
Cap Site cDNA[®] dT Manual

《第5版》

NIPPON GENE

目次

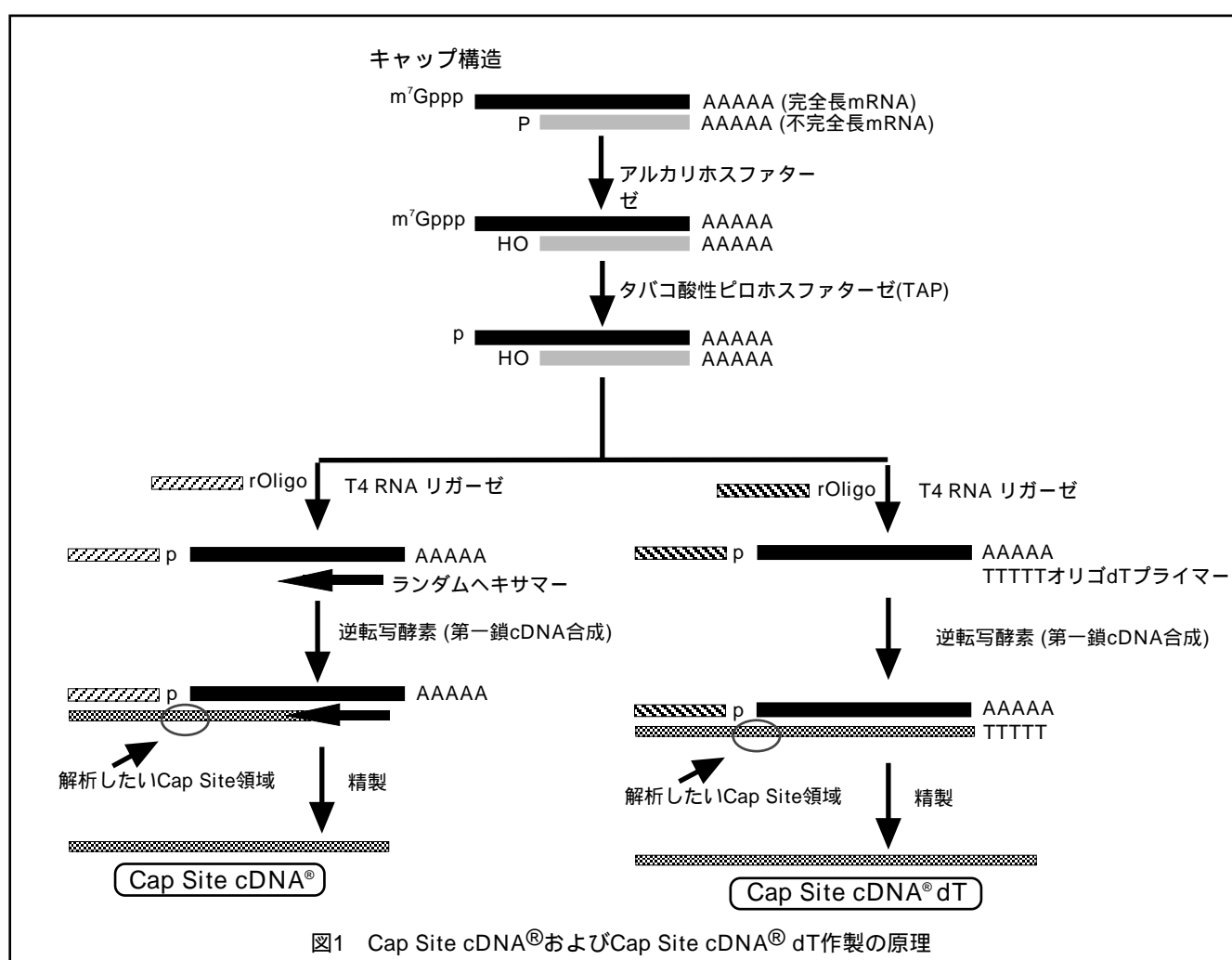
製品説明	p.2
Cap Site cDNA [®] dT の内容	p.3
保存	p.3
Cap Site cDNA [®] dTを用いたCapSite [®] Hunting	p.4
参考文献	p.10
関連製品	p.10

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わないでください。

製品説明

Cap Site cDNA[®]およびCap Site cDNA[®]dT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 (Cap Site cDNA[®]) あるいはオリゴdTプライマー (Cap Site cDNA[®]dT) 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持っている。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 (Tobacco 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リボヌクレオチド (rOligo:Cap Site cDNA[®]とCap Site cDNA[®]dTで配列が異なる) 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 (Cap Site cDNA[®]) あるいはオリゴdTプライマー (Cap Site cDNA[®]dT) を用いて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。



Cap Site cDNA[®]またはCap Site cDNA[®]dT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[®]またはCap Site cDNA[®]dT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。

Cap Site cDNA[®] dTの内容

	<小包装>	<大包装>
1. Cap Site cDNA [®] dT	3 μl	10 μl
25ngのpoly(A)+ RNAを鋳型として調製したもの		
2. 1RDT Primer (25 μM)	30 μl	100 μl
Cap Site cDNA [®] dTのrOligo相補的配列部分に特異的なプライマー1 (Cap Site cDNA [®] dTシリーズ全種類共通)		
3. 2RDT Primer (25 μM)	30 μl	100 μl
Cap Site cDNA [®] dTのrOligo相補的配列部分に特異的なプライマー2 (Cap Site cDNA [®] dTシリーズ全種類共通)		
4. Control Primer1 (25 μM)	5 μl	10 μl
コントロール遺伝子特異的プライマー1 (ヒトとラットはCap Site cDNA [®] シリーズのControl Primer 1と配列が同一、マウスのみ異なる)		
5. Control Primer2 (25 μM)	5 μl	10 μl
コントロール遺伝子特異的プライマー2 (ヒトとラットはCap Site cDNA [®] シリーズのControl Primer 2と配列が同一、マウスのみ異なる)		
6. マニュアル		

<添付プライマーの塩基配列>

1RDT Primer

5'... GATGCTAGCTGCGAGTCAAGTC ...3'

2RDT Primer

5'... CGAGTCAAGTCGACGAAGTGC ...3'

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

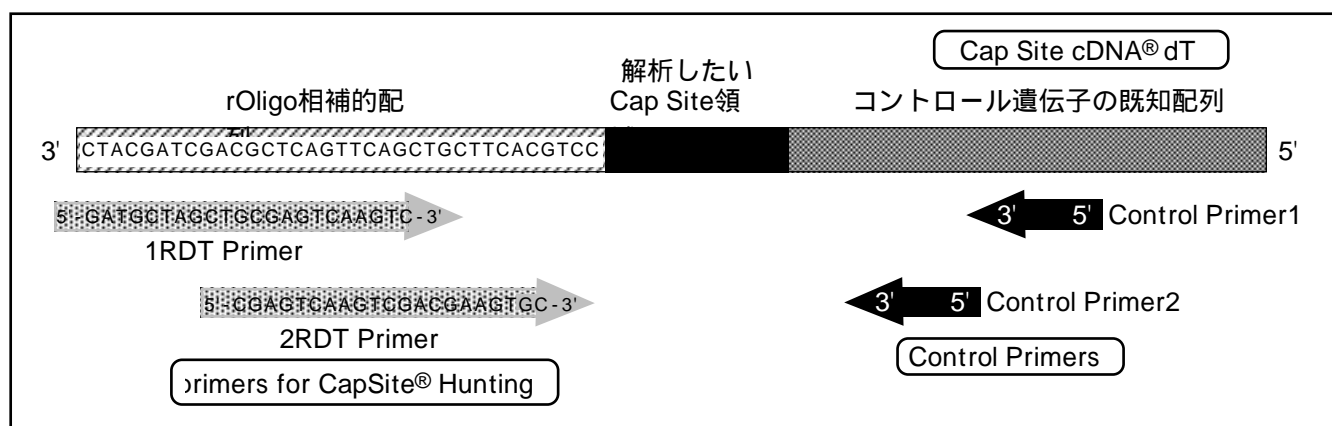


図2 Cap Site cDNA[®] dTとプライマーの位置関係

保存

- 20

* 不要な凍結融解の繰り返しは避けて下さい。

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

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

Cap Site cDNA[®] dTは、mRNAの5'末端のキャップ構造を合成オリゴボヌクレオチド(rOligo)に置換後、オリゴdT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。

ランダムプライマーを用いて調製したCap Site cDNA[®]の場合よりCap Site配列を得る目的で行うPCR (CS-PCR) の増幅サイズを長くすることができる。

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。

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

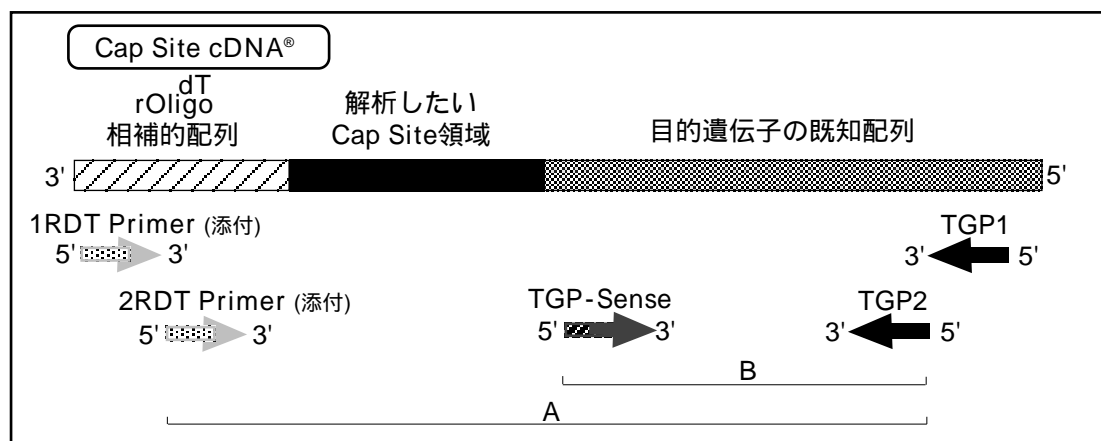
必ずnested PCRを行う。使用するプライマーによっては1st PCRのときのミスアニーリングに起因する増幅産物が観察される。発現量が多くないのに1st PCRで増幅産物が検出される場合は、発現量の多い遺伝子にミスアニーリングしていることがある。そこで、目的遺伝子の特異的に増幅する目的でnested PCRを行うのである。従って、ノーザン解析の結果、発現が確認されている場合でも、少なくとも2本のプライマー(TGP1及びTGP2)を設計することが必要である。目的遺伝子に対する情報が少ない場合には、6本程度のプライマーを設計し、組み合わせでnested PCRを行う。

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含量が高いことが分かっている場合、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 (1RDT Primer 及び 2RDT Primer) と組み合わせ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[®] dTを用いたCapSite[®] 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との組み合わ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。



1RDT Primer, 2RDT Primer :

Cap Site cDNA[®] dT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。

図3 CapSite[®] Huntingで使用するプライマーの位置関係

また、nested PCR後の理想的な電気泳動像は図4のようになる。

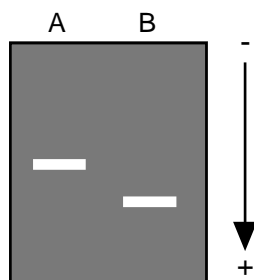


図4 A, Bの電気泳動像 (図3参照)

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: 20~22mer

T_m 値: 62~68

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いろいろ組み合わせて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DNAポリメラーゼとして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。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	20~90秒*		* 20秒 (増幅サイズ 500bp程度) 90秒 (増幅サイズ 2000bp程度)
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	20~90秒*		* 20秒 (増幅サイズ 500bp程度) 90秒 (増幅サイズ 2000bp程度)
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[®] dTを用いたCapSite[®] Huntingの例

1) 準備

以下のものを準備する。

Cap Site cDNA[®] dT

1RDT Primer

Cap Site cDNA[®] dT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。

2RDT Primer

Cap Site cDNA[®] dT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。

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) プライマーの設計」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現品説明書を参照)、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ddH₂O

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。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20~22mer、T_m値は62~68 になるように設計する(T_m値の計算は、T_m=4×(G+C)+2×(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、25 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。

$$\text{プライマー濃度 (}\mu\text{M)} = \frac{\text{溶液の}A_{260}}{\text{プライマーの塩基数}} \times 100$$

例えば20merのプライマーの場合は、 $A_{260}=14.5$ なら、 $14.5/20 \times 100=72.5$ (μM) となる。

3) 反応例

Cap Site cDNA[®] dT 1 μlにddH₂O 9 μlを加えて10倍に希釈する。残りは - 20 で保存する。

* 10倍希釈のCap Site cDNA[®] dT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)
Cap Site cDNA [®] dT	1.0 μ l	1.0 μ l
10 \times GeneTaq Universal Buffer	2.5	2.5
2.5mM dNTP Mixture	2.0	2.0
1RDT Primer (25 μ M)	0.5	0.5
TGP1 (25 μ M)	0.5	-
Control Primer1	-	0.5
ddH ₂ O	18.0	18.0
Gene Taq NT	0.5	0.5
合計	25.0 μ l	25.0 μ l

* Gene Taq NTは最後に添加する。

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	20~90秒*	
伸長反応	72	5分	

* 20秒 (増幅サイズ 500bp程度)
90秒 (増幅サイズ 2000bp程度)

* 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。さらに、ミネラルオイルを添加するPCRの場合も、熱伝導性が遅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 μ lをアガロースゲル電気泳動し、増幅度を検査する。

この時の電気泳動の結果は、次のnested PCRがうまくいか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2のPCR産物の1 μ l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	3 (CS-PCR)	4 (Control)	5 (Control)
1st PCR産物	1.0 μ l (チューブ番号1)	1.0 μ l (チューブ番号1)	1.0 μ l (チューブ番号2)
10 \times GeneTaq Universal Buffer	2.5	2.5	2.5
2.5mM dNTP Mixture	2.0	2.0	2.0
2RDT Primer (25 μ M)	0.5	0.5	0.5
TGP2 (10 μ M)	0.5	-	-
Control Primer2 (25 μ M)	-	-	0.5
ddH ₂ O	18.0	18.5	18.0
GeneTaq NT (5units/ μ l)	0.5	0.5	0.5
合計	25.0 μ l	25.0 μ l	25.0 μ l

* チューブ番号3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はネガティブコントロール、チューブ番号5は、ポジティブコントロールである (明瞭な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	20~90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3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。

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図5の通りである。PCR条件は、本マニュアル6ページの3) 反応例に従った。lane 3はControl Primer2及びrOligo相補的配列部分に特異的である2RDT Primerを用いたnested PCR (本マニュアル7ページのチューブ番号3に相当) である。lane 2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 2はlane 3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	-アクチン
	Mouse	-アクチン
	Rat	-アクチン
	Drosophila melanogaster	Ribosomal Protein49
	Arabidopsis thaliana Columbia	Elongation Factor-1 A3(F-1 A3)
	oryza sativa Nihonbare(Ear)	Elongation Factor-1 (EF-1)

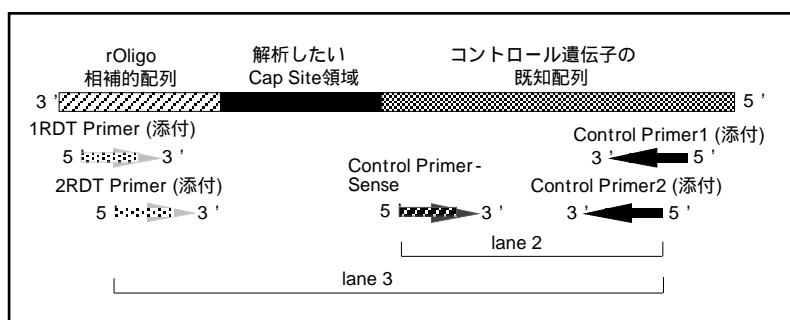
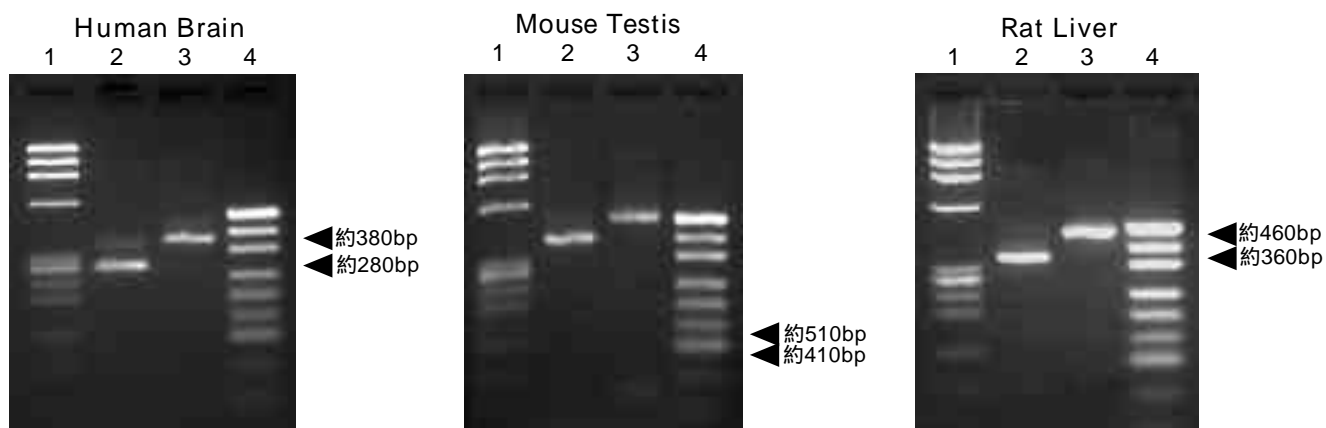
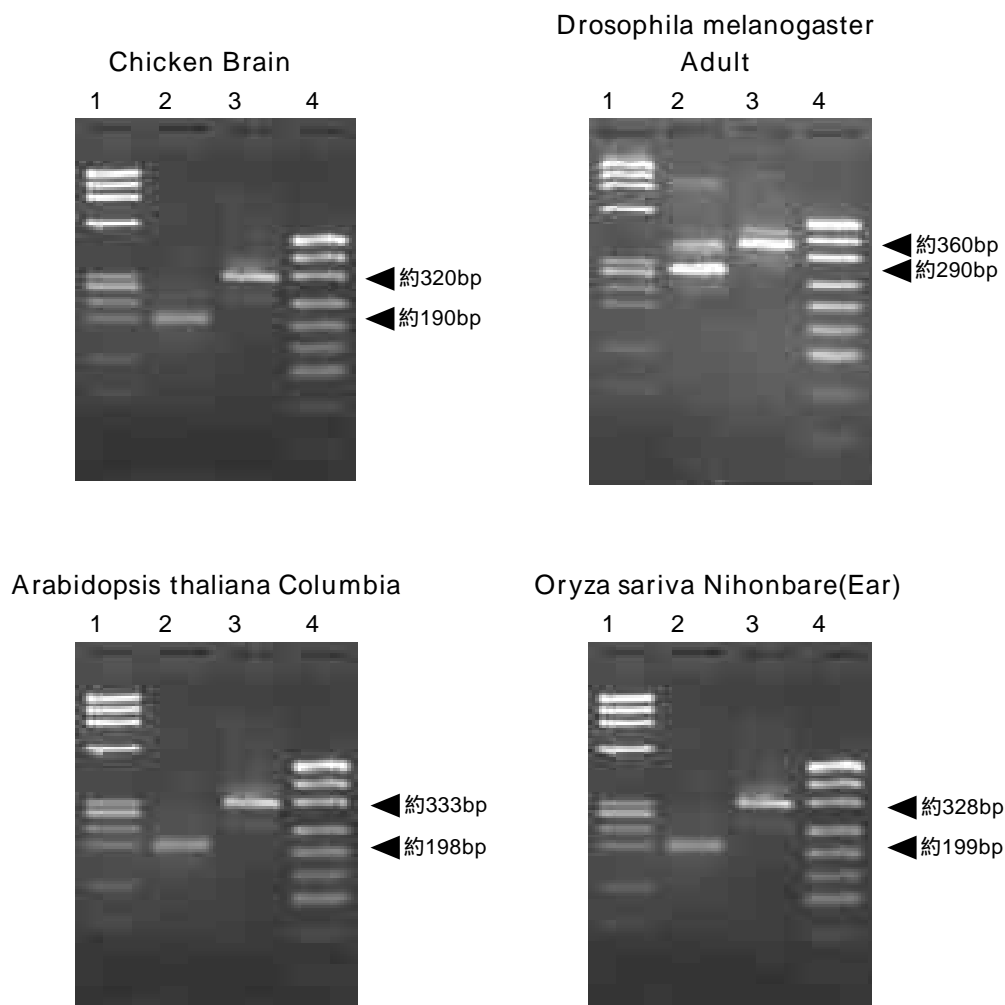


図5 プライマーの位置関係





lane 1 Marker4 (X174/Hae)

lane 2 Control Primer-SenseとControl Primer2を用いたPCR

lane 3 2RDT PrimerとControl Primer2を用いたnested PCR

lane 4 Marker11 (pUC19/Msp)

3% Agarose 21

PCR産物の1/5量(5 μ l)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

- ・ TGPの配列を変える。
- ・ 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。
- ・ 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[®] dT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。

- ・ TGP濃度を確認する。(1A₂₆₀=33 μ gで計算する)
- ・ TGPの配列を変える。
- ・ 耐熱性DNAポリメラーゼを変える。

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., Raymond, J. and Bloch, W. : Nucleic Acids Res., 20(7), 1717-1723 (1992)
- 9) Yamabe, Y. , Shimamoto, A., Goto, M., Yokota, 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., Takeda, J., Yutsudo, M. and Inoue, M. : Cancer Res., 59, (3), 551-557 (1999)
- 13) Ohtani, K., Suzuki, Y., Eda, S., Kawai, T., Kase, 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)

関連製品

GeneTaq NT (dNTP Mixture添付)	Code No.318-03231	250units	22,500円
	Code No.314-03233	250units × 4	79,000円
50 × TAE	Code No.313-90035	500ml	9,000円
Loading Buffer	Code No.313-90111	10ml	2,000円
Agarose 21	Code No.315-03241	3g × 25(スティックタイプ)	44,000円
	Code No.313-03242	25g(ボトルタイプ)	16,000円
TE(pH8.0)	Code No.316-90025	500ml	9,000円
Distilled Water, Deionized, Sterile	Code No.318-90105	500ml	9,000円
Tobacco Acid Pyrophosphatase(TAP)	Code No.313-04021	200units	35,000円

Cap Site cDNA[®] dT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. Hoffman 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. Hoffman 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。

希望納入価格に消費税等は含まれておりません。

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1-29

TEL (076)451-6548

FAX (076)451-6547

E.mail info@nippongene.jp

<NPGA010301TT >