンドがポジティブコントロールとなるので、同時に合成することを推奨する。

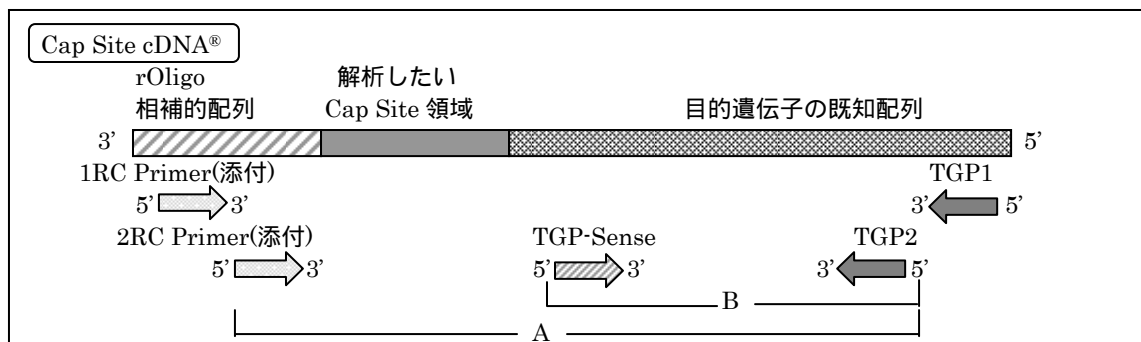


図3 CapSite® Hunting で使用するプライマーの位置関係

1RC Primer, 2RC Primer :

Cap Site cDNA®のrOligo 相補的配列部分に特異的なプライマーで、製品に添付されている。

TGP1, TGP2 :

目的遺伝子特異的プライマー(target-gene specific primer)で、遺伝子のアンチセンス鎖である。

実験前に準備が必要である。

TGP-Sense :

目的遺伝子特異的プライマー(target-gene specific primer)で、遺伝子のセンス鎖である。nested PCR のポジティブコントロールとなるので、合成し、実験系に入れることを推奨する。

また、nested PCR 後の理想的な電気泳動像は図4のようになる。

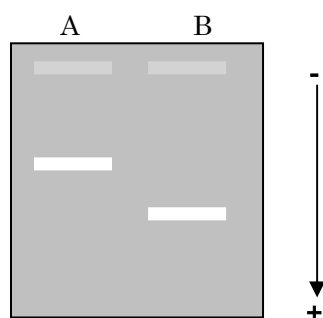


図4 図3A、Bの電気泳動像

目的遺伝子特異的プライマー(TGP)の設計条件は次の通りである。

プライマー長 : 20~22bp

T_m : 62~66

3'末端塩基 : GあるいはC

また、合成するプライマーの本数は、目的遺伝子の情報が豊富な場合で少なくとも2本、情報が少ない場合は6本程度必要である。複数のプライマーを色々組み合わせてnested PCR する。

3) CS-PCR の条件

本マニュアルでの PCR は、全て耐熱性酵素として Gene *Taq* NT を使用している。従って、これ以外の耐熱性酵素を使用する場合には条件、特に伸長反応時間を検討する必要がある。

伸長時間を必要以上に長くすると非特異的な増幅が観察される場合がある。ロング PCR を目的とした耐熱性酵素を使用する場合には、伸長時間を短くする必要があるかもしれない。PCR は通常、以下の設定で行う。

【1st PCR】

| | | | |
|--------|----|-----|-----------|
| 熱変性 | 95 | 5分 | |
| 熱変性 | 95 | 20秒 | } 35 サイクル |
| アニーリング | 60 | 20秒 | |
| 伸長反応 | 72 | 20秒 | |
| 伸長反応 | 72 | 5分 | |

【nested PCR】

| | | | |
|--------|----|-----|-----------|
| 熱変性 | 95 | 5分 | |
| 熱変性 | 95 | 20秒 | } 25 サイクル |
| アニーリング | 60 | 20秒 | |
| 伸長反応 | 72 | 20秒 | |
| 伸長反応 | 72 | 5分 | |

反応を行う直前まで、反応溶液は氷上に置き、ミスアニーリングによるミスリーディングを極力抑える必要がある。サーマルサイクラーが 95 に達したところで、反応チューブをセットして反応を開始する。特異性を高めるために、"hot start"法は非常に有効である。^{6)~8)}

2. Cap Site cDNA®を用いた CapSite® Hunting の例

1) 準備

以下のものを準備する。

Cap Site cDNA®

1RC Primer

Cap Site cDNA®の rOligo 相補的配列部分に特異的なプライマーで、製品に添付されている。1st PCR に用いる。

2RC Primer

Cap Site cDNA®の rOligo 相補的配列部分に特異的なプライマーで、製品に添付されている。nested PCR に用いる。

耐熱性 DNA ポリメラーゼ

本マニュアルではニッポンジーンの Gene *Taq* NT を用いている。Gene *Taq* NT 以外のポリメラーゼを使用する場合は、PCR 条件の最適化の検討が必要になることがある。

PCR 反応バッファー

Gene *Taq* NT を使用する場合は、10× Gene *Taq* Universal Buffer が添付されている。

dNTP 混合液

Gene *Taq* NT を使用する場合は、dNTP Mixture (2.5mM each) が添付されている。

0.2ml thin-wall PCR 用チューブ

0.5ml 容量のチューブを使用する場合は、PCR 条件の最適化の検討が必要になることがある。

50%グリセロール水溶液

PCR 反応に添加する。ポリメラーゼの安定性を高める。

解析したい目的遺伝子特異的なプライマー(target-gene specific primer: TGP)

CapSite® Hunting したい遺伝子の一部からアンチセンスプライマーを設計する。nested PCR が必要であるため、少なくとも 2 本のプライマーを準備する。精製品を使用した方が、Cap Site 領域を得る確率が高い。

(「2) プライマー設計の条件」参照)

コントロールプライマー

製品ごとにコントロールとなる遺伝子を選定し(製品に添付されている能書を参照)、その遺伝子に特異的なプライマーをコントロールプライマーとして製品に添付している。ポジティブコントロールとして用いる。

TE バッファー(pH8.0)

10mM Tris-HCl(pH8.0), 1mM EDTA または d.d H₂O

2) プライマーの設計

CapSite® Hunting に用いる解析したい目的遺伝子特異的なプライマー(target-gene specific primer: TGP)は、アンチセンス鎖の配列の一部から設計する。PCR 産物の長さが 500bp 以下になるようにする。300~500bp が適当である。1st PCR と nested PCR のための 2 つのプライマーを準備する。通常、長さは 20~22 塩基、T_m 値は 62~66 になるように設計する(T_m 値の計算は、 $T_m = 4 \times (G+C) + 2 \times (A+T)$ の簡便法により計算する)。さらに 3' 末端塩基を G あるいは C にするとよい。目的遺伝子の情報にもよるが、6 本程度のプライマーを合成することを勧める。

プライマー濃度は、10 μM になるように調製する。濃度は次の簡便法にて計算することができる。

$$\text{プライマー濃度}(\mu\text{M}) = \frac{\text{溶液の } A_{230}}{\text{プライマーの塩基数}} \times 100$$

例えば 20mer のプライマーの場合は、 $A_{230} = 14.5$ なら、 $14.5 / 20 \times 100 = 72.5(\mu\text{M})$ となる。

3) 反応例

Cap Site cDNA® 1 μl に TE バッファーまたは d.d H₂O 9 μl を加えて 10 倍に希釈する。残りは -20 °C で保存する。

* 10 倍希釈の Cap Site cDNA® で目的遺伝子が検出されない場合には、原液を用いてもよい。

【1st PCR】

0.2ml thin-wall チューブに、次の通り反応液をセットする。操作は全て氷上で行う。

| チューブ番号 | 1 (CS-PCR) | 2. (control) | 3 (control) | 4 (control) |
|--------------------------------------|---------------|-----------------|----------------|----------------|
| Cap Site cDNA® | 1.0 µl | 1.0 µl | 1.0 µl | 1.0 µl |
| 10× Gene <i>Taq</i> Universal Buffer | 5.0 | 5.0 | 5.0 | 5.0 |
| 2.5mM dNTP Mixture | 4.0 | 4.0 | 4.0 | 4.0 |
| 50%Glycerol | 5.0 | 5.0 | 5.0 | 5.0 |
| 1RC Primer(10 µM) | 2.5 | - | - | 2.5 |
| TGP1(10 µM) | 2.5 | 2.5 | - | - |
| TGP2(10 µM) | - | - | 2.5 | - |
| Control Primer1(10 µM) | - | - | - | 2.5 |
| d.d H ₂ O | 29.5 | 32.0 | 32.0 | 29.5 |
| Gene <i>Taq</i> NT (5units/µl) | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 |
| 合計 | 50.0 µl | 50.0 µl | 50.0 µl | 50.0 µl |

* Gene *Taq*NT は最後に添加する。

** チューブ番号1は、目的遺伝子の Cap Site 領域を増幅するための反応である。

チューブ番号2及び3は、プライマー1本だけの反応で、非特異的な増幅を検査するものである(バンドは検出されない)。

チューブ番号4はポジティブコントロールである。

次のプログラムより PCR を行う。

| | | | |
|--------|----|-----|-----------|
| 熱変性 | 95 | 5分 | |
| 熱変性 | 95 | 20秒 | } 35 サイクル |
| アニーリング | 60 | 20秒 | |
| 伸長反応 | 72 | 20秒 | |
| 伸長反応 | 72 | 5分 | |

* PCR 条件は、Gene *Taq*NT 及び Perkin-Elmer DNA Thermal Cycler2400 を用いた場合の標準的な条件である。目的遺伝子の発現量、遺伝子特異的プライマー、使用する耐熱性 DNA ポリメラーゼ等によって、PCR 条件を最適化する必要がある。ロング PCR を目的とした耐熱性酵素を使用する場合は、伸長時間を短くする必要があるかもしれない。さらに、ミネラルオイルを添加する PCR の場合も、熱伝導性が悪いため最適化が必要となる。"hot start"法は非常に有効である。^{6)~8)}

反応液の5~10 µl をアガロースゲル電気泳動し、増幅度を検査する。

チューブ番号2と3は、プライマー1本だけの反応で、非特異的な増幅を検査するものであり、バンドは検出されない。

チューブ番号4はポジティブコントロールである。通常この時点ではバンドは検出されないことが多い(nested PCR を行った場合に検出される)が、この時点で検出されることもある。

チューブ番号1に明瞭な PCR 産物が検出された場合は、クローニングし、塩基配列決定を行ってもよい。しかし、通常は特異性を上げるために次の nested PCR を続けて行う。

この時の電気泳動の結果は、次の nested PCR がうまくいかなない時の参考になる場合があるので保管しておく。

【nested PCR】

0.2ml thin-wall PCR用チューブに反応液をセットする。チューブ番号1及び4のPCR産物の1/50~1/100量を用いることになる。操作は全て氷上で行う。

| チューブ番号 | 1' (CS-PCR) | 4' (control) |
|--|-----------------|-----------------|
| 1st PCR 産物 | 0.5~1.0 μ l | 0.5~1.0 μ l |
| 10 \times Gene <i>Taq</i> Universal Buffer | 5.0 | 5.0 |
| 2.5mM dNTP Mixture | 4.0 | 4.0 |
| 50%Glycerol | 5.0 | 5.0 |
| 2RC Primer(10 μ M) | 2.5 | 2.5 |
| TGP2(10 μ M) | 2.5 | - |
| Control Primer2(10 μ M) | - | 2.5 |
| d.d H ₂ O | 30.0~29.5 | 30.0~29.5 |
| Gene <i>Taq</i> NT(5units/ μ l) | 0.5 | 0.5 |
| 合計 | 50.0 μ l | 50.0 μ l |

- * チューブ番号1'は、目的遺伝子の Cap Site 領域を増幅するための反応である。チューブ番号4'は、ポジティブコントロールである(増幅バンドが検出される)。

次のプログラムより PCR を行う。

| | | | |
|--------|----|-----|-----------|
| 熱変性 | 95 | 5分 | |
| 熱変性 | 95 | 20秒 | } 25 サイクル |
| アニーリング | 60 | 20秒 | |
| 伸長反応 | 72 | 20秒 | |
| 伸長反応 | 72 | 5分 | |

反応液の5~10 μ l をアガロース電気泳動する。チューブ番号1'で検出されたPCR産物は、クローニングし、塩基配列を決定する。(アガロースについては「 Appendix 2」、クローニングについては「 Appendix 3」を参照)

4) Control Primer を用いた CapSite® Hunting 例

以下は本品に添付している Control Primer を用いて、コントロール遺伝子の CapSite® Hunting を行った結果である。コントロール遺伝子は以下のとおりである。PCR 条件は、本マニュアル 6 ページの 3)反応例に従った。lane 2 は Control Primer2 及び rOligo 相補的配列部分に特異的である 2RC Primer を用いた nested PCR(本マニュアル 7 ページの チューブ番号 4'に相当)である。lane 3 はコントロール遺伝子特異的プライマーのアンチセンス鎖として Control Primer2、センス鎖としてコントロール遺伝子の翻訳開始点付近に設計した Control Primer-Sense を用いた PCR である。Lane 3 は Lane 2 のポジティブコントロールに相当する。

コントロール遺伝子： Human Testis -アクチン
 Mouse Testis -アクチン
 Rat Brain -アクチン
 Chicken Skeletal Muscle -アクチン

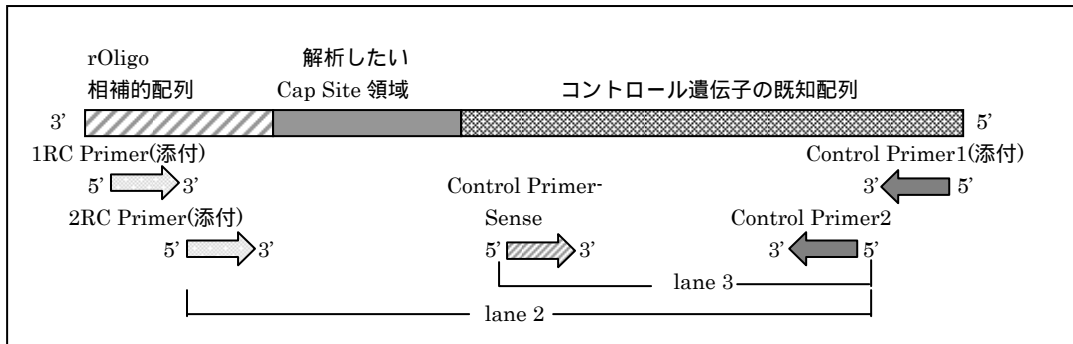
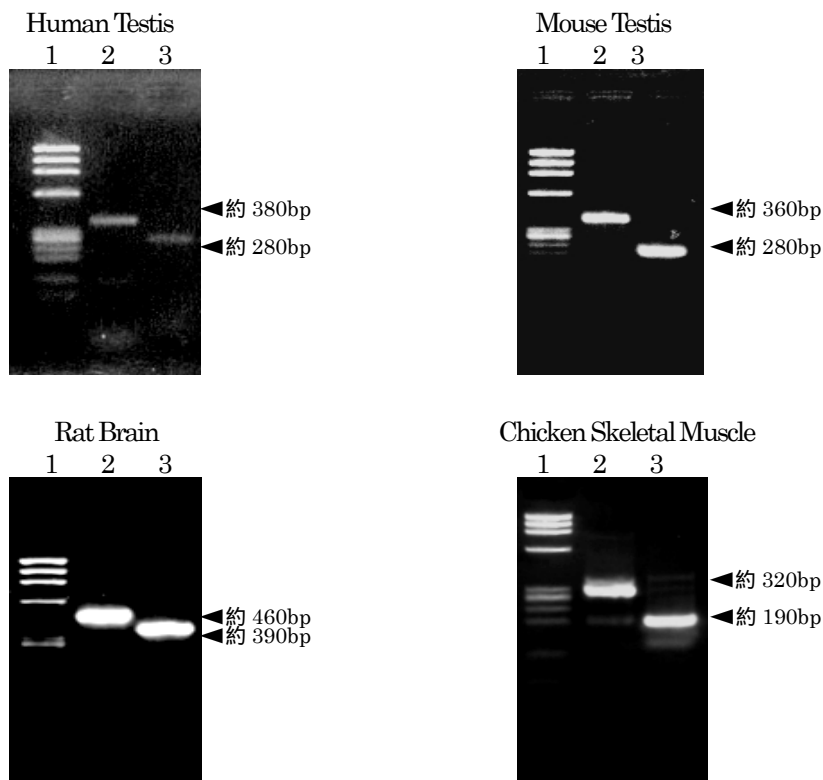


図5 プライマーの位置関係



lane 1 Marker4 (X174/Hae)
 lane 2 2RC Primer と Control Primer2 を用いた nested PCR
 lane 3 Control Primer-Sense と Control Primer2 を用いた PCR
 3% Agarose 21
 PCR 産物の 1/10 量(5 μl)を電気泳動

5) トラブルシューティング

| トラブル | 対策 |
|--------------|--|
| ・増幅しない | <ul style="list-style-type: none"> ・ PCR プログラムのアニーリング温度を下げる。 ・ PCR プログラムの伸長時間を延ばす。 ・ TGP 配列を変える。 ・ 耐熱性 DNA ポリメラーゼを変える。 ・ ポジティブコントロールも増幅しない場合は、耐熱性 DNA ポリメラーゼ、緩衝液、dNTP 等を新しいものに変える。 ・ プライマー1本での PCR において増幅しないのは正常であり、トラブルではない。 ・ 目的遺伝子の発現量が非常に少ないことが考えられる。この場合には、Cap Site cDNA[®]を希釈せずに(原液のまま)使用する。 |
| ・非特異的増幅が見られる | <ul style="list-style-type: none"> ・ TGP 濃度を確認する。(1A²⁶⁰=33 μg で計算する) ・ プライマー濃度を半分にする。 ・ Cap Site cDNA[®]をさらに 10~100 倍希釈する。 ・ PCR プログラムのアニーリング温度を上げる。 ・ TGP の配列を変える。 ・ 耐熱性 DNA ポリメラーゼを変える。 ・ 耐熱性 DNA ポリメラーゼの添加量を半分に減らす。 |

Appendix

1. rOligo の配列

rOligo の配列は、特異性の高い PCR を行うために、以下の点を考慮して設計した。

1) cDNA の配列に出現する頻度の少ない配列であること。

ある配列が cDNA 中にどの程度の頻度で出現するかを予想することは容易ではなく、RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA)解析に用いられる 10mer の配列等も経験的に決定されている。そこで、ニッポンジーンでは、次のような基準に基づいて 450 本の 10mer を設計した。

GC 含量が 50%であること。

3'末端が G または C であること。

2 塩基以上のパルンドローム配列を持たないこと。

真核生物の配列データ中の出現頻度を、ギャップを考慮したホモロジー検索法で得られたスコアから算出し、450 本を出現頻度の低いものから順に整列させた。この結果から、出現頻度が低いと思われる配列を選んだ。

- 2) T4 RNA リガーゼによって、効率よく 5'末端りん酸残基と結合する 3'末端を持つこと。
3'末端配列の異なるオリゴヌクレオチドを合成し、実際に RNA リガーゼによって TAP 処理後の mRNA と連結し、その効率の高い配列を選んだ。
- 3) nested PCR がおこなえること。
互いに重複する 3 本程度のプライマー設計ができる長さを選んだ。

2. アガロースゲル電気泳動

CapSite® Hunting のプロトコルで行うアガロースゲル電気泳動では、バンドより抽出した DNA を再び増幅したり、ベクターに結合させる必要がある。このためには、目的バンドの十分な分離と抽出 DNA の損傷を最低限に抑えなければならない。そこで、1mM グアノシン存在下で Agarose21 を用いた電気泳動を紹介する。グアノシンは、DNA 断片の検出に使用するときの紫外線照射による DNA 損傷を抑えるために添加する。また、Agarose21 は低分子 DNA(0.01~1.0kbp)の分離能が高く、抽出 DNA 断片は PCR のよい基質として使用できる。以下に、アガロースゲル電気泳動のプロトコルを示す

- 1) 3%になるように Agarose21 を 1mM グアノシンを含む 1×TAE に加え、加熱溶解した後、ゲルトレイ上で固化させる。
- 2) 1mM グアノシンを含む 1×TAE を緩衝液として、PCR 産物を電気泳動する。
- 3) 電気泳動後、SYBR® Green (直前に 1×TAE にて 10,000 倍に希釈する)またエチジウムブロミド溶液に約 10 分間浸す。
- 4) ゲルをトランスイルミネーター(UV)上に置き、DNA バンドを観察する。明瞭なバンドが得られた場合は、残りの PCR 産物をクローニングするが、複数のバンドが観察されたり、バンドが微量な場合は、目的のバンドをピペットチップの先端で採取し、得られたアガロース片を 10 µl の TE に懸濁し、激しく攪拌した後軽く遠心する。上清 1~3 µl を用いて、再 PCR あるいは nested PCR を行う。
- 5) 増幅 DNA 断片をクローニングして、塩基配列を決定する。

3. PCR 産物のクローニング

興味ある PCR 産物がアガロース電気泳動で得られれば、クローニングして塩基配列の決定を行うことになる。PCR 産物には直接”T-ベクター”にクローニングするか、PCR 産物の末端を酵素的に平滑化して、同様に平滑化したベクターにクローニングするのが一般的である。DNA 断片を酵素的に平滑化する目的に使用される T4 DNA ポリメラーゼは、3'-5'エキソヌクレアーゼの活性が高く効率よい平滑化が可能だが、末端を削るといわれている。しかしながら、Cap Site cDNA®では rOligo が末端欠損にたいしての緩衝帯となるので、Cap Site を同定する目的には影響しない。

Q&A

Q1 Cap Site cDNA®とは何ですか。

A1 Cap Site cDNA®は、真核生物の mRNA の 5'末端に特徴的に存在するキャップ構造を合成オリゴリボヌクレオチドで置換した後、ランダムプライマーを用いて逆転写反応を行って得た第一鎖 cDNA で、mRNA の 5'末端側の情報に富んだ cDNA ライブラリーです。よく勘違いされますが、

Cap Site cDNA®は cDNA 調製用キットではありません。ですから、本品を用いてお客様のお手持ちの RNA から cDNA を合成することはできません。

プラスミドベクター等と連結したライブラリーではありません。ですから、本品をそのまま大腸菌に導入することは出来ません。

ランダムプライマーを用いて逆転写していますので、完全長 cDNA ライブラリーではありません。一本鎖 DNA です。二本鎖 DNA ではありません。

Q2 Cap Site cDNA®はどのように調製したのですか。

A2 真核生物の mRNA の 5'末端にはキャップ(m⁷Gppp)と呼ばれる特徴的構造が存在します。このキャップ構造は転写開始点のヌクレオチドに、転写後かなり早い段階で酵素的修飾により形成されます。タバコ酸性ピロフォスファターゼ(TAP)は、このキャップ構造(ピロリン酸結合)を特異的に開裂します。最初にアルカリホスファターゼによりキャップ構造をもたない RNA の 5'末端りん酸残基を除去します。次に、高純度に精製した TAP によってキャップ構造(ピロリン酸結合)を開裂して 5'末端りん酸残基を生じさせます。この 5'末端りん酸残基に、RNA リガーゼを使用して、特別に設計した合成オリゴヌクレオチドを連結します。これを鋳型としてランダムプライマーを用い、M-MLV 逆転写酵素によって cDNA を合成します。(p.2 図 1Cap Site cDNA®作製の原理 参照)こうして合成された第一鎖 cDNA ライブラリーが本品です。この調製方法は「オリゴキャッピング法」を改良したものです。

Q3 Cap Site cDNA®はどのような時に使うのですか。

A3 遺伝子の転写開始点を決定するときに使います。転写開始点を決定する方法としてプライマー伸長法と S1 マッピング法がありますが、これらの方法では発現量が多い遺伝子しか解析できません。Cap Site cDNA®を用いると、発現量の少ない遺伝子でも転写開始点を決定することが出来ます。また、5'RACE 法で転写開始点を捕らえようとするもありますが、たいていの場合は転写開始点の近くまでしか解析できません。Cap Site 領域を特異的に検出するようにデザインされている Cap Site cDNA®は、転写開始点の決定に有力な武器となります。

Q4 Cap Site cDNA®のパッケージには何が入っているのですか。

A4 マイクロチューブが 5 本入っています。1 本は Cap Site cDNA®で、他 4 本は PCR 用プライマーです。4 本のプライマーのうち 2 本は rOligo 相補的配列部分に特異的なプライマー(1RC,2RC Primer)で、お客様が作製した目的遺伝子に特異的なプライマー(target-gene specific primer:TGP)と組み合わせて使用することにより CapSite® Hunting を行うことができます。残り 2 本は製品ごとに選定したコントロールとなる遺伝子に特

異的なプライマー(Control Primer1,2)で、実験のポジティブコントロールとして使用します。これらの試薬が入ったパッケージとは別に詳細なマニュアルが添付されています。Taq DNA Polymerase 等の酵素は入っておりませんので、別途ご用意ください。ニッポンジーンでは Gene Taq NT を用いた PCR をお勧めします。

| | |
|-----------------|------------|
| Cap Site cDNA® | 1本(10 µl) |
| 1RC Primer | 1本(100 µl) |
| 2RC Primer | 1本(100 µl) |
| Control Primer1 | 1本(10 µl) |
| Control Primer2 | 1本(10 µl) |
| マニュアル | |

Q5 Cap Site cDNA®はどのように使うのですか。

A5 まず目的の遺伝子に特異的なプライマー(TGP1,2)をお客さまに作製していただきます。このプライマーと添付の rOligo 相補的配列部分に特異的なプライマー(1RC,2RC Primer)を組み合わせる PCR を行います。PCR に必要な Taq DNA Polymerase 等の酵素は含まれておりませんので、別途ご用意下さい。ニッポンジーンでは Gene Taq NT を用いた PCR をお勧めします。(p.4 図 3 CapSite® Hunting で使用するプライマーの位置関係参照)

Q6 マニュアルでは Gene Taq NT が使用されていますが、他の耐熱性ポリメラーゼは使用できますか。

A6 マニュアルの反応例では Gene Taq NT を使用した場合は標準としています。Cap Site cDNA®に関するデータも Gene Taq NT を使用して得たものです。他の耐熱性ポリメラーゼを使用することもできますが、その場合には PCR 条件を十分に検討する必要があります。ニッポンジーンでは Gene Taq NT をご使用になることをお勧めします。

Q7 Cap Site cDNA®を用いて何回の PCR が行えますか。

A7 通常は Cap Site cDNA®の原液を 10 倍希釈して使用しますが、この場合は 100 回の PCR が行えます。発現量の少ない遺伝子の解析には原液を使用することがあり、この場合には使用回数が少なくなります。

Q8 目的の Cap Site 領域を増幅できない、または非特異的な増幅がおこるのですが。

A8 (1)予想される増幅サイズが 500bp を越える場合、増幅しにくくなったり、あるいは非特異的な増幅が起こりやすくなります。増幅サイズが長くなるほどこのような現象が生じやすくなり、ポジティブコントロールとして使用している α -アクチン遺伝子では、1kb を越えた場合全く増幅しなくなります。下記の方法を用いることにより増幅が可能となる場合があります。

増幅サイズ 500bp 以下になるように目的遺伝子に特異的なプライマー(TGP1,2)を設計しなおしてください。予想される増幅サイズが長い、あるいは不明である場合は、5'RACE やプライマー伸長法等によって可能な限り 5'末端近傍まで配列を同定し、得られたデータをもとに目的遺伝子に特異的なプライマー(TGP1,2)を設計しなおしてください。

(2)目的の増幅産物のサイズが 500bp 以下であると予想される場合、下記の方法を用いることにより増幅が可能となる場合があります。

Cap Site cDNA®を 10 倍希釈して使用しますが、増幅しない場合には希釈せずに原液のまま、非特異的な増幅が見られる場合には原液を 100~1000 倍に希釈して使用してみてください。

目的遺伝子特異的なプライマー(TGP1,2)の再検討。

Cap Site cDNA®を使用した CapSite® Hunting では nested PCR を行うことを前提としています。これは使用するプライマーによって 1st PCR 時にミスアニーリングに起因する増幅産物が観察されることがあるためです。発現量が多くない遺伝子の CapSite® Hunting で 1st PCR 時に増幅産物が検出される場合は、発現量の多い遺伝子にミスアニーリングしている可能性があります。目的遺伝子特異的なプライマーは、ノーザン解析で発現が確認されている場合で少なくとも 2 本、情報が少ない遺伝子の場合にはできれば 6 本程度設計し、組み合わせて nested PCR を行ってみてください。また、ノーザン解析で発現が確認されない場合、発現量が低いと予想される場合、GC 含量が高いことがわかっている場合、さらに上流の Cap Site までの距離が推定できない場合は、Cap Site® Hunting で特異的な増幅産物を得ることは困難であると予想されます。このような場合には、目的遺伝子に特異的なプライマー(TGP1,2)の設計が非常に重要です。目的遺伝子に特異的なプライマー(TGP1,2)を設計する際のガイドライン等については、本マニュアルをご参照ください。

PCR に使用する耐熱性ポリメラーゼの変更。

耐熱性ポリメラーゼの種類によっては、非特異的な増幅が起こりやすい場合があります。ニッポンジーンでは Gene Taq NT を使用することをお勧めします。

PCR 条件の変更。

増幅サイズが 500bp 以下であるため、それに適した条件で PCR を行うことが必要です。また、目的遺伝子に特異的なプライマー(TGP1,2)を変更したり、耐熱性ポリメラーゼの変更がある場合には、反応条件を再検討する必要があります。

参考文献

- 1) Maruyama,K. and Sugano,S.:*Gene*,138,171-174(1994)
- 2) 丸山和夫,菅野純夫:実験医学,11(18),2491-2495(1993)
- 3) 丸山和夫,菅野純夫:バイオマニュアルシリーズ 2(実験医学別冊)「遺伝子ライブラリーの作製法」(羊土社),106-123(1994)
- 4) 鈴木穰,菅野純夫:蛋白質 核酸 酵素,41(5),603-607(1996)
- 5) Schaefer,B.C.:*Anal.Biochem.*,227,255-273(1995)
- 6) D'Aquila,R.T.,Bechtel,L.J.,Videler,J.A.,Eron,J.J.,Gorczyca,P. and Kaplan,J.C.:*Nucleic Acids Res.*,19,3749(1991)
- 7) 川上文清,上村秀喜:細胞工学,14(9),1076(1995)
- 8) Chou,Q.,Russell,M.,Birch,D.E.,Ryamond,J. and Bloch,W.:*Nucleic Acids Res.*,20(7),1717-1723(1992)
- 9) Yamabe,Y.,Shimamoto,A.,Goto,M.,Yokoto,J.,Sugawara,M., and Furuichi,Y.:*Molecular and Cellular Biology*,18(11),6169-6200(1998)
- 10) Kuriyama,T.,Fujinaga,M.,Koda,T. and Nishihira,J.:*Biochemica et Biophysica Acta*, 1388,506-512 (1998)
- 11) Murata,T. and Yamaguchi,M.:*The J.Biol.Chem.*,274(3),1277-1285(1999)
- 12) Takakura,M.,Kyo,S.,Kanaya,T.,Hirano,H.,Takada,J.,Yutsuda,M. and Inoue,M.:*Cancer Res.*,59(3),551-557(1999)
- 13) Ohtani,K.,Suzuki,Y.,Eda,S.,Kawai,T.,Yamazaki,H.,Shimada,T.,Keshi,H.,Sakai,Y.,Fukuoh,A., Sakamoto,T. and Wakamiya,N.:*The J.Biol.Chem.*,274(19)13681-13689(1999)
- 14) Yonekura,H.,Migita,H.,Sakurai,S.,Wang,H.,Harada,S.,Abedin,M.J.,Yamagishi,S. and Yamamoto,H.:*Nucleic Acids Res.*,27(13)2591-2600(1999)
- 15) Fujiwara,M.,Tagashira,S.,Harada,H.,Ogawa,S.,Katumata,T.,Nakatsuka,M.,Komori,T. and Takada,H.:*Biochemica et Biophysica Acta*,1446,265-272(1999)

製品一覧

| Cap Site cDNA [®] 製品一覧 | | (希望納入価格) |
|--|-------------------|----------|
| Cap Site cDNA [®] ,Human Brain | Code No.311-03581 | 90,000 円 |
| Cap Site cDNA [®] ,Human Heart | Code No.312-03631 | 90,000 円 |
| Cap Site cDNA [®] ,Human HeLa Cell | Code No.310-03931 | 90,000 円 |
| Cap Site cDNA [®] ,Human Hippocampus | Code No.319-03641 | 90,000 円 |
| Cap Site cDNA [®] ,Human Kidney | Code No.313-03661 | 90,000 円 |
| Cap Site cDNA [®] ,Human Liver | Code No.318-03591 | 90,000 円 |
| Cap Site cDNA [®] ,Human Placenta | Code No.310-03431 | 90,000 円 |
| Cap Site cDNA [®] ,Human Spleen | Code No.310-03671 | 90,000 円 |
| Cap Site cDNA [®] ,Human Testis | Code No.317-03441 | 90,000 円 |
| Cap Site cDNA [®] ,Human Thymus | Code No.317-03681 | 90,000 円 |
| | | |
| Cap Site cDNA [®] ,Mouse Brain | Code No.314-03691 | 90,000 円 |
| Cap Site cDNA [®] ,Mouse Embryo(16days) | Code No.315-03741 | 90,000 円 |
| Cap Site cDNA [®] ,Mouse Heart | Code No.317-03701 | 90,000 円 |
| Cap Site cDNA [®] ,Mouse Intestine | Code No.311-03601 | 90,000 円 |
| Cap Site cDNA [®] ,Mouse Kidney | Code No.314-03451 | 90,000 円 |
| Cap Site cDNA [®] ,Mouse Liver | Code No.318-03611 | 90,000 円 |
| Cap Site cDNA [®] ,Mouse Lung | Code No.315-03621 | 90,000 円 |
| Cap Site cDNA [®] ,Mouse Spleen | Code No.314-03571 | 90,000 円 |
| Cap Site cDNA [®] ,Mouse Testis | Code No.311-03461 | 90,000 円 |
| Cap Site cDNA [®] ,Mouse Thymus | Code No.316-03651 | 90,000 円 |
| | | |
| Cap Site cDNA [®] ,Rat Brain | Code No.314-03711 | 90,000 円 |
| Cap Site cDNA [®] ,Rat Embryo(18days) | Code No.312-03751 | 90,000 円 |
| Cap Site cDNA [®] ,Rat Heart | Code No.315-03861 | 90,000 円 |
| Cap Site cDNA [®] ,Rat Kidney | Code No.319-03761 | 90,000 円 |
| Cap Site cDNA [®] ,Rat Liver | Code No.316-03771 | 90,000 円 |
| Cap Site cDNA [®] ,Rat Lung | Code No.310-03791 | 90,000 円 |
| Cap Site cDNA [®] ,Rat Ovary | Code No.313-03801 | 90,000 円 |
| Cap Site cDNA [®] ,Rat Pancreas | Code No.310-03811 | 90,000 円 |
| Cap Site cDNA [®] ,Rat Skeletal Muscle | Code No.317-03821 | 90,000 円 |
| Cap Site cDNA [®] ,Rat Small Intestine | Code No.314-03831 | 90,000 円 |
| Cap Site cDNA [®] ,Rat Spleen | Code No.311-03721 | 90,000 円 |
| Cap Site cDNA [®] ,Rat Stomach | Code No.311-03841 | 90,000 円 |
| Cap Site cDNA [®] ,Rat Testis | Code No.313-03781 | 90,000 円 |
| Cap Site cDNA [®] ,Rat Thymus | Code No.318-03731 | 90,000 円 |

Cap Site cDNA[®]製品一覧

(希望納入価格)

| | | |
|---|-------------------|----------|
| Cap Site cDNA [®] ,Chicken Embryo(5days) | Code No.312-03871 | 90,000 円 |
| Cap Site cDNA [®] ,Chicken Heart | Code No.319-03881 | 90,000 円 |
| Cap Site cDNA [®] ,Chicken Lung | Code No.316-03891 | 90,000 円 |
| Cap Site cDNA [®] ,Chicken Pancreas | Code No.319-03901 | 90,000 円 |
| Cap Site cDNA [®] ,Chicken Skeletal Muscle | Code No.316-03911 | 90,000 円 |
| Cap Site cDNA [®] ,Chicken Spleen | Code No.313-03921 | 90,000 円 |
| Cap Site cDNA [®] ,Rice Shoot(L16D8) | Code No.318-03471 | 90,000 円 |
| Cap Site cDNA [®] ,Rice Shoot(Dark) | Code No.315-03481 | 90,000 円 |
| Cap Site cDNA [®] , <i>Arabidopsis thaliana</i> Columbia(Leaf) | Code No.314-03951 | 90,000 円 |

| |
|------|
| 関連製品 |
|------|

Cap Site cDNA[®]dT 一覧

(希望納入価格)

| | | |
|---|-------------------|-----------------------|
| Cap Site cDNA [®] dT,Human Brain | Code No.317-04041 | 90,000 円 |
| Cap Site cDNA [®] dT,Human Heart | Code No.314-04051 | 90,000 円 |
| Cap Site cDNA [®] dT,Human Hippocampus | Code No.311-04061 | 90,000 円 |
| Cap Site cDNA [®] dT,Human Liver | Code No.318-04071 | 90,000 円 |
| Cap Site cDNA [®] dT,Human Adipose | Code No.318-04191 | 90,000 円 |
| Cap Site cDNA [®] dT,Human Lung | Code No.319-04241 | 90,000 円 |
| Cap Site cDNA [®] dT,Human Skeletal Muscle | Code No.312-04231 | 90,000 円 |
| Cap Site cDNA [®] dT,Mouse Brain | Code No.315-04081 | 90,000 円 |
| Cap Site cDNA [®] dT,Mouse Heart | Code No.312-04091 | 90,000 円 |
| Cap Site cDNA [®] dT,Mouse Kidney | Code No.315-04101 | 90,000 円 |
| Cap Site cDNA [®] dT,Mouse Liver | Code No.312-04111 | 90,000 円 |
| Cap Site cDNA [®] dT,Mouse Testist | Code No.312-04121 | 90,000 円 |
| Cap Site cDNA [®] dT,Rat Brain | Code No.316-04131 | 90,000 円 |
| Cap Site cDNA [®] dT,Rat Liver | Code No.313-04141 | 90,000 円 |
| Gene <i>Taq</i> NT(dNTP Mixture 添付) | Code No.318-03231 | 250units 22,500 円 |
| | Code No.314-03233 | 250units × 4 79,000 円 |

| | Human, Mouse, Rat, Chicken 020410 | | |
|--|-----------------------------------|-----------------|----------|
| 50 × TAE | Code No.313-90035 | 500ml | 9,000 円 |
| Loading Buffer | Code No.313-90111 | 10ml | 2,000 円 |
| Agarose21 | Code No.315-03241 | 3g × 25(スリッカイブ) | 44,000 円 |
| | Code No.313-03242 | 25g(ホトタイプ) | 16,000 円 |
| TE(pH8.0) | Code No.316-90025 | 500ml | 9,000 円 |
| Distilled Water, Deionized, Sterile (d.dH ₂ O) | Code No.318-90105 | 500ml | 9,000 円 |

Cap Site cDNA[®]は、株式会社エイジーン研究所が開発し、株式会社ニッポンジーンが製造したものです。
 PCR 法は、F.Hoffmann La Roche 社が特許を有しています。
 ニッポンジーンは、PCR 法に関して F.Hoffmann La Roche 社よりライセンスを受けています。
 製品の仕様は予告無しに変更することがあります。

株式会社ニッポンジーン
 研究試薬部 学術営業課
 〒930-0834 富山市問屋町 1-8-7
 TEL (076)451-6548
 FAX (076)451-6547
 E-mail info@nippongene.jp