



Innovative
Tools to
Accelerate
Discovery

PCR-Select™

cDNA Subtraction Kit

ユーザーマニュアル

PT1117-1 (PR892607J)

2009 年 9 月 14 日

製品コード：637401

保存条件はコンポーネントのリストをご覧ください。
研究用試薬としてご使用ください。

目次

I.	はじめに	3
II.	キットの内容	8
III.	他に必要な試薬類	10
IV.	PCR-Select™ cDNA Subtraction プロトコール	
A.	一般的な留意点	11
B.	RNA の調製と取り扱い	11
C.	1st strand cDNA の合成	12
D.	2nd strand cDNA の合成	12
E.	Rsa I 消化	13
F.	アダプターライゲーション	16
G.	1st ハイブリダイゼーション	18
H.	2nd ハイブリダイゼーション	18
I.	PCR 増幅	19
V.	結果の分析とトラブルシューティングガイド	
A.	二本鎖 cDNA 合成産物の分析	23
B.	Rsa I 消化の分析	24
C.	ライゲーションの分析	25
D.	PCR 産物の分析	27
E.	PCR を用いたサブトラクション効率の分析	28
F.	ハイブリダイゼーションを用いたサブトラクション効率の分析	31
VI.	サブトラクションライブラリーのディファレンシャルスクリーニング	33
VII.	参考文献	34
補遺 A :	サブプレッション PCR	37
補遺 B :	アダプターとプライマーの塩基配列	38

I. はじめに

サブトラクティブハイブリダイゼーションは、2つの mRNA グループ（ポピュレーション）を比較し、一方のグループで発現しているが他方のグループでは発現していない遺伝子（differentially expressed genes）のクローンを得ることができる有力な方法です。サブトラクティブハイブリダイゼーションには、いくつかの方法がありますが、基本原理は単純です。まず、2つのグループの mRNA を cDNA に変換します。ここでは、特異的な（発現差がある）転写産物由来の cDNA を含む cDNA グループを “Tester” と呼び、対照となる cDNA グループを “Driver” と呼ぶことにします。次に Tester cDNA と Driver cDNA のハイブリダイゼーションを行い、ハイブリダイズした cDNA を除去します。その結果、ハイブリダイズしないで残った cDNA は、Tester では発現しているが Driver では発現していない遺伝子であることになります。

従来のサブトラクティブハイブリダイゼーション法で成功した例はいくつか報告されていますが、それらの方法は、数回のハイブリダイゼーションを必要とし、転写量の少ない mRNA の同定にはあまり適していませんでした（Duguid & Dinauer, 1990; Hara *et al.*, 1991; Hedrick *et al.*, 1984; Sargent & Dawid, 1983; and Davis *et al.*, 1984）。クローンテックの PCR-Select cDNA Subtraction Kit は、発現量の異なる遺伝子配列を選択的に増幅するユニークなサブトラクション法を利用したキットで、従来のサブトラクション法の技術的な限界を克服しています（Diatchenko *et al.*, 1996; Gurskaya *et al.*, 1996）。図 1 に PCR-Select の操作手順の概要を示します。実験に必要な Poly A⁺ RNA の量はわずか 0.5 ~ 2 µg で、全体の所要時間はわずか 3 ~ 4 日間です。また、一本鎖（ss）と二本鎖（ds）を物理的に分離する必要もありません（Duguid & Dinauer, 1990; Sargent & Dawid, 1983; and Hedrick *et al.*, 1984）。さらに、サブプレッショ PCR（U.S. Patent #5,565,340; 補遺 A 参照）を利用しているため、標的分子の増幅過程での非特異的な増幅を抑えることができます。

PCR-Select™ cDNA サブトラクション法の原理

PCR-Select cDNA サブトラクション法の原理を図 2 に示します。まず、比較する 2 種類の組織または細胞から 0.5 ~ 2 µg の Poly A⁺ RNA を単離し、cDNA を合成します。得られた Tester cDNA と Driver cDNA を *Rsa*I（4 塩基配列を認識・切断して平滑末端を生ずる制限酵素）で切断します。次に、Tester cDNA を 2 群に分け、それぞれに異なる cDNA アダプターをライゲーションします。アダプターの 5' 末端にはリン酸基が含まれてないため、アダプターの片方の鎖だけが cDNA の 5' 末端に結合します。この 2 種類のアダプターは同一の末端配列をもっているため、陥入末端が埋められてしまえば同一の PCR プライマーとアニーリングできます。（プライマーとアダプターの塩基配列については補遺 B をご覧ください）。

次に、2 回のハイブリダイゼーション（1st ハイブリダイゼーションと 2nd ハイブリダイゼーション）を行います。1st ハイブリダイゼーションでは、それぞれの Tester サンプルに過剰量の Driver を加えます。サンプルを熱変性した後アニーリングを行うと、各サンプルで a, b, c, d の 4 種類の分子が生じます（図 2）。発現量の多い塩基配列とそうでない塩基配列の濃度が、タイプ a 分子間で均等化されます。ハイブリダイゼーションの反応速度は濃度の二乗に比例するため、多量に存在する分子ほど再アニーリング速度が速くなるからです（*Nucleic Acid Hybridization*, ed. by James & Higgins 参照）。同時に、発現量の差がある配列（differentially expressed sequences）はタイプ a 分子として高度に濃縮され、発現量の差がない cDNA は Driver 分子と結合してタイプ c 分子を形成します。

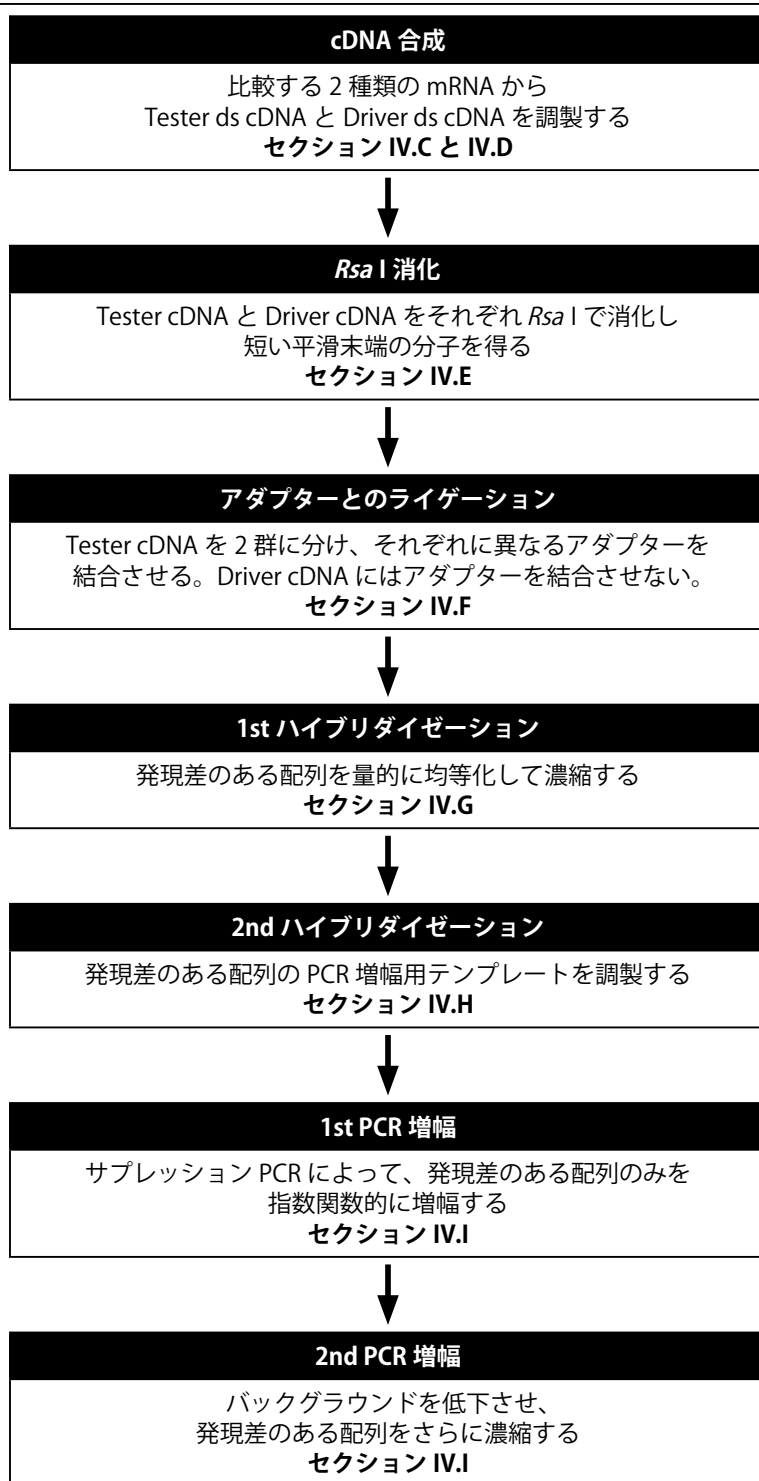


図 1. CLONTECH PCR-Select の操作手順の概要

発現差がある転写産物由来の cDNA が含まれている cDNA を “Tester”、対照の cDNA を “Driver” と呼ぶ。クロンテックの SMARTer Pico PCR cDNA Synthesis Kit（製品コード 634928）を用いて cDNA を合成した場合は、セクション IV.F から実験を始める。

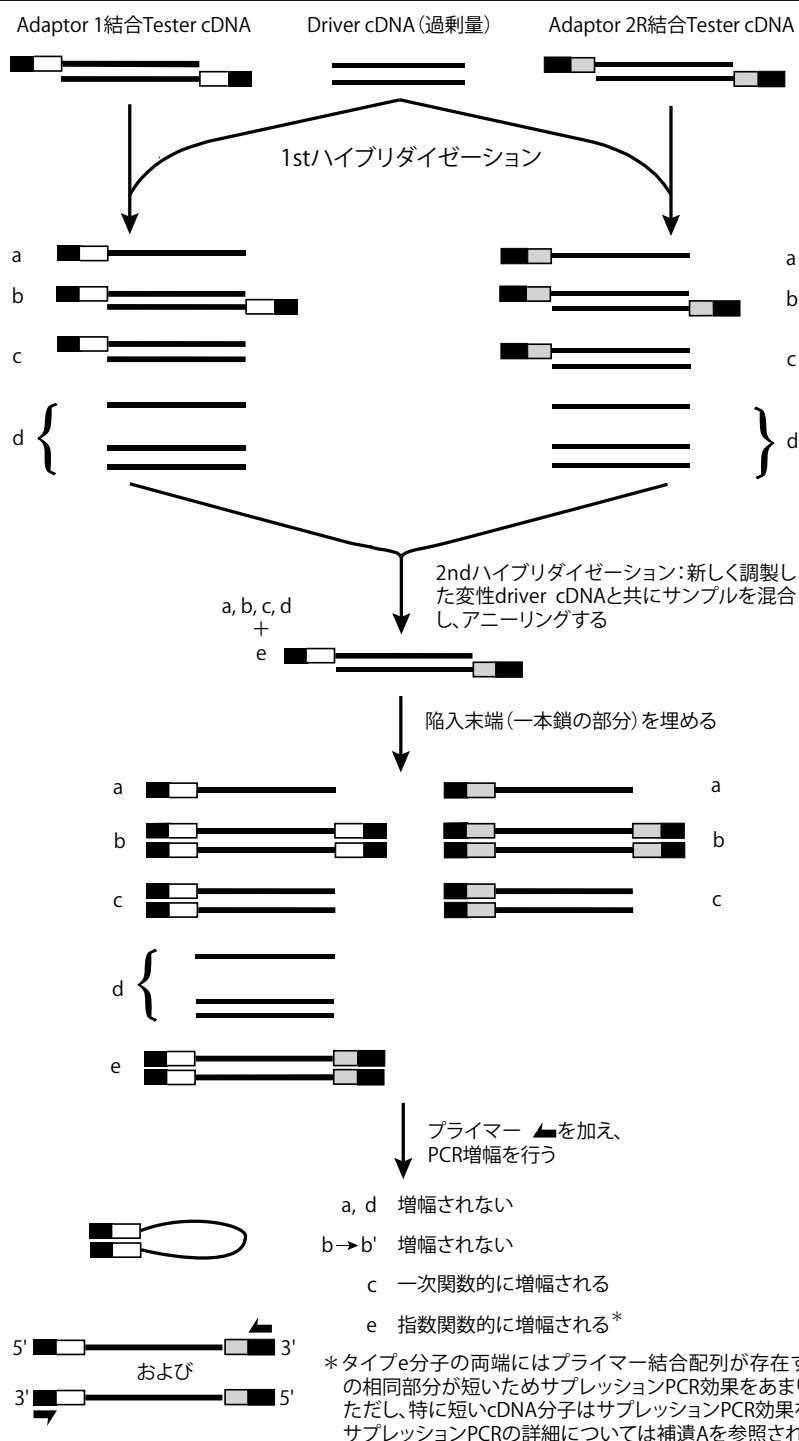


図 2. PCR-Select サブトラクションの模式図

Tester cDNA だけに高発現している塩基配列がある場合にのみ、タイプ e 分子が生成する。実線は *Rsa* I 消化 Tester cDNA あるいは Driver cDNA を示している。■ は、Adaptor 1 と Adaptor 2R の外側の塩基配列および対応する PCR Primer 1 配列を示している。□ は Adaptor 1 の内側の塩基配列および対応する Nested PCR Primer 1 配列を示している。▣ は、Adaptor 2R の内側の配列および対応する Nested PCR Primer 2R 配列を示している。

2nd ハイブリダイゼーションでは、1st ハイブリダイゼーションで得られた 2 つのサンプルを変性させずに、新たな変性（一本鎖）Driver cDNA とともに混合します。量的に均等化され、サブトラクション（消去）されて残った一本鎖の Tester cDNA だけが再びハイブリダイズでき、新たなタイプのハイブリッド分子（タイプ e）を形成します。タイプ e 分子は異なる末端を持つ二本鎖の Tester 分子で、一方の突出末端は Adaptor 1 の配列に、他方の突出末端は Adaptor 2R の配列に対応します。新たに調製した変性 Driver cDNA を同時に加えたことにより、発現差のある配列がタイプ e 分子画分としてさらに濃縮されます。次に、DNA ポリメラーゼを用いて末端を埋めます。これにより、両端にプライマーアニーリングサイト（アダプター）をもつタイプ e 分子（発現差のある Tester 配列）が形成されます。なお、Nested Primer に対するアニーリングサイトの配列は 5' 末端と 3' 末端で異なることになります。

これらの分子のポピュレーション全体を PCR にかかけ、発現差のある配列を増幅します。タイプ a 分子とタイプ d 分子はプライマーアニーリングサイト（アダプター）を持たないため、PCR 増幅されません。大部分のタイプ b 分子はサブプレッション PCR 効果によってフライパン状の構造を形成するため、指数関数的な増幅が妨げられます（詳細は補遺 A 参照）。タイプ c 分子はプライマーアニーリングサイトを 1 つしか持たないため、一次関数的にしか増幅されません。タイプ e 分子（均等化された、発現差のある配列）だけが両端にプライマーアニーリングサイトを持つため、指数関数的に増幅されます。

タイプ e 分子の 5' 末端と 3' 末端のアダプター配列は、異なる nested プライマーアニーリングサイトをもっています。これを利用して、Nested Primer で 2 回目の PCR 反応を行い、バックグラウンドの PCR 産物を減らし、発現差のある配列を濃縮します。得られた cDNA は、直接 T/A クローニングベクターに挿入できます。また、Adaptor 1 の *NotI* (*SmaI*, *XmaI*) サイトや Adaptor 2R の *EagI* サイトを利用して部位特異的 (site specific) クローニングを行うこともできます。アダプター / cDNA 接合部の *RsaI* サイトを利用して平滑末端クローニングも行えます。このようなクローニングを行うことで、塩基配列の同定および（あるいは）ハイブリダイゼーション解析によって、発現差のある RNA を同定できます。さらに、PCR 増幅産物は、DNA ライブラリーをスクリーニングするためのハイブリダイゼーションプローブとしても利用できます。

PCR-Select™ ディファレンシャルスクリーニング

サブトラクションライブラリー（組織や細胞間などで発現量に差がある遺伝子に由来する cDNA ライブラリー）が得られたら、個々のクローンが発現差のある遺伝子に本当に由来しているかを確認することが重要です。一般的には、無作為にクローンをピックアップしてノーザンブロット解析を行います。しかし、この方法は時間がかかり、効率も良くありません。特に、非常に似通った RNA グループ同士を比較する場合は、サブトラクションライブラリーに偽陽性クローンが多く含まれるため、多大な時間と労力が必要です。

ノーザンブロットを行う前に、サブトラクションライブラリーのディファレンシャルスクリーニングを行って偽陽性を排除すれば、時間と労力を節約できます。

ディファレンシャルスクリーニングでは、サブトラクションライブラリーの各クローンを配列したドットブロットアレイを作製し、Tester あるいは Driver グループ（ポピュレーション）の mRNA から調製した標識プローブのいずれかとハイブリダイゼーションを行います。Tester プローブで認識され、Driver プローブでは認識されなかったクローンが、発現量の差のある遺伝子であることになります。クローンテックの PCR-Select Differential Screening Kit（製品コード 637403）には、これを行うのに必要な試薬、コントロールおよび詳細なユーザーマニュアル（PT3138-1）が含まれています。

PCR-Select Differential Screening Kit の検出感度を最大限にするためには、2 種類のサブトラクションを行う必要があります。つまり、これまで述べてきたサブトラクション（フォワード・サブトラクション）と、Driver を Tester に、Tester を Driver に置き換えて行うサブトラクション（リバース・サブトラクション）を行う必要があります。ディファレンシャルスクリーニングの詳細は、セクション VI をご覧ください。

SMARTer™ Pico PCR cDNA Synthesis Kit の利用

出発材料に限りがある場合は、PCR-Select cDNA Subtraction Kit を使用する前に、SMARTer Pico PCR cDNA Synthesis Kit (製品コード 634928) を用いて total RNA サンプルを前もって増幅することができます (Matz *et al.*, 1999 and Chenchik *et al.*, 1998)。従来法で total RNA から cDNA を合成すると、たとえ oligo (dT) を用いて合成を開始したとしても、Poly A⁺ RNA と一緒にリボソーム RNA (rRNA) も逆転写されてしまいます。このような方法で作製した cDNA を PCR-Select cDNA Subtraction Kit で用いると、Poly A⁺ RNA から合成された低濃度の cDNA に過剰量のリボソーム RNA 由来の cDNA が混入することになり、結果としてサブトラクティブハイブリダイゼーションの効率が低下します。

これとは対照的に、SMARTer Pico PCR cDNA Synthesis Kit を用いて調製した cDNA は、出発材料が total RNA であっても、PCR-Select cDNA Subtraction にそのまま使用することができます。SMARTer Pico PCR cDNA Synthesis Kit を用いて調製した cDNA を使用する場合は、本マニュアルのセクション IV.F の「アダプターライゲーション」から操作を始めてください。ただし、セクション IV.C に記載されている PCR-Select コントロール cDNA の合成とサブトラクションを行うことを強くお勧めします。SMART PCR cDNA Library Construction Kit (製品コード 634901) を用いて調製した cDNA は、PCR-Select cDNA Subtraction Kit には使用できませんので注意してください。

転写量に差のある遺伝子の cDNA を PCR-Select 法で同定した後、対応する全長 cDNA を迅速にクローニングしたい場合は、SMARTer RACE PCR cDNA Synthesis Kit (製品コード 634925/634926) や Marathon-Ready cDNAs (多種類) を用いると便利です (Chenchik *et al.*, 1996)。また、SMARTer Pico PCR cDNA Synthesis Kit (製品コード 634928) も同様にお使いいただけます。

II. キットの内容

RNA は -70°C で、4 × Hybridization buffer は室温で保存してください。それ以外の試薬は -20°C で保存してください。

本キットには、7 回の cDNA 合成に十分な量の試薬が含まれています。最良の結果を得るためには、1 回の反応あたり 2 µg の Poly A⁺ RNA を使用してください。Poly A⁺ RNA の量がそれより少ないと、サブトラクション操作の過程で、発現量の少ない、発現差のある遺伝子 (differentially expressed gene) が消失するおそれがあります。(特定の系でアップレギュレーションまたはダウンレギュレーションされた cDNA を同定するために) それぞれの合成で調製された cDNA を別々の実験で Tester および Driver として用いると仮定した場合、7 回の cDNA 合成は、6 回のサブトラクション実験と 1 回のコントロール実験を行える分に相当します。PCR 試薬は、1st PCR を 50 回、2nd PCR を 100 回行うのに十分な量を含んでいます。アダプターとプライマーの塩基配列については補遺 B を参照してください。

1st strand 合成

- 7 µl AMV Reverse Transcriptase (20 units/µl)
- 10 µl cDNA Synthesis Primer (10 µM)
- 200 µl 5 × First-Strand Buffer :
 - 250 mM Tris-HCl (pH 8.5)
 - 40 mM MgCl₂
 - 150 mM KCl
 - 5 mM Dithiothreitol

2nd strand 合成

- 28 µl 20 × Second-Strand Enzyme Cocktail :
 - DNA Polymerase I 6 units/µl, RNase H 0.25 units/µl,
 - E. coli* DNA ligase 1.2 units/µl
- 200 µl 5 × Second-Strand Buffer :
 - 500 mM KCl
 - 50 mM Ammonium sulfate
 - 25 mM MgCl₂
 - 0.75 mM β-NAD
 - 100 mM Tris-HCl (pH 7.5)
 - 0.25 mg/ml BSA
- 14 µl T4 DNA Polymerase (3 units/µl)

エンドヌクレアーゼ消化

- 300 µl 10 × *Rsa* I Restriction Buffer :
 - 100 mM Bis Tris Propane-HCl (pH 7.0)
 - 100 mM MgCl₂
 - 1 mM DTT
- 12 µl *Rsa* I (10 units/µl)

アダプターライゲーション

- 21 µl T4 DNA Ligase (400 units/µl; contains 3 mM ATP)
- 200 µl 5 × DNA Ligation Buffer :
 - 250 mM Tris-HCl (pH 7.8)
 - 50 mM MgCl₂
 - 10 mM DTT
 - 0.25 mg/ml BSA
- 30 µl Adaptor 1 (10 µM)
- 30 µl Adaptor 2R (10 µM)

ハイブリダイゼーション

- 200 μ l 4 $\times$ Hybridization Buffer
- 1.4 ml Dilution buffer :
 - 20 mM HEPES (pH 6.6)
 - 20 mM NaCl
 - 0.2 mM EDTA (pH 8.0)

PCR 増幅

- 50 μ l PCR Primer 1 (10 μ M)
- 100 μ l Nested PCR Primer 1 (10 μ M)
- 100 μ l Nested PCR Primer 2R (10 μ M)
- 10 μ l PCR Control Subtracted cDNA

コントロール用試薬

- 5 μ l Control Poly A⁺ RNA (1 μ g/ μ l; ヒト骨格筋由来)
- 5 μ l Control DNA (3 ng/ μ l) (*Hae* III 消化/バクテリオファージ Φ X174 DNA)
- 50 μ l G3PDH 5' Primer (10 μ M) *
- 50 μ l G3PDH 3' Primer (10 μ M) *

*これらのプライマーは、ヒト、マウスおよびラットの G3PDH 遺伝子を増幅する。

一般試薬

- 20 μ l dNTP Mix (10 mM each dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- 100 μ l 20 $\times$ EDTA/Glycogen Mix (0.2 M EDTA; 1 mg/ml glycogen)
- 400 μ l NH₄OAc (4 M)
- 1 ml 滅菌水

III. 他に必要な試薬類

本キットを使用する際は、以下の試薬を別途ご用意ください。本キットには含まれていません。

- バクテリオファージ Φ X174 の *Hae* III 消化産物（製品コード 3405A）

アガロースゲル用の DNA サイズマーカー

- 0.5 ml PCR チューブ

GeneAmp 0.5 ml 反応チューブ（製品コード N801-0180）をお勧めします。

- 80%エタノールおよび 95%エタノール

- フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール（25：24：1）

- クロロホルム：イソアミルアルコール（24：1）

- 50 × PCR 酵素ミックス

クロンテックの Advantage cDNA Polymerase Mix（製品コード 639105）をお勧めします。Advantage cDNA PCR Kit（製品コード 639101/639102）にも含まれています。本ユーザーマニュアルに記載されているプロトコルは、この Mix を使用することを前提に最適化されています。本製品は長い cDNA を正確に増幅することを目的として開発されたものです（Barnes, 1994; Cheng *et al.*, 1994）。この 50 × ミックスには、KlenTaq-1 DNA Polymerase（N 末端で欠損したエクソヌクレアーゼ活性を持たない Taq DNA Polymerase）や校正活性をもつポリメラーゼ、自動ホットスタートを可能にする TaqStart Antibody（Kellogg *et al.*, 1994）が含まれています。Taq DNA Polymerase 単独でも使用できますが、1st PCR と 2nd PCR のサイクル数をさらに 3～5 回増やす必要があります。ただし、サイクル数の増加によりバックグラウンドが増加し、サブトラクションライブラリー中の発現差のある遺伝子のクローンの割合が低下する可能性がありますので注意してください。

注意： Advantage cDNA Polymerase Mix を使用しない場合は、TaqStart Antibody（製品コード 639250/639251）あるいはワックスビーズ（Taq DNA Polymerase を包含する）を用いた手動のホットスタートを行い、非特異的な DNA 増幅を抑えるようにしてください。

- 10 × PCR バッファー

DNA ポリメラーゼまたはポリメラーゼ・ミックスに付属する 10 × 反応バッファーをお使いください。このバッファーは Advantage cDNA Polymerase Mix（製品コード 639105）や Advantage cDNA PCR Kit（製品コード 639101/639102）に含まれています。

- PCR 用の dNTP Mix（各 10 mM の dATP, dCTP, dGTP, dTTP）

- 50 × TAE 電気泳動用バッファー

242 g Tris base

57.1 ml 氷酢酸

37.2 g Na₂EDTA・2H₂O

H₂O に溶かして 1 L にします。1 × TAE バッファーは 50 × ストック液を H₂O で 50 倍希釈して作製してください。

IV. PCR-Select™ cDNA Subtraction プロトコール

実験を始める前に、必ず本プロトコールをすべてお読みください。

A. 一般的な留意点

- RNA サンプルや cDNA サンプルがヌクレアーゼで分解されないよう、手袋を着用してください。
- 本プロトコールに記されているサイクリング条件は、DNA Thermal Cycler 480 と GeneAmp Systems 2400/9600 の使用をもとに最適化されています。違うサーマルサイクラーや 50 × ポリメラーゼ・ミックス、鋳型を用いる場合は、最適な PCR 条件が変わる可能性があります。
- ノーザンブロット分析を行う前に PCR-Select Differential Screening Kit (製品コード 637403) を用いてサンプルのディファレンシャルスクリーニングを行う予定であれば、2 種類のサブトラクションを行う必要があります。つまり、通常のサブトラクション（フォワード・サブトラクション）と、Driver と Tester を逆にしたりバース・サブトラクションの両方を行う必要があります。ディファレンシャルスクリーニングの詳細については、セクション VI と PCR-Select Differential Screening Kit User Manual (PT3831-1) をご覧ください。
- PCR セットアップ中の非特異的な DNA 合成を低減させるために、必ずホットスタート法を用いてください。TaqStart Antibody を用いる方法 (Kellogg *et al.*, 1994) あるいは手動のホットスタート法 (D'aquila *et al.*, 1991) をお勧めします。本プロトコールは TaqStart Antibody を用いる方法をもとに最適化されています。TaqStart Antibody は別売 (製品コード 639250/639251) されており、また Advantage cDNA Polymerase Mix (製品コード 639102) にも含まれています。
- 沈殿の懸濁や反応溶液の混合を行う場合は、上下に穏やかにピペティングした後、軽く遠心して中身をチューブの底に集めてください。
- フェノール-クロロホルム抽出では、ボルテックスを用いて混合します。
- 酵素は最後に反応ミックスに加えてください。上下に穏やかにピペティングして十分に混合します。
- 加える酵素の量や反応中の DNA 濃度は厳密に最適化されていますので、これらを増やさないでください。
- 必ずしも必要ではありませんが、1st strand 合成に [α - 32 P] dCTP を添加することをお勧めします。これにより、cDNA の収量および DNA 沈殿効率を求めることができ、また cDNA 合成時のトラブルシューティングにも役立ちます。

B. RNA の調製と取り扱い

1. 一般的な注意点

高品質の cDNA を合成するためには、分解されていない純度の高い Poly A⁺ RNA を用いることが必須です。RNA のコンタミネーションと分解を避けるため、また RNase の混入を最小限に抑えるために、次の点にご注意ください。手から RNase が混入しないように手袋を着用してください。少量の溶液の取り扱いにはエアロゾル防止ピペットチップを、大量の溶液の取り扱いには滅菌済みのディスポーザブルピペットを、それぞれご使用ください。

2. RNA の単離

単離法については Farrell *et al.*, 1993 または Sambrook *et al.*, 1989 を参照してください。可能な限り同一の試薬、同一のプロトコールを用いて、比較する total RNA サンプルの精製を同時並行に行ってください。こうすることにより、偽陽性を低減させることができます。

3. RNA の分析

total RNA と Poly A⁺ RNA を単離したら、ホルムアルデヒド変性アガロース /EtBr ゲルで泳動し、RNA の状態を確認します。哺乳動物由来の total RNA は通常 2 つの明瞭なバンドを示します。これらは、リボソーム 28S RNA と 18S RNA に由来する約 4.5 kb と 1.9 kb のバンドで、その強度比は約 1.5 ～ 2.5 : 1 です。哺乳動物由来の Poly A⁺ RNA は、0.5 ～ 12 kb にスミアとして現れ、それとともに弱いリボソーム RNA バンドが見られます。

実験に用いる RNA がアガロースゲル上で予想よりも小さい場合 (例えば、1 ～ 2 kb 以下)、

28S RNA と 18S RNA の強度比が 1 : 1 以下の場合は、不純物が含まれているか、分解している可能性があります。その場合は、すべての RNA 単離試薬について RNase や他の不純物が含まれていないかどうか調べてください。それらの混入が見つかった場合は、新たな試薬を用いて RNA を再度調製してください。それでも問題が解決しない場合は、別の組織や細胞の RNA 源、例えばクロンテックの Premium Poly A⁺ RNA を用いてもよいでしょう。低品質および分解した RNA はサブトラクション操作でバックグラウンドを増加させますので、出発材料として使用しないでください。

C. 1st strand cDNA の合成

本操作は、実験対象の Tester Poly A⁺ RNA と Driver Poly A⁺ RNA とともに、キットに含まれているコントロール Poly A⁺ RNA (ヒト骨格筋由来) を用いて行ってください。本項で合成された骨格筋 cDNA は、後のステップで、コントロール Driver cDNA として使用します。セクション IV.F では、骨格筋 ds cDNA の一部に少量のコントロール DNA (*Hae* III 消化/バクテリオファージ Φ X174) を添加して、偽の (mock) Tester cDNA を調製します。目的のサブトラクションと並行して、これらの骨格筋由来の Tester cDNA と Driver cDNA を用いたコントロールサブトラクションを行います。コントロールサブトラクションを行うことにより、合成された二本鎖 cDNA の収量とサイズ分布を推定することができます。

1. Tester Poly A⁺ RNA、Driver Poly A⁺ RNA、および コントロール Poly A⁺ RNA (ヒト骨格筋由来) のそれぞれの場合について、以下の成分を滅菌済 0.5 ml 微量遠心チューブに入れて混合する (ポリスチレンチューブを使用してはならない)。

Poly A ⁺ RNA (2 μg)	2 ~ 4 μl *
cDNA Synthesis Primer (10 μM)	1 μl

* コントロール合成では、2 μl の骨格筋コントロール Poly A⁺ RNA を加える。

必要であれば、滅菌水を加えて最終容量を 5 μl にする。液を充分混合した後、軽く遠心する。

2. サーマルサイ클ラーを用いて 70℃ で 2 分間インキュベートする。
3. 2 分間氷冷した後、軽く遠心する。
4. 各反応チューブに以下の溶液を加える。

5 × First-Strand Buffer	2 μl
dNTP Mix (10 mM each)	1 μl
滅菌水*	1 μl
AMV Reverse Transcriptase (20 units/μl)	1 μl

* cDNA 合成の進行状況をモニターする場合は、1 μl の [α -³²P]dCTP (10 mCi/ml, 3,000 Ci/mmol) を 9 μl の滅菌水に加えて混合し、その 1 μl を上記の滅菌水の代わりに加える。
5. ボルテックスで穏やかに混合したのち、チューブを軽く遠心する。
6. エアインキュベーターまたはサーマルサイ클ラーを用いて、42℃ で 1.5 時間インキュベートする。

注意: ウォーターバスを使用しないでください。蒸発によって反応液量が減少し、反応効率を下げる原因になります。
7. 反応チューブを氷上に移して 1st Strand cDNA 合成を止める。直ちに次の D の操作に進む。

D. 2nd strand cDNA の合成

1st strand cDNA として合成された Tester cDNA、Driver cDNA、およびコントロール骨格筋 cDNA を用いて、次の操作を行います。

1. 1st strand cDNA 合成反応を行ったチューブ (10 μl の反応液を含む) に、あらかじめ氷冷した次の成分を加える。

滅菌水	48.4 μl
5 × Second-strand buffer	16.0 μl
dNTP mix (10 mM)	1.6 μl
20 × Second-strand enzyme cocktail	4.0 μl
2. 液を混合した後、チューブを軽く遠心する。最終液量が 80 μl になるはずである。
3. ウォーターバスまたはサーマルサイ클ラーを用いて、16℃ で 2 時間インキュベートする。
4. 2 μl (6 units) の T4 DNA Polymerase を加え、十分に混合する。

5. ウォーターバスまたはサーマルサイクラーを用いて、16℃で30分間インキュベートする。
6. 4 µl の 20 × EDTA/Glycogen Mix を加えて、2nd strand 合成反応を止める。
7. 100 µl のフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール（25：24：1）を加える。
8. ボルテックスで十分に混合した後、室温、14,000 rpm で10分間遠心する。
9. 上層（水層）を注意深く集め、新しい0.5 ml 微量遠心チューブに移す。中間層と下層を捨て、適切に廃棄する。
10. 水層に100 µl のクロロホルム：イソアミルアルコール（24：1）を加える。
11. ステップ8と9を繰り返す。
12. 40 µl の 4 M NH₄OAc と 300 µl の 95% エタノールを加える。
注意：直ちに次の沈殿操作に移ってください。チューブを-20℃で保存しないでください。この温度に長期間さらすと、塩類が沈殿して好ましくありません。
13. ボルテックスで十分に混合した後、室温、14,000 rpm で20分間遠心する。
14. 上清を注意深く取り除く。（[α-³²P]dCTP を用いた場合は、沈殿の放射活性をガイガーカウンターで確認する。）
15. 沈殿に500 µl の 80% エタノールを加えて洗浄する。
16. 14,000 rpm で10分間遠心する。
17. 上清を注意深く取り除く。（[α-³²P]dCTP を用いた場合は、沈殿の放射活性をガイガーカウンターで確認する。）
18. 沈殿を10分程度風乾し、残っているエタノールを蒸発させる。
19. 50 µl の滅菌水で沈殿を溶かす。
20. その6 µl を新しい微量遠心チューブに移し、-20℃で保存する。合成された二本鎖 cDNA の収率とサイズ分布を調べるために *Rsa*I 処理を行う時（セクション V.A 参照）まで、このサンプルを保存する。
21. 次の E 項に進む。

E. *Rsa*I 消化

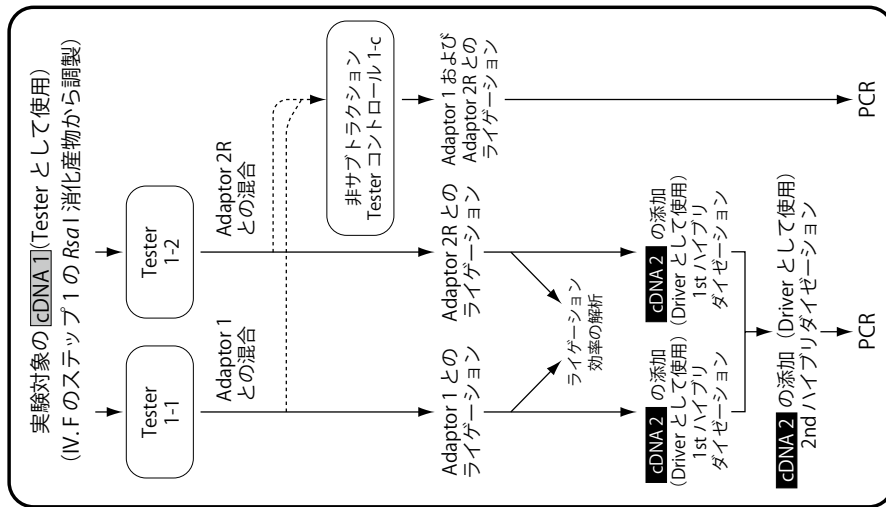
ds Tester cDNA、ds Driver cDNA、およびコントロール骨格筋 cDNA を用いて次の操作を行います。このステップでは、平滑末端をもつ短い二本鎖（ds）cDNA フラグメントが生成します。このフラグメントは、サブトラクション操作に最適で、次項 F のアダプターライゲーションに必要なものです。

1. チューブに以下の試薬を加える。

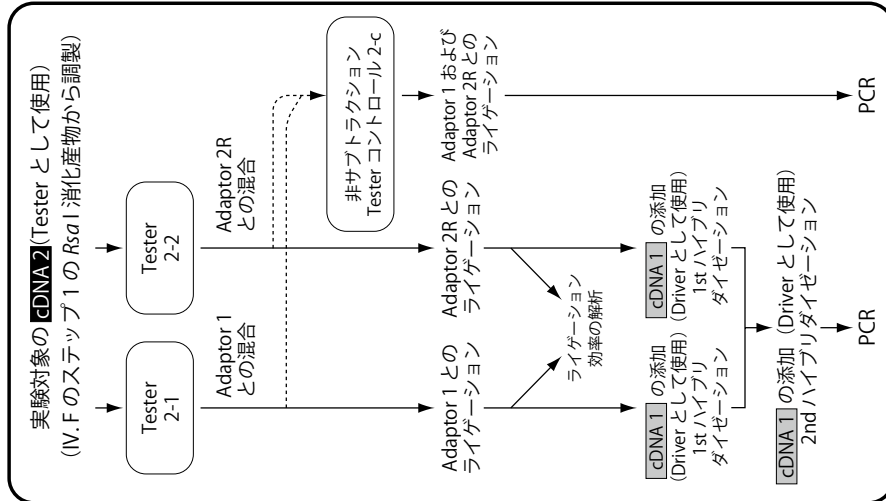
ds cDNA	43.5 µl
10 × <i>Rsa</i> I Restriction Buffer	5.0 µl
<i>Rsa</i> I (10 units/µl)	1.5 µl
2. ボルテックスで混合した後、チューブを軽く遠心する。
3. 37℃で1.5時間インキュベートする。
4. *Rsa*I 消化の効率を調べるために（セクション V.B）、消化混液（ステップ3の液）を5 µl 取って残しておく。
5. 残りの消化混液に20 × EDTA/Glycogen Mix を2.5 µl 加え、反応を止める。
6. 50 µl のフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール（25：24：1）を加える。
7. ボルテックスで十分に混合した後、室温、14,000 rpm で10分間遠心し、二層に分ける。
8. 上部の水層を注意深く集め、新しい0.5 ml 微量遠心チューブに移す。
9. 50 µl のクロロホルム：イソアミルアルコール（24：1）を加える。
10. ステップ7と8を繰り返す。
11. 25 µl の 4 M NH₄OAc と 187.5 µl の 95% エタノールを加える。
注意：直ちに次の沈殿操作に移ってください。チューブを-20℃で保存しないでください。この温度に長期間さらすと、好ましくない塩類が沈殿します。
12. ボルテックスで十分に混合した後、室温、14,000 rpm で10分間遠心する。
13. 上清を注意深く取り除く。
14. 沈殿に200 µl の 80% エタノールを加えて洗浄する。
15. 14,000 rpm で5分間遠心する。

-
16. 注意深く上清を取り除く。([α -³²P]dCTP を用いた場合は、沈殿の放射活性をガイガーカウンターで確認する。)
 17. 沈殿を 5 ～ 10 分間風乾する。
 18. 沈殿を 5.5 μ l の H₂O に溶かし、- 20℃で保存する。
得られた *Rsa* I 消化 cDNA サンプルは、実験対象の Driver cDNA およびコントロール骨格筋 Driver cDNA として利用する。また次項 F では、得られた *Rsa* I 消化 cDNA サンプルにアダプターをライゲーションし、フォワード、コントロール、リバーズ（適用する場合）・サブトラクションに用いる Tester cDNA を合成する。
 19. ステップ 4 で残しておいた *Rsa* I 消化 cDNA サンプルを、セクション V.B に記載されている方法に従ってアガロース /EtBr ゲルで電気泳動し、その状態を調べる。次に、セクション IV.F に進み、実験対象の Tester cDNA とコントロール骨格筋 Tester cDNA の調製を行う。

A フォワード・サブトラクション



B リバース・サブトラクション



C コントロール・サブトラクション

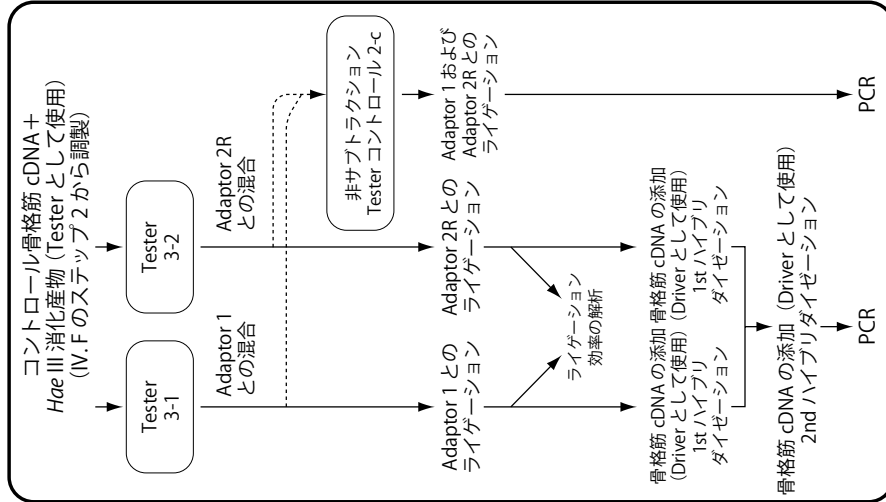


図 3. ハイブリダイゼーション用および PCR 用のアダプター結合 Tester cDNA の調製
 それぞれの Tester cDNA (目的の cDNA と骨格筋 Tester cDNA) には適切なアダプターを結合する必要がある。**パネル A.** フォワード・サブトラクションは目的の実験である。**パネル B.** Tester と Driver を逆に用いる (つまり、Tester を Driver とし、Driver を Tester として用いる) サブトラクションで、サブトラクション cDNA ライブラリーのディアレンシャルスクリーニング (セクション VI) に用いる。**パネル C.** コントロール・サブトラクション

F. アダプターライゲーション

アダプター結合 Tester cDNA の調製法のフローチャートを図 3 に示します。サブトラクションライブラリーのディファレンシャルスクリーニングを計画している場合は、それぞれの Tester/Driver cDNA の組み合わせを逆に、両方のサブトラクション操作を行う必要があります（詳しくはセクション VI をご覧ください）。図 3A のフォワード・サブトラクションでは、Poly A⁺ RNA サンプル 1 (cDNA 1, Tester) では発現しているが、Poly A⁺ RNA サンプル 2 (cDNA 2, Driver) では発現していない塩基配列が濃縮されます。図 3B はリバーズ・サブトラクションを示しています。リバーズ・サブトラクションでは、cDNA 2 を Tester とし cDNA 1 を Driver として使用します。結果として、2 種類のサブトラクション cDNA ポピュレーションが得られます。つまり、フォワード・サブトラクションを行って得られた cDNA は、サンプル 1 で特異的に発現している mRNA に由来する cDNA を含み、リバーズ・サブトラクションを行って得られた cDNA はサンプル 2 で特異的に発現している mRNA に由来する cDNA を含んでいます。サンプル 1 で特異的に発現している配列だけに興味がある場合でも、リバーズ・サブトラクションから得られた cDNA をディファレンシャルスクリーニングに利用することができます（セクション VI）。

両方のサブトラクションを行うためには、Poly A⁺ RNA サンプルのそれぞれに対応する Tester cDNA を調製する必要があります。また、コントロール・サブトラクション（パネル C）も行うべきです。下記のステップ 2 では、コントロール骨格筋 cDNA と Φ X174/*Hae* III DNA を混合して、コントロール・サブトラクション用の Tester cDNA を調製します。

図 3 に示すように、それぞれの実験対象の Tester cDNA に対して 3 つのアダプターライゲーションを行わなければなりません。これは、コントロール骨格筋 Tester cDNA に対しても同様です。それぞれの cDNA サンプルを 2 本のチューブに分け、一方には Adaptor 1 (Tester 1-1, 2-1, 3-1) をライゲーションし、他方には Adaptor 2R (Tester 1-2, 2-2, 3-2) をライゲーションします。ライゲーション反応の準備ができれば、それぞれの Tester チューブから一部を取って混合します。これにより、両方のアダプターがライゲーションによって結合する DNA が作製されます（非サブトラクション Tester コントロール 1-c, 2-c, 3-c）。非サブトラクション Tester コントロール（サブトラクションを行わない Tester のコントロール）cDNA は、ライゲーションの陽性コントロールとして使用します。また、後のステップではサブトラクションの陰性コントロールとなります。

注：これ以後の操作では、本ユーザーマニュアルの命名法に従って、それぞれのチューブに表示をすると便利です。また、途中の産物のチューブに操作ステップの番号を表示すると便利です。図 3 を参照することで、複数のサンプルの位置づけを容易に行うことができます。

Driver cDNA にアダプターをライゲーションしてはならない

1. 実験対象の Tester cDNA の希釈：

実験対象の *Rsa* I 消化 cDNA (IV.E のステップ 19) をそれぞれ 1 μ l ずつ取り、5 μ l の滅菌水で希釈する。

SMARTer Pico PCR cDNA Synthesis Kit を用いて cDNA を調製した場合は、SMARTer 法に従って調製された *Rsa* I 消化 cDNA をこのステップで希釈する。

2. コントロール骨格筋 Tester cDNA の調製：

- Control DNA (*Hae* III 消化 Φ X174 DNA [3 ng/ μ l]) を滅菌水で希釈して、最終濃度を 150 ng/ml にする。
- 1 μ l のコントロール骨格筋 cDNA (IV.E のステップ 19) に、希釈した Φ X174/*Hae* III Control DNA 溶液 (150 ng/ml) を 5 μ l 加えて混合する。

これがコントロール骨格筋 Tester cDNA です。この溶液には 0.2% の *Hae* III 消化 Φ X174 DNA が含まれており、各フラグメントは cDNA 全体の約 0.02% に相当します。骨格筋 Tester cDNA から骨格筋 Driver cDNA をサブトラクションする（差し引く）と、最終ステップの PCR 反応で生成される主要バンドは、これらのコントロール・フラグメントに対応することになるはずです。

SMARTer Pico PCR cDNA Synthesis Kit から cDNA を調製した場合は、SMARTer 法に従ってヒト胎盤 cDNA を用いて上記のステップ 2 を繰り返す必要があります (方法は SMARTer ユーザーマニュアルに記載されています)。これ以降の PCR-Select の操作手順では、コントロール骨格筋 cDNA と並行してコントロールヒト胎盤 cDNA を分析してください。

アダプター結合 Tester cDNA の調製:

3. 次の試薬を 0.5 ml 微量遠心チューブに入れて混合し、ライゲーション用 Master Mix を調製する。充分量の Master Mix を確保するために、すべてのライゲーション反応回数分 + 1 回分の量を準備する。

1 反応 (チューブ) 当たりの流量

滅菌水	3 μ l
5 $\times$ Ligation Buffer	2 μ l
T4 DNA Ligase (400 units/ μ l)	1 μ l

注意: ライゲーションに必要な ATP は T4 DNA Ligase に含まれています (初期濃度 3 mM, 最終濃度 300 μ M)。

4. 実験対象の各 Tester cDNA とコントロール骨格筋 Tester cDNA について、表 1 の試薬を表示の順序に従って 0.5 ml 微量遠心チューブに加える。上下に穏やかにピペティングして十分に液を混合する。

表 1. ライゲーション反応の準備
(実験対象の各 Tester cDNA とコントロール骨格筋 cDNA についても同様に準備する)

コンポーネント	チューブ番号	
	1 Tester 1-1 *	2 Tester 1-2 *
希釈した Tester cDNA (ステップ 1)	2 μ l	2 μ l
Adaptor 1 (10 μ M)	2 μ l	—
Adaptor 2R (10 μ M)	—	2 μ l
Master Mix	6 μ l	6 μ l
最終容量	10 μ l	10 μ l

* : Tester 2-1 と 2-2、および 3-1 と 3-2 に対しても同様に準備する。

5. 新しい微量遠心チューブに 2 μ l の Tester 1-1 と 2 μ l の Tester 1-2 を加える。ライゲーションを行えば、これが非サブトラクション Tester コントロール 1-c となる (図 3 参照)。他の Tester cDNA とコントロール骨格筋 Tester cDNA に対しても同じ操作を行う。それぞれの非サブトラクションコントロール Tester チューブでは、ライゲーションを行うと、約 1/3 の cDNA 分子が 2 種類の異なるアダプターをもつことになる。
6. 軽く遠心した後、16°C で一晩インキュベートする。
7. 1 μ l の EDTA/Glycogen mix を加え、ライゲーション反応を止める。
8. 72°C で 5 分間加熱し、リガーゼを不活性化する。
9. チューブを軽く遠心する。
これで、実験対象の **アダプター結合 Tester cDNA**、**アダプター結合コントロール骨格筋 Tester cDNA** および **非サブトラクション Tester コントロール** が調製されたことになる。
10. それぞれの非サブトラクション Tester コントロール (1-c、2-c、3-c) から 1 μ l を取り、1 ml の H₂O で希釈する。これらのサンプルは以後の PCR 反応 (セクション IV.I) で使用する。
11. サンプルを -20°C で保存する。

次項 G のハイブリダイゼーションに進む前に、セクション V. C に記載されている方法に従って、ライゲーション効率を調べてください。ライゲーションが充分でなかった場合は、先に進まずに、もう一度ライゲーション反応をやり直してください。

G. 1st ハイブリダイゼーション

以下の操作では、各 Tester cDNA に過剰量の Driver cDNA を加え、熱変性してからアニーリングを行います。Tester cDNA と Driver cDNA に存在する発現差のない cDNA は、ハイブリッドを形成します。そのため、残存する 1 本鎖 cDNA (2nd ハイブリダイゼーションの対象となる cDNA) には、発現差のある配列が非常に効率よく濃縮されます。

重要：ハイブリダイゼーションを行う前に、**4 × Hybridization buffer** を室温まで温めておいてください (少なくとも 15 ~ 20 分以上、室温で放置してください)。このバッファーを使用する前に、沈殿物がないことを確認してください。沈殿物が見られた場合は、このバッファーを 37℃ で約 10 分間加温し、沈殿を完全に溶かしてください。

1. それぞれの実験対象およびコントロールのサブトラクションを行うために、表 2 の試薬を表示の順序に従って 0.5 ml チューブに加えて混合する。

**表 2. 1st ハイブリダイゼーションの準備
(実験対象の各 Tester cDNA とコントロール骨格筋 cDNA についても同様に準備する)**

コンポーネント	ハイブリダイゼーションサンプル	
	1 Tester 1-1 *	2 Tester 1-2 *
Rsa I 消化 driver cDNA (IV.E.18)	1.5 µl	1.5 µl
Adaptor1 結合 Tester 1-1 * (IV.F.9)	1.5 µl	—
Adaptor2R 結合 Tester 1-2 * (IV.F.9)	—	1.5 µl
4 × Hybridization buffer	1.0 µl	1.0 µl
最終容量	4.0 µl	4.0 µl

* : Tester 2-1 と 2-2、および 3-1 と 3-2 に対しても同様に準備する。

2. ミネラルオイルを各サンプルに 1 滴加え、チューブを軽く遠心する。
3. サーマルサイクラーを用いて、各サンプルを 98℃ で 1.5 分間インキュベートする。
4. 次に 68℃ で 8 時間インキュベートする (ハイブリダイゼーション) *。直ちに次項 H に進む。
* : ハイブリダイゼーション時間を 6 ~ 12 時間にしても構いません。ただし、12 時間を超えるインキュベーションは行わないでください。

H. 2nd ハイブリダイゼーション

1st ハイブリダイゼーションを行った 2 種類のサンプルと、新たに調製した変性 (一本鎖) Driver cDNA を同時に混合し、発現差のある配列をさらに濃縮します。異なるアダプターを末端に結合したハイブリッド分子が新たに生成します。これが発現差のある cDNA に相当します。

重要：この段階で、1st ハイブリダイゼーション後のサンプルを熱変性させてはいけません。また、新たな Driver を加えるのに必要な時間以上、サンプルをサーマルサイクラーから取り出さないでください。

実験対象の各 Tester cDNA とコントロールの骨格筋 cDNA のサンプルに対して、次の操作を行います。

1. 滅菌チューブに次の試薬を加える。

Driver cDNA (IV.E のステップ 18)	1 µl
4 × Hybridization Buffer	1 µl
滅菌水	2 µl
2. この混液から 1 µl を取り、0.5 ml 微量遠心チューブに移す。ミネラルオイルを 1 滴加え、液の上に重層する。
3. サーマルサイクラーを用いて、98℃ で 1.5 分間インキュベートする。
4. 新たに調製した熱変性 Driver のチューブをサーマルサイクラーから取り出す。

以下の操作手順に従って、この Driver サンプルをハイブリダイゼーションサンプル 1 および 2（セクション IV.G で調製したもの；表 2 参照）と同時に混合する。この操作を行えば、新たに調製した熱変性 Driver の存在下でのみ 2 種類のハイブリダイゼーションサンプルが混合されることになる。

- a. マイクロピペッターを 15 μ l にセットする。
 - b. ハイブリダイゼーションサンプル 2 を含むチューブを選択し、ミネラルオイルとサンプルの境界面にピペットチップの先端をゆっくりと接触させる。
 - c. ピペットチップ内部にサンプル全体を注意深く吸引する。サンプルにミネラルオイルが少し混入しても差し支えない。
 - d. チューブからピペットチップを取り出し、少量の空気をチップ内に吸引して、わずかな空気層をサンプルの液滴の下に作る。
 - e. このピペットチップをそのまま用いて、新たに調製した変性 Driver を含むチューブに対して、b～d のステップを繰り返す。ピペットチップ内には、2 種類のサンプル（ハイブリダイゼーションサンプル 2 と変性 Driver）が少量の空気を隔てて存在することになる。
 - f. チップ内の全溶液を、ハイブリダイゼーションサンプル 1 を含むチューブに移す。
 - g. 上下にピペッティングして液を混合する。
5. 必要であれば、チューブを軽く遠心する。
 6. 68℃で一晩インキュベートする。
 7. 200 μ l の Dilution buffer をチューブに加え、ピペッティングにより液を混合する。
 8. サーマルサイクラーを用いて、68℃で 7 分間加熱する。
 9. - 20℃で保存する。

I. PCR 増幅

本項で述べる 2 回の PCR 反応を行うことで、発現差のある cDNA が選択的に増幅されます。PCR を行う前に、75℃で短時間プレインキュベートし、アダプターの陥入末端を埋めて二本鎖にします（IV.I のステップ 6）。この操作によって、PCR Primer 1 の結合サイトが形成されます（図 2 参照）。1st PCR 増幅では、異なるアダプターを末端にもつ二本鎖 cDNA だけが指数関数的に増幅されます。2nd PCR 増幅では、Nested PCR を行うことによりバックグラウンドをさらに減少させるとともに、発現差のある塩基配列を濃縮します。

図 3 に示すように、少なくとも 7 種類の PCR 反応、つまり (1) フォワード・サブトラクションを行った実験対象の cDNA、(2) 非サブトラクション Tester コントロール (1-c)、(3) リバーシ・サブトラクションを行った実験対象の cDNA、(4) リバーシ・サブトラクションの場合の非サブトラクション Tester コントロール (2-c)、(5) サブトラクションを行ったコントロール骨格筋 cDNA、(6) コントロール・サブトラクションの場合の非サブトラクション Tester コントロール (3-c)、および (7) PCR control subtracted cDNA（キットに含まれている）に対して PCR 反応を行うことをお勧めします。PCR control subtracted cDNA は PCR の陽性コントロールであり、*Hae* III 消化 Φ X174 DNA 混合物を含んでいます。また、標準的な PCR コントロール（Advantage cDNA PCR Kit に含まれている陽性コントロール用テンプレート等）に対しても PCR を行い、用いた酵素が効率的に機能していることを確認することをお勧めします。

注：

- 本マニュアルのサイクリング条件は、Perkin-Elmer DNA Thermal Cycler 480 および Perkin-Elmer GeneAmp PCR Systems 2400/9600 の使用をもとに最適化されています。他のサーマルサイクラーを用いる場合は、サイクリング条件の最適化を行う必要があるかもしれません。
- Advantage cDNA Polymerase Mix を用いない場合は、Taq DNA ポリメラーゼを単独で使用することもできます。ただし、1st PCR 増幅と 2nd PCR 増幅のサイクル数を 3～5 回増やす必要があります。また、ホットスタート法を用いなければなりません（詳細はセクション IV.A をご覧ください）。クロンテックの TaqStart Antibody（製品コード 639250/639251；Advantage Polymerase Mix にも含まれている）を用いるのが最適です。あるいは次のようにしてホットスタートを行うこともできます。(1) Taq ポリメラーゼを抜いた 1st PCR 増幅用の PCR Master Mix を調製する。(2) PCR サンプルを混合したのち、反応混液を 75℃で 1 分間加熱する。(3) 必要量の Taq ポリメラーゼを素早く添加する。(4) 75℃で 5 分間インキュベートする。(5) 本項 I のステップ 8 に従って PCR を行う。

- a. 希釈した cDNA (IV.H のステップ 9 の各サブトラクションサンプルと IV.F のステップ 10 の対応する非サブトラクション Tester コントロール) を 1 μ l ずつとり、適切な名称を付けたチューブに移す。
 - b. 1 μ l の PCR control subtracted cDNA (キットに含まれている) を、適切な表示を付けたチューブに移す。
2. 1st PCR 増幅に必要な Master Mix を調製する。必要なすべての PCR 反応分 + 1 反応分の量を調製する。表 3 の試薬を表示の順序に従って加えて混ぜる。

表 3. 1st PCR 用 Master Mix の調製

試薬	1 反応 (チューブ) 当たりの液量	7 反応当たりの液量*
滅菌水	19.5 μ l	156.0 μ l
10 $\times$ PCR reaction buffer	2.5 μ l	20.0 μ l
dNTP Mix (10 mM)	0.5 μ l	4.0 μ l
PCR Primer 1 (10 μ M)	1.0 μ l	8.0 μ l
50 $\times$ Advantage cDNA Polymerase Mix	0.5 μ l	4.0 μ l
最終容量	24.0 μ l	192.0 μ l

*: 実験対象の cDNA を追加する場合、必要な反応回数分 + 1 回分の Master Mix を調製する。

3. ボルテックスで十分に混合した後、チューブを軽く遠心する。
4. 24 μ l の Master Mix をステップ 1 の反応チューブに加える。
5. 50 μ l のミネラルオイルを重層する (ホットリッド付のサーマルサイクラーを用いる場合は不要)。
6. 反応チューブをサーマルサイクラーにセットし、75°C で 5 分間インキュベートしてアダプターを伸長させる (反応が終わってもサーマルサイクラーからサンプルを取り出さないこと)。
注: このステップで、一本鎖の状態のアダプターの相補鎖を合成する (図 2 参照)。これにより、PCR プライマーの結合サイトが作られる。
7. 直ちにサーマルサイクリングを開始する。

Perkin-Elmer DNA Thermal Cycler 480	Perkin-Elmer GeneAmp PCR Systems 2400 or 9600
27 サイクル:	• 94°C 25 秒
• 94°C 30 秒	27 サイクル:
• 66°C 30 秒	• 94°C 10 秒
• 72°C 1.5 分	• 66°C 30 秒
	• 72°C 1.5 分

8. 反応後の各チューブから 8 μ l ずつ取り、1 $\times$ TAE バッファーを用いた 2.0% アガロース /EtBr ゲル電気泳動で増幅産物を分析する (予想される結果についてはセクション V.D を参照)。あるいは、これらのサンプル 8 μ l を別に保存し、2nd PCR の増幅産物を分析する時に、同じゲルでそれらと一緒に電気泳動しても良い (ステップ 16)。
9. 1st PCR 増幅を行った後の各 PCR 反応液を 3 μ l ずつ取り、27 μ l の H₂O を加えて希釈する (適用可能な場合、この希釈された 1 回目の PCR 産物を PCR Select Differential Screening 操作に用いる)。
10. ステップ 9 の希釈した PCR 反応液を 1 μ l ずつ取り、適切な表示を付けたチューブに移す。
11. 2nd PCR 増幅に必要な Master Mix を調製する。必要なすべての PCR 反応分 + 1 反応分の量を用意する。表 4 に示す試薬を表示の順番通りに加えて混ぜる。

表 4. 2nd PCR 用 Master Mix の調製

試薬	1 反応 (チューブ) 当たりの液量	7 反応当たりの液量*
滅菌水	18.5 μ l	148.0 μ l
10 $\times$ PCR reaction buffer	2.5 μ l	20.0 μ l
Nested PCR プライマー 1 (10 μ M)	1.0 μ l	8.0 μ l
Nested PCR プライマー 2R (10 μ M)	1.0 μ l	8.0 μ l
dNTP mix (10 mM)	0.5 μ l	4.0 μ l
50 $\times$ Advantage cDNA Polymerase Mix	0.5 μ l	4.0 μ l
最終容量	24.0 μ l	192.0 μ l

*：実験対象の cDNA を追加する場合、必要な反応回数分 + 1 回分の Master Mix を調製する。

12. ボルテックスで十分に混合した後、チューブを軽く遠心する。
13. 24 μ l の Master Mix を、ステップ 10 の各反応チューブに加える。
14. ミネラルオイルを 1 滴加え、液の上に重層する（ホットリッド付のサーマルサイクラーを用いる場合は不要）。
15. 直ちにサーマルサイクリングを開始する。

Perkin-Elmer DNA Thermal Cycler 480	Perkin-Elmer GeneAmp PCR Systems 2400 or 9600
--	--

10 ~ 12 サイクル：

• 94°C	30 秒	• 94°C	10 秒
• 68°C	30 秒	• 68°C	30 秒
• 72°C	1.5 分	• 72°C	1.5 分

16. 反応後の各チューブから 8 μ l ずつ取り、1 $\times$ TAE バッファーを用いた 2.0% アガロース / EtBr ゲル電気泳動で増幅産物を分析する（予想される結果についてはセクション V.D を参照）。
17. 反応後の PCR 産物を -20°C で保存する。
この PCR 産物には、発現差のある (differentially expressed) cDNA が濃縮されています。また、最初の mRNA サンプルで発現量が大幅に異なっている場合でも、発現差のある転写産物はほぼ等しい割合で cDNA として存在しているはずで、これらの結果の解析については、セクション V.D と V.E を参照してください。骨格筋 Poly A⁺ RNA 由来 cDNA を用いたコントロール・サブトラクションの実験例を、図 6 に示します。

サブトラクション効率のテストを行うことを強くお勧めします。効率テストの例を、図 7 と図 8 に示します。

クローニングしていないサブトラクション cDNA 混合物は、ゲノム DNA や完全長 cDNA、YAC、BAC、コスミドクローンライブラリーのスクリーニングのための理想的なハイブリダイゼーションプローブです (Diatchenko *et al.*, 1996)。これ以外の目的には、クローニングを行ってサブトラクション cDNA ライブラリーを作製してください。このサブトラクション cDNA は、直接 T/A クローニングベクターに挿入できます。また、Adaptor 1 の Not I (Sma I, Xma I) サイトや Adaptor 2R の Eag I サイトを利用した部位特異的なクローニング、あるいはアダプター / cDNA 接合部の Rsa I サイトを利用した平滑末端クローニングも行えます。サブトラクション cDNA ライブラリーの解析には、以下のような様々な方法を利用できます。

● ディファレンシャルスクリーニング

クロンテックの PCR-Select Differential Screening Kit (製品コード 637403) には、ディファレンシャルスクリーニングに必要な試薬が含まれ、さらにコントロールと詳細なユーザーマニュアルも含まれています。ディファレンシャルスクリーニングの詳しい説明は、セクション VI をご覧ください。

●ノーザン解析

個々のクローンの発現パターンを確認するために、ノーザンブロット分析を利用できます。弊社の実験では、発現差のある mRNA 由来のクローンが様々な割合でサブトラクション cDNA ライブラリーに含まれており、発現差が大きいクローンの割合は 95% (Diatchenko *et al.*, 1996), 発現差が中程度のものは 40 ~ 60% (Gurskaya *et al.*, 1996; von Stain *et al.*, 1997), 発現差が小さいものは 5% (Diatchenko *et al.*, 1998) 含まれていました。サブトラクション cDNA ライブラリーから無作為に 10 ~ 20 個のクローンをピックアップし、これらをプローブとしてノーザンブロット分析を行うことをお勧めします。発現差のある遺伝子に由来するクローンが 1 つ以下しか確認できなかった場合は、ディファレンシャルスクリーニングを行って偽陽性クローンを除いてください。

●Virtual Northern 解析

Poly A⁺ RNA が足りなくて標準的なノーザンブロット分析を行えない場合は、“Virtual (仮想的な) ” Northern ブロットを行うことにより同様の情報が得られます (Endege *et al.*, 1999)。Virtual Northern ブロット法を行う場合は、SMARTer Pico PCR cDNA Synthesis Kit (製品コード 634928) を用いて total RNA や Poly A⁺ RNA サンプルから SMARTer cDNA を調製します。次に SMARTer cDNA をアガロース /EtBr ゲルで電気泳動し、*in situ* で変性させた後、ナイロンメンブレンに転写します。SMARTer cDNA 合成法と Virtual Northern ブロット法の詳細については弊社のウェブサイト www.clontech.com をご覧ください。

V. 結果の分析とトラブルシューティングガイド

A. 二本鎖 cDNA 合成産物の分析

1. 一般的な推奨事項

- a. cDNA 合成の進行状況と収量をモニターするために、実験対象のサンプルと添付のコントロール骨格筋 Poly A⁺ RNA を並行して用いて 1st strand cDNA と 2nd strand cDNA を合成してください。cDNA の合成と精製をモニターするために、1st strand 反応ミックスに [α -³²P]dCTP を添加することをお勧めします。
- b. 高品質の Poly A⁺ RNA をご使用ください。二本鎖 cDNA の収量は RNA の品質に依存します。
一般的には、2 μ g の骨格筋由来コントロール Poly A⁺ RNA から約 2 μ g の二本鎖 cDNA が合成されます。実験対象の Poly A⁺ RNA が高品質であれば、通常は同程度の cDNA (1 ~ 2 μ g) が得られます。cDNA 合成と *Rsa*I 消化の効率をアガロースゲル電気泳動で分析してください。その一例を図 4 に示します。

2. 二本鎖 cDNA 合成のトラブルシューティング

- a. 骨格筋 Poly A⁺ RNA から合成した二本鎖 cDNA に比べて実験対象の二本鎖 cDNA の収量は低かったが、サイズ分布はほぼ同じであることがアガロースゲル電気泳動の結果からわかった場合は、その cDNA をそのまま使用してもかまいません。しかし、発現差のある配列のうち発現量の少ないものを、すでに失ってしまった可能性が非常にあります。それが気になる場合は、Poly A⁺ RNA 濃度を増やして 1st strand cDNA 合成を繰り返してください。
- b. アガロースゲル電気泳動したときに実験対象の cDNA がスミア (1 ~ 2 kb 以下) として現れた場合は、RNA に不純物が含まれていたか RNA が分解していた可能性があります。出発材料として用いた RNA をホルムアルデヒド変性 1%アガロース /EtBr ゲル電気泳動で分析してください。分解されていない哺乳動物由来の total RNA では、28S rRNA と 18S rRNA に対応する 2 つの鮮明なバンドがそれぞれ 4.5 kb 付近と 1.9 kb に現れ、その強度比は約 1.5 ~ 2.5 : 1 です。哺乳動物由来の Poly A⁺ RNA は 0.5 ~ 12 kb の間にスミアとして現れ、それに伴って弱いリボソーム RNA のバンドも見られます。哺乳動物以外の種の Poly A⁺ RNA のサイズ分布はこれよりも狭く (0.5 ~ 3 kb) なると思われます。実験対象の RNA が予想よりも小さかった場合 (例えば 1 ~ 2 kb 以下)、および (あるいは) 28S RNA と 18S RNA のバンドの強度比が 1 : 1 よりも小さかった場合は、その RNA の質が悪いことを示しています。この場合は、RNase や他の不純物が混入していないかどうかすべての RNA 単離試薬をチェックしてください。混入しているようであれば、新たな試薬を用いて RNA を調製し直してください。それでも問題が解決しない場合は、クローンテックの Premium Poly A⁺ RNA のような他の組織や細胞の RNA 源を探してください。質の悪い、または分解した RNA を用いるとサブトラクション操作のバックグラウンドが高くなるため、それを出発材料として用いないでください。
- c. 1st strand cDNA 合成に用いる Poly A⁺ RNA の至適濃度は 50 ~ 200 μ g/ml です。これ以下の濃度の RNA を用いると、合成された cDNA 産物のサイズ分布が小さくなるおそれがあります。

B. *Rsa*I 消化の分析

2.5 μ l の未消化の二本鎖 cDNA (セクション IV.D) と 5 μ l の *Rsa*I 消化 cDNA (セクション IV.E) を、1 $\times$ TAE バッファーを用いた 1% アガロース /EtBr ゲル上で並べて電気泳動します。Poly A⁺ RNA 由来の二本鎖 cDNA は 0.5 ~ 10 kb の間にスメアとして現れます。明瞭なバンドは、量的に多い mRNA や rRNA に対応します。(哺乳動物以外の種の RNA サンプルでは、サイズ分布が 0.5 ~ 3 kb に過ぎないものもあります。) *Rsa*I 消化をすると、cDNA の平均サイズは小さくなります (0.5 ~ 10 kb のものが 0.1 ~ 2 kb になります)。 *Rsa*I 消化によって実験対象のサンプルやコントロール cDNA のサイズ分布が小さくならなかった場合は、フェノール-クロロホルム抽出、エタノール沈殿、*Rsa*I 消化を繰り返してください。

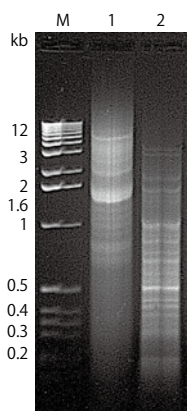


図 4. *Rsa*I 消化前 (レーン 1) と消化後 (レーン 2) の骨格筋由来二本鎖 cDNA (陽性コントロール)

キットに含まれているヒト骨格筋コントロール Poly A⁺ RNA からプロトコールに従って cDNA を合成した。レーン M : DNA サイズマーカー

C. ライゲーションの分析

少なくとも 25%以上の cDNA がその両端にアダプターを有していることを確認するために、以下の PCR 実験を行うことをお勧めします。この実験では、Tester 1-1 と Tester 1-2 のアダプター/cDNA 接合部にまたがる領域を増幅するようにデザインされています（セクション IV.F 参照）。同様に、アダプター結合コントロール骨格筋 cDNA（3-1 と 3-2）に対してもこの分析を行ってください。リバーシ・サブトラクションを行う場合は、その Tester cDNA（2-1 と 2-2）に対しても適用してください。コントロール実験に用いる G3PDH Primer はヒト、マウス、およびラットの遺伝子の場合に使用できます。その他の生物種を対象とする場合は、適切なプライマーを設計してください。

注：用いる酵素が十分な活性を持っていることを確認するために、テンプレートとしてスタンダード PCR コントロール（例えば、Advantage cDNA PCR Kit に含まれている陽性コントロール用テンプレート等）も用いて、PCR 反応を一緒に行うことをお勧めします。

1. セクション IV.F のライゲーションを行った cDNA 溶液（例えば、Tester 1-1 および Tester 1-2）から各 1 μ l を取り、200 μ l の H₂O に加えて希釈する。
2. 4 本の別のチューブに、表 5 の試薬を加えて混合する。

表 5. ライゲーション分析の準備
(実験対象の各 tester cDNA と骨格筋コントロール cDNA についても同様に準備する)

コンポーネント	チューブ：	1	2	3	4
Tester 1-1 * (Adaptor1 とライゲーションしたもの)		1 μ l	1 μ l	—	—
Tester 1-2 * (Adaptor2R とライゲーションしたもの)		—	—	1 μ l	1 μ l
G3PDH 3' Primer (10 μ M)		1 μ l	1 μ l	1 μ l	1 μ l
G3PDH 5' Primer (10 μ M)		—	1 μ l	—	1 μ l
PCR Primer 1 (10 μ M)		1 μ l	—	1 μ l	—
最終容量		3 μ l	3 μ l	3 μ l	3 μ l

*：Tester 2-1 と 2-2、および 3-1 と 3-2 に対しても同様に調製する。

3. すべての反応チューブの本数 + 1 本分に必要な Master Mix を調製する。表 6 の試薬を表示の順序に従って加えて混合する。

表 6. ライゲーション分析に用いる PCR Master Mix の調製

コンポーネント	1 反応 (チューブ) 当たりの量	4 反応 (チューブ) 当たりの量
滅菌水	18.5 μ l	92.5 μ l
10 × PCR reaction buffer	2.5 μ l	12.5 μ l
dNTP mix (10 mM)	0.5 μ l	2.5 μ l
50 × Advantage cDNA Polymerase Mix	0.5 μ l	2.5 μ l
最終容量	22.0 μ l	110.0 μ l

4. ボルテックスで十分に混合した後、チューブを軽く遠心する。
5. ステップ 2 の各反応チューブに、22 μ l の Master Mix を加える。
6. ボルテックスで十分に混合した後、チューブを軽く遠心する。
7. 50 μ l のミネラルオイルを重層する（ホットリッド付のサーマルサイクラーを用いる場合は不要）。
8. サーマルサイクラーを用いて各反応混液を 75℃ で 5 分間インキュベートし、アダプターを伸長させる（サンプルをサーマルサイクラーから取り出さないでください）。

注：このステップは、アダプターの陥入末端を埋めて（一本鎖の状態のアダプターの相補鎖を合成して）、PCR プライマーの結合サイトを作るために行う（図 2 参照）。

9. 直ちにサーマルサイクリングを開始する。

Perkin-Elmer DNA Thermal Cycler 480	Perkin-Elmer GeneAmp PCR Systems 2400 or 9600
20 サイクル： • 94℃ 30 秒 • 65℃ 30 秒 • 68℃ 2.5 分	20 サイクル： • 94℃ 10 秒 • 65℃ 30 秒 • 68℃ 2.5 分

10. 各チューブから 5 μ l ずつとり、1 $\times$ TAE バッファーを用いた 2.0% アガロース /EtBr ゲル電気泳動を行って増幅産物を分析する。

典型的な結果を図 5 に示します。20 サイクル後に生成物を確認できなかった場合は、さらに反応を 5 サイクル行い、その生成物をゲル電気泳動で確認してください。組織間で G3PDH 発現量が異なるため、サイクル数の延長が必要になるかもしれません。なお、骨格筋では G3PDH の発現量は比較的高いです。図 5 に示すように、1 つの遺伝子特異的プライマー (G3PDH 3' Primer) と PCR Primer 1 を用いた PCR 産物のバンド強度は、2 つの遺伝子特異的プライマー (G3PDH 3' Primer と 5' Primer) で増幅した PCR 産物のそれとほぼ同じになるはずですが、これらの PCR 産物のバンド強度が 4 倍以上異なっていれば、ライゲーション効率は 25% 未満であることとなります。このような場合は、サブトラクション効率も著しく低下します。

マウスまたはラットの cDNA を実験対象とする場合は、G3PDH 3' Primer と PCR Primer 1 から増幅される PCR 産物の大きさは約 1.2 kb であり、ヒト cDNA の場合 (0.75 kb) と異なります (ラットとマウスの G3PDH cDNA には *Rsa* I 切断サイトが存在しないためです)。ヒト cDNA (*Rsa* I サイトを含む) を実験対象とする場合、予想されるサイズのバンドと共に 1.2 kb のバンドが認められたら、それは cDNA の消化が充分ではないことを意味します。この未消化産物の量が多い場合は、*Rsa* I 消化を繰り返してください。

上記の分析でライゲーション反応が不十分であることが判明した場合、沈殿ステップで cDNA に塩類が混入してしまった、あるいは 2nd strand 合成が不十分であったという可能性があります。したがって、PCR-Select 操作を 1st strand cDNA の合成 (セクション IV.C) から繰り返してください。

RNA の量が足りなくて cDNA を再び合成できない場合は、残しておいた実験対象の *Rsa* I 消化 cDNA とコントロール *Rsa* I 消化 cDNA を沈殿させます (セクション IV.E のステップ 18 で、4.5 μ l を残しているはずですが)。各 cDNA サンプルに 2.5 μ l の 4 M NH₄OAc と 20 μ l の 95% エタノールを加えた後、セクション IV.E のステップ 12 ~ 18 を行います。その後アダプターライゲーションを行います。アダプターライゲーションの失敗を解決するために、最初の対応策として再沈殿操作を行うことはお勧めしません。cDNA の回収率が低くなり、結果としてサブトラクション効率も低下してしまうおそれがあるからです。

図 5. ライゲーション効率の分析の典型的な例

ヒト・サンプルを用いて行った結果を示す。マウスやラットのサンプルの場合では、G3PDH 3' Primer と PCR Primer 1 (レーン 1、3) を用いて増幅した PCR 産物は 0.75 kb ではなく約 1.2 kb の位置に現れる。

レーン M: Φ X174 DNA/*Hae* III 消化サイズマーカー

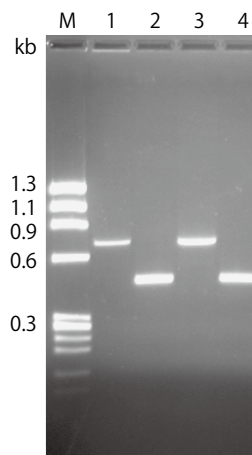
レーン 1: Tester 1-1 (Adaptor 1 をライゲーションしたもの) をテンプレートとし、G3PDH 3' Primer と PCR Primer 1 を用いて増幅した PCR 産物。

レーン 2: Tester 1-1 (Adaptor 1 をライゲーションしたもの) をテンプレートとし、G3PDH 3' Primer と G3PDH 5' Primer を用いて増幅した PCR 産物。

レーン 3: Tester 1-2 (Adaptor 2R をライゲーションしたもの) をテンプレートとし、G3PDH 3' Primer と PCR Primer 1 を用いて増幅した PCR 産物。

レーン 4: Tester 1-2 (Adaptor 2R をライゲーションしたもの) をテンプレートとし、G3PDH 3' Primer と G3PDH 5' Primer を用いて増幅した PCR 産物。

2% アガロース /EtBr ゲルを用いて電気泳動した。



D. PCR 産物の分析

1. 1st PCR で得られた PCR 産物のアガロース /EtBr ゲル電気泳動：

実験対象のサンプルと PCR control subtracted cDNA (キットに含まれている) の PCR 産物を隣り合わせで一緒に泳動します。PCR control subtracted cDNA の場合、27 サイクル後に現れる主要バンドは、Φ X174/*Hae* III フラグメントに対応します。この結果は、実施した骨格筋コントロールサブトラクションに似ていますが、正確な Φ X174/*Hae* III バンドは 2nd PCR 増幅後に初めて現れると思われます。実験対象のサンプルの場合では、サブトラクションの 1st PCR 増幅産物は、通常 0.2 ~ 2 kb にスメアとして現れ、それとともに明瞭なバンドがいくつか認められることもあります。

- 27 サイクル後に PCR 産物が全く認められない場合は、さらに PCR を 3 サイクル行い、ゲル電気泳動で分析してください。
- サブトラクションしたサンプル、サブトラクションしなかったサンプル (非サブトラクション Tester コントロール 1-c)、および PCR control subtracted mixture のいずれの場合でも PCR 産物を検出できない場合は、ポリメラーゼが機能しているかどうか確認する必要があります。
ポリメラーゼ・ミックスに問題がなければ、アニーリング温度と伸長温度を少しずつ下げてセクション IV.I のステップ 7 のサイクリング条件の最適化を試みてください。それらを下げすぎると、バックグラウンドが顕著に増大します。最初は、アニーリング温度を 66°C から 64°C に、伸長温度を 72°C から 71°C に変更するところから始めてください。
- PCR 産物が非サブトラクションサンプル (非サブトラクション Tester コントロール 1-c) では認められるが、サブトラクションサンプルでは認められない場合は、2nd PCR のサイクル数を増やしてください。

2. 2nd PCR で得られた PCR 産物のアガロース /EtBr ゲル電気泳動：

PCR Control Subtracted cDNA (キットに含まれている) と骨格筋コントロールサブトラクションの 2nd PCR 産物の泳動パターンは、図 6 のパターンと似ているはずですが。これらのバンドに加え、少数のバンドが現れるかもしれません。実験対象のサブトラクション 2nd PCR 産物は、通常、スメアとして現れ、さらに明瞭なバンドがいくつか一緒に現れる場合もあります。

- PCR control subtracted mixture で Φ X174/*Hae* III バンドが認められない場合は、PCR 条件を最適化する必要があります。
- 非サブトラクション骨格筋コントロールで明瞭な Φ X174/*Hae* III バンドが認められる場合は、cDNA の合成収率が非常に低いか、フェノール-クロロホルム抽出あるいはエタノール沈殿の過程で骨格筋 cDNA の大部分が失われた可能性があります。
- 予想される Φ X174/*Hae* III バンドが PCR control subtracted mixture では認められるが、骨格筋コントロールサブトラクションでは認められない (例えば、スメアやランダムなサイズのバンドが得られる) 場合は、サブトラクションが最適でなかった可能性があります。最も可能性の高い原因の 1 つは、ライゲーション効率が低いことです (セクション V.C のトラブルシューティング参照)。
- 上記 c の場合で、ライゲーション効率が高いことが確認された場合は、プロトコールに正しく従っているかを確認し、再度サブトラクション操作を行ってください。通常、ハイブリダイゼーションの過程で問題が生じることはありません。
- 12 サイクル後に PCR 産物が検出されない場合は、さらに PCR を 3 サイクル行い、生成物をゲル電気泳動でチェックしてください。サイクル数を増やしすぎると、バックグラウンドが増大します。
- サブトラクションがうまくいった場合では、両方のアダプターを結合した非サブトラクション cDNA (非サブトラクション Tester コントロール 1-c) のバンドパターンは、サブトラクション DNA サンプルのバンドパターンとは異なるはずですが (図 6)。

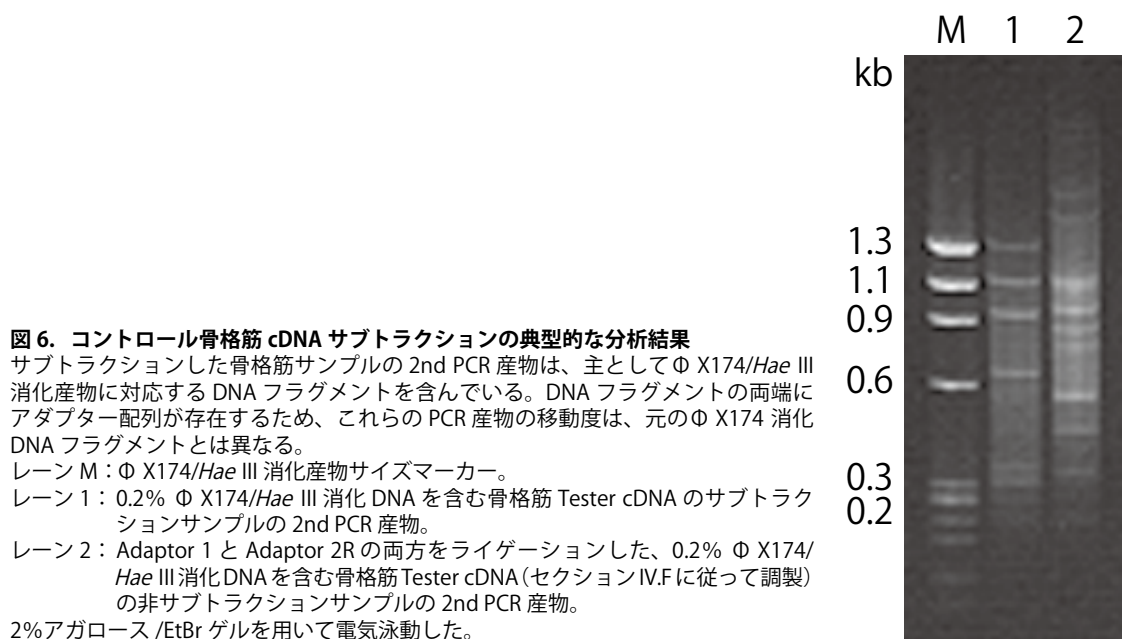


図 6. コントロール骨格筋 cDNA サブトラクションの典型的な分析結果

サブトラクションした骨格筋サンプルの 2nd PCR 産物は、主として Φ X174/*Hae* III 消化産物に対応する DNA フラグメントを含んでいる。DNA フラグメントの両端にアダプター配列が存在するため、これらの PCR 産物の移動度は、元の Φ X174 消化 DNA フラグメントとは異なる。

レーン M: Φ X174/*Hae* III 消化産物サイズマーカー。

レーン 1: 0.2% Φ X174/*Hae* III 消化 DNA を含む骨格筋 Tester cDNA のサブトラクションサンプルの 2nd PCR 産物。

レーン 2: Adaptor 1 と Adaptor 2R の両方をライゲーションした、0.2% Φ X174/*Hae* III 消化 DNA を含む骨格筋 Tester cDNA (セクション IV.F に従って調製) の非サブトラクションサンプルの 2nd PCR 産物。

2% アガロース / EtBr ゲルを用いて電気泳動した。

E. PCR を用いたサブトラクション効率の分析

PCR 分析 (本セクション) あるいはハイブリダイゼーション分析 (セクション V.F) を行うことによって、サブトラクション効率を推定することができます。いずれの場合も、既知の cDNA の存在量をサブトラクション操作の前後で比較します。比較する 2 種類の RNA ソース間で、発現差があることが知られている遺伝子と、発現差のないことが知られている遺伝子 (例えば、ハウスキープینگ遺伝子) の両方について行うことが理想的です。PCR 分析はハイブリダイゼーション分析よりも短時間で結果が得られます。

以下に述べる試験では、キットに含まれている G3PDH プライマーを用いて、サブトラクション後に G3PDH の相対量が低下していることを確認します。この G3PDH プライマーはヒト、マウスおよびラットの遺伝子にしか適用できませんので注意してください。他の種の場合は、適切なプライマーをご自分で設計する必要があります。

すべてのハウスキープینگ遺伝子の転写産物が均等にサブトラクションされる (差し引かれる) わけではありません。ほとんどの組織や細胞株で G3PDH は非常に効率よくサブトラクションされますが、骨格筋や心臓など例外もあります。そのため、骨格筋コントロールでは G3PDH の相対転写量をもとにサブトラクションの効率を分析することはお勧めできません。骨格筋で発現している他のほとんどのハウスキープینگ遺伝子の転写産物は非常に効率よくサブトラクションされますので、それらを用いて解析を行ってください。一般に、サブトラクションを行っても G3PDH の存在量があまり低下しない場合は、他のハウスキープینگ遺伝子 (例えば、 α -tubulin など) の転写産物の存在量をチェックしてください。コントロール骨格筋サブトラクションの場合では、 Φ X174/*Hae* III 消化産物のアガロースゲル電気泳動パターン (図 6 のレーン 2) を見れば、サブトラクションの成否を判断できます。

ハウスキープینگ遺伝子によっては、Tester Poly A⁺ RNA と Driver Poly A⁺ RNA での発現量が異なる場合があります。仮に G3PDH の転写産物の濃度が Tester サンプルで 2 倍高かったとしても、G3PDH の転写産物は効率的にサブトラクション (消去) されないと思われます。両方向のサブトラクション (セクション IV.F 参照) を行い、フォワード・サブトラクションとリバース・サブトラクションの両方に対して非サブトラクション Tester コントロールを調製している場合は、サブトラクション効率を PCR で分析することによって、比較する 2 種類の cDNA サンプル間での G3PDH の存在量の違いを知ることができます。G3PDH の存在量に違いがある場合は、サブトラクション効率を調べるコントロールとして別のハウスキープینگ遺伝子を選んでください。

1. サブトラクションを行ったサンプルの 2 nd PCR 産物とサブトラクションを行わなかったサンプル（非サブトラクション Tester コントロール 1-c と 2-c）の 2 nd PCR 産物をそれぞれ H₂O で 10 倍希釈する。サブトラクション PCR 産物と非サブトラクション PCR 産物の濃度をほぼ等しくする。
2. 以下の試薬を表示の順序に従って 0.5 ml 微量遠心チューブに添加する。

	反応液 1	反応液 2
希釈したサブトラクション cDNA（2nd PCR 増幅産物）	1.0 μ l	—
希釈した非サブトラクション Tester コントロール 1-c（2nd PCR 増幅産物）	—	1.0 μ l
G3PDH 3' Primer（10 μ M）	1.2 μ l	1.2 μ l
G3PDH 5' Primer（10 μ M）	1.2 μ l	1.2 μ l
滅菌水	22.4 μ l	22.4 μ l
10 $\times$ PCR reaction buffer	3.0 μ l	3.0 μ l
dNTP Mix（10 mM）	0.6 μ l	0.6 μ l
50 $\times$ Advantage cDNA Polymerase Mix	0.6 μ l	0.6 μ l
最終容量	30.0 μ l	30.0 μ l

3. ボルテックスで十分に混合した後、チューブを軽く遠心する。
4. ミネラルオイルを 1 滴加えて重層する（ホットリッド付のサーマルサイクラーを用いる場合は不要）。
5. 以下の温度サイクル条件に従って、18 サイクルの PCR を行う。
 - ・ 94 $^{\circ}$ C 30 秒
 - ・ 60 $^{\circ}$ C 30 秒
 - ・ 68 $^{\circ}$ C 2 分
6. 各反応チューブから 5 μ l ずつとり、新しいチューブに移す。残りの溶液をサーマルサイクラーに戻し、さらにサイクリングを 5 回行う。
7. ステップ 6 をさらに 2 回繰り返す（28 回目と 33 回目のサイクル後に 5 μ l ずつ取る）。
8. 5 μ l の各サンプル（18, 23, 28, 33 回目のサイクルの後にサンプリングしたもの）を 2.0% アガロース / EtBr ゲルで電気泳動する。

サブトラクション操作が成功し、G3PDH が低下した例を図 7 に示します。非サブトラクション cDNA の場合では、特定の cDNA 中の G3PDH の存在量に応じて、18 ～ 23 サイクル後に G3PDH の増幅産物を確認できます。ちなみに、骨格筋や心臓由来の Poly A⁺ RNA では、G3PDH が非常に多く含まれています。一方、サブトラクションサンプルの場合では、非サブトラクション cDNA の場合よりも約 5 ～ 15 サイクル後でないと増幅産物を確認できません。

サブトラクションサンプルで G3PDH の存在量の低下が認められない場合は、PCR 増幅をやり直してください（セクション IV.I）。1st PCR と 2nd PCR の 2 つの独立した PCR を行い、その両方における G3PDH の存在量を調べます。サブトラクション操作の 1st ハイブリダイゼーションの過程で、一本鎖 Tester 分子の均等化が起こります。その結果、2nd ハイブリダイゼーションの過程で、それぞれの末端に異なるアダプターをもつ cDNA 分子が非常に低い濃度で形成されます（セクション I および図 2 参照）。希釈されたサブトラクション cDNA 溶液 1 μ l には、これらの標的分子が約 10,000 個しか含まれません。たまたま G3PDH mRNA に対応する分子が 1 個存在しただけで、G3PDH の存在量が低下したとは見えなくなります。サブトラクション cDNA の独立した PCR 増幅で G3PDH 存在量の減少が見られたら、先に行った操作でこの偶然の出来事が起こったと考えられます。

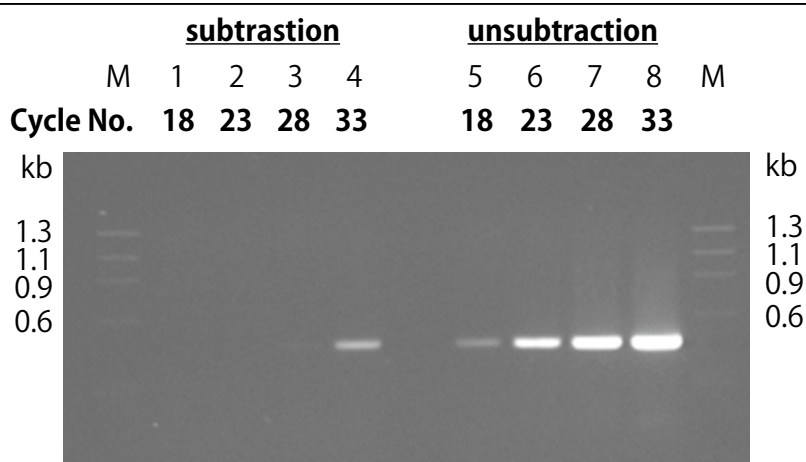


図 7. PCR-Select サブトラクションによる G3PDH 存在量の減少

Tester cDNA はヒト精巣の Poly A⁺ RNA から調製し、Driver cDNA は 10 種類の異なるヒト組織の Poly A⁺ RNA 混合物から調製した。サブトラクション 2nd PCR 産物 (レーン 1 ~ 4) と非サブトラクション 2nd PCR 産物 (レーン 5 ~ 8) に対し、キットに含まれている G3PDH 5' Primer と G3PDH 3' Primer を用いて PCR を行った。レーン 1 & 5: 18 サイクル; レーン 2 & 6: 23 サイクル; レーン 3 & 7: 28 サイクル; レーン 4 & 8: 33 サイクル; レーン M: マーカー。

発現差のある遺伝子の濃縮の陽性コントロール実験として、Tester RNA では発現し Driver RNA では発現しないことがすでに知られている遺伝子の PCR プライマーを用いて、上記の操作を繰り返してください。この cDNA はサブトラクション操作によって濃縮されるはずですが、このようなプライマーを用いて PCR 増幅した場合、サブトラクションサンプルと非サブトラクションサンプルから等量の PCR 産物を得るために必要なサイクル数の違いはサブトラクション効率を反映しています。5 サイクルの遅れは約 20 倍の cDNA 濃縮に相当します。サブトラクションの過程で均等化が起こるため、濃縮のレベルは、発現差のある各遺伝子の初期濃度、ならびに Tester および Driver に含まれる各遺伝子の存在量の違いに依存します。Tester cDNA 中に低濃度で含まれる発現差のある遺伝子は、高濃度で含まれるそれよりも高い率で濃縮されます。

注意：

- PCR プライミングサイト間に *Rsa*I 切断サイトが存在する cDNA フラグメントを増幅するような PCR プライマーは使用しないでください。
- 配列によっては、再ハイブリダイゼーションや増幅が困難なものもあります。また、同一の cDNA から他の cDNA フラグメントが著しく濃縮される場合もあります (Hubank & Schatz, 1994; Wang & Brown, 1991)。ハイブリダイゼーション分析を行えば、失われているように見える cDNA フラグメントについての詳細な情報が得られる可能性があります。

F. ハイブリダイゼーションを用いたサブトラクション効率の分析

サブトラクション cDNA の 2nd PCR 産物と非サブトラクション cDNA (非サブトラクション Tester コントロール 1-c) の 2nd PCR 産物を異なる遺伝子プローブでドットプロットあるいはサザンブロット分析することにより、サブトラクションの成否を調べることができます。図 8 は、サブトラクション後に、ハウスキーピング遺伝子の cDNA 存在量が低下し、誘導発現された既知遺伝子の cDNA の存在量が上昇することを示しています。

サザンブロット分析はサブトラクション効率を知るための高感度な指標ですが、予想外のサイズのバックグラウンド・バンドがたまに認められることがあります。このようなバックグラウンド・バンドと“真のバンド”(本当にサブトラクションされた遺伝子を示すバンド)を区別するために、2つの基準を設ける必要があります。

第一の基準は、真のバンドであれば、その強度はサブトラクションの過程で用いた PCR サイクル数に比例して増加するはずであるということです。時として、最も多いサイクル数の場合 (1st PCR のサイクル数が 30 回を超える場合) にのみ非常に強いバンドが現れることがあります。このようなバンドはバックグラウンドであるとみなすべきです。さらに、バンドが1つのサンプル画分にのみ現れ、他の画分には現れないことも時折あります。これらのバンドは、コンタミネーションによるものと考えられます。つまり、サブトラクティブハイブリダイゼーション後に標的分子の濃度が非常に低下するため、PCR の過程で偶然コンタミネーションが起こるとその影響が結果に大きく現れるものと考えられます。

第二の基準は、真のバンドであれば、両方のプライマーセット (Primary プライマーと Nested プライマー) で増幅されるはずだということです。アダプターの内側部分に結合する Nested Primer を用いて得られた PCR 産物は、アダプターの外側末端部分を認識するプライマーを用いて得られた 1stPCR 産物よりもわずかに小さくなるため、真のバンドであれば、2nd PCR 増幅後の分子量は低分子側に若干シフトします。

図 9 は、サザンブロットで観察される可能性のあるバックグラウンドの例を示しています。この実験では、抗 T 細胞レセプター抗体で刺激した T 細胞ハイブリドーマ (Tester) と刺激しなかった T 細胞ハイブリドーマ (Driver) からそれぞれ Poly A⁺ RNA を調製し、PCR-Select cDNA サブトラクションを行いました。G3PDH と α -tubulin の 2 つのハウスキーピング遺伝子のプローブを用いたサザンブロット法でサブトラクション効率を評価しました (このデータはロックフェラー大学の Wong *et al.* のご厚意で提供されたものです。詳しくは Clonetechniques 1996 年 7 月号の掲載記事をご覧ください)。

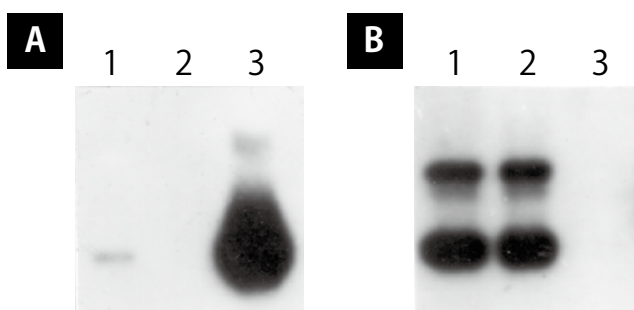


図 8. Jurkat 細胞における発現差のある遺伝子の濃縮と発現量の多いハウスキーピング遺伝子の低減化

Tester cDNA は、2 μ g/ml PHA (phytohemagglutinin) および 2 ng/ml PMA (phorbol 12-myristate 12-acetate) の存在下で 72 時間培養したヒト Jurkat 細胞から調製した。Driver cDNA は未処理の Jurkat 細胞から調製した。非サブトラクション Tester cDNA、非サブトラクション Driver cDNA、およびサブトラクション cDNA から調製した 2nd PCR 産物の各 15 μ l を 1.5% アガロースゲル (レーン当たり 0.3 μ g) で電気泳動した後、ナイロンフィルターに転写し、IL-2R プローブ (パネル A) あるいは G3PDH プローブ (パネル B) をハイブリダイズさせた。レーン 1: 非サブトラクション Tester cDNA の 2nd PCR 産物; レーン 2: 非サブトラクション Driver cDNA の 2nd PCR 産物; レーン 3: サブトラクション cDNA の 2nd PCR 産物。 (Gurskaya *et al.*, 1996)

G3PDH をプローブとしたサザンプロットの場合（パネル A）では、バンド A が真のバンドであると考えられます。上述の 2 つの基準（PCR サイクル数に比例してバンド強度が増大し、2nd PCR の後の分子量は低分子側に若干シフトする）を満たしているからです。これとは対照的に、他のバンドは、基準を満たしていないため、バックグラウンドであると考えられます。サブトラクションサンプル画分で現れている 3 つのバンド（B）は、おそらくサブトラクションライブラリーに高濃度に濃縮された PCR 産物であり、単に含量が高いために G3PDH プローブとクロスハイブリダイゼーションしたのであると考えられます。実際このプローブは、G3PDH DNA を含んでいない分子量マーカー（C）ともクロスハイブリダイゼーションしています。クロスハイブリダイゼーションが起こったのは、分子量マーカーが過剰に存在しているためであると思われます。また、これらのバックグラウンド・バンドが生じた別の理由として、PCR プライマーが遺伝子特異的配列と部分的な相同性をもっているという可能性も挙げられます。

これとは対照的に、 α -tubulin プローブを用いたサザンプロットの場合（パネル B）では、バックグラウンドはほとんど認められず、生成したすべてのバンドが真のバンドである可能性が非常に高いと言えます。2 つのプロットからわかるように、1st PCR のサイクル数が 30 回を超えると、そして 2nd PCR のサイクル数が 14 回を超えると、バックグラウンドは急激に増加します。

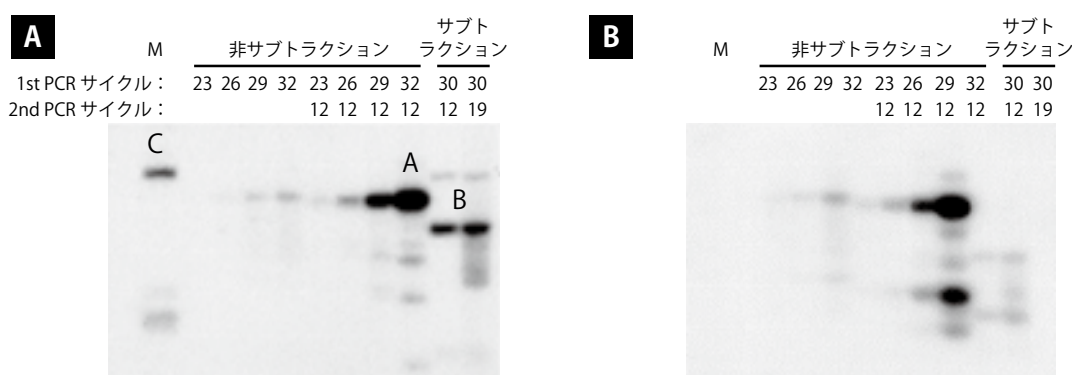


図 9. PCR-Select サブトラクション効率のサザンプロット分析

Tester cDNA は、抗 T 細胞レセプター抗体で処理した T 細胞ハイブリドーマ（KMIs-8.3.5.1）から調製した。Driver cDNA は、未処理の T 細胞ハイブリドーマから調製した。PCR 産物を 2.0% アガロースゲルで電気泳動した後、ナイロンメンブレンに転写し、ハウスキーピング遺伝子の放射性標識プローブをハイブリダイズさせた。1st PCR および 2nd PCR のサイクル数を各レーンの上部に示している。M = DNA マーカー。

パネル A：G3PDH プローブを用いたサザンハイブリダイゼーション。このプロットは、バックグラウンドに相当するバンドがかなり多く認められる高バックグラウンドの例（悪い例）である。A のバンドは“真のバンド”を示し、B と C のバンドは 2 つのタイプのバックグラウンドを示す。

パネル B： α -tubulin プローブを用いたサザンハイブリダイゼーション。パネル A のプロットとは対照的に、このプロットではバックグラウンドがかなり低く、きれいなバンドが現れている（良い例）。

VI. サブトラクションライブラリーのディファレンシャルスクリーニング

多くの場合、PCR-Selection cDNA Subtraction Kit を用いることにより、発現差のある遺伝子を非常に濃縮することができます。それでもなお、サブトラクションサンプルには、Tester サンプルと Driver サンプルの両方に共通して存在する mRNA に対応する cDNA が残っていると思われる。このバックグラウンドは、精製された RNA の品質やサブトラクションの達成度に多少は依存しますが、主な原因は Tester サンプルと Driver サンプルとで発現量が異なる mRNA 分子種が極めて少ないことです。一般に、発現量に違いのある mRNA 分子種が少数で、発現量の差が小さければ、発現差のある cDNA を十分に濃縮できたとしても、バックグラウンドは高くなってしまいます。バックグラウンドが高い場合は、ノーザンブロット解析を行うためにサブトラクションライブラリーからランダムにクローンを拾わなければなりません、それは時間がかかり非効率的です。ノーザンブロット解析を行う前にディファレンシャルスクリーニングを行って、バックグラウンドを最小限にすることをお勧めします。

サブトラクション cDNA ライブラリーのディファレンシャルスクリーニングには2つの方法があります。第一の方法は、Tester と Driver から 1st strand cDNA として合成した ³²P 標識プローブを、サブトラクション cDNA ライブラリーとハイブリダイゼーションする方法です (Hedrick *et al.*, 1984; Sakaguchi *et al.*, 1986)。発現差のある mRNA に対応するクローンは、Tester プローブだけと反応し、Driver プローブとは反応しないはず。この方法は広く用いられていますが、大きな欠点があります。すなわち、検出可能なハイブリダイゼーションシグナルを生じるのは、発現量の多い mRNA (cDNA プローブ全体の中で約 0.2% 以上を占める cDNA に対応する mRNA 分子種) に対応する cDNA に限られることです (Wang & Brown, 1991)。このスクリーニング法では、発現量の差はあるが、全体として発現量の少ない mRNA に対応するクローンは検出できません。

第二の方法は、発現量の少ない配列を見逃すという問題を避けることができます。この方法では、フォワード・サブトラクションとリバース・サブトラクション後の cDNA をそれぞれプローブとして用いて、サブトラクションライブラリーとハイブリダイズさせます (Lukyanov *et al.*, 1996; Wang & Brown, 1991)。リバース・サブトラクション cDNA プローブを調製するためには、元の Tester cDNA を Driver に、元の Driver cDNA を Tester にしてサブトラクティブハイブリダイゼーションを行います。本当に発現差のある mRNA に対応するクローンであれば、フォワード・サブトラクション cDNA プローブとのみハイブリダイズするはず。リバース・サブトラクション cDNA プローブとハイブリダイズするクローンはバックグラウンドと考えられます。この方法では、ステップがさらに一つ必要です。つまり、プローブとして使用する前に、フォワード・サブトラクション cDNA プローブとリバース・サブトラクション cDNA プローブを制限酵素で消化し、アダプター配列を除去する必要があります。サイズは小さいですが、アダプターが存在すると、サブトラクション cDNA プローブとサブトラクション cDNA ライブラリーのハイブリダイゼーションを行った時に、バックグラウンドが非常に高くなってしまいます。

クロンテックの PCR-Select Differential Screening Kit (製品コード 637403) には、サブトラクション cDNA ライブラリーのスクリーニングに用いるサブトラクション cDNA プローブと非サブトラクション cDNA プローブを調製するために必要な全てのものが含まれています。このキットを用いれば、ノーザン解析におけるシグナル/バックグラウンド比を良好にすることができます。PCR-Select Differential Screening Kit の詳細については、ユーザーマニュアル (PT3831-1)、またはクロンテックのウェブサイト (www.clontech.com) をご覧ください。

VII. 参考文献

- Barnes, W. M. (1994) PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from λ bacteriophage templates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**(6):2216-2220.
- Cao, W., Epstein, C., Liu, H., DeLoughery, C., Ge, N., Lin, J., Diao, R., Cao, H., Long, F., Zhang, X., Chen, Y., Busche, S., Wenck, M., Wong, K., Saltzman, A.G., Tang, Z., Liu, L., & Zilberstein, A. (2004) Comparing gene discovery from Affymetrix GeneChip microarrays and Clontech PCR-Select cDNA subtraction: a case study. *BMC Genomics* **5**(1):26-32.
- CapFinder™ PCR cDNA Synthesis Kit (October 1996) Clontech **XI**(4):2-3.
- Chenchik, A., Moquadam, F. & Siebert, P. D. (1996) A new method for full-length cDNA cloning by PCR. In *A Laboratory Guide to RNA Isolation, Analysis, and Synthesis*, ed. Krieg, P. A. (Wiley-Liss, Inc., NY) pp. 273-321.
- Chenchik, A., Zhu, Y., Diatchenko, L., Li, R., Hill, J. & Siebert, P. (1998) Generation and use of high-quality cDNA from small amounts of total RNA by SMART PCR. In *RT-PCR Methods for Gene Cloning and Analysis*. In *RT-PCR Methods for Gene Cloning and Analysis*. Eds. Siebert, P. & Larrick, J. (BioTechniques Books, MA), pp. 305-319.
- Cheng, S., Fockler, C., Barnes, W. M. & Higuchi, R. (1994) Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**(12):5695-5699.
- D'Aquila, R. T., Bechtel, L. J., Videler, J. A., Eron, J. J., Gorczyca, P. & Kaplan, J. C. (1991) Maximizing sensitivity and specificity by preamplification heating. *Nucleic Acids Res.* **19**(13):3749.
- Davis M. M., Cohen, D. I., Nielsen, E. A., Steinmetz, M., Paul, W. E., and Hood, L. (1984) Cell-type-specific cDNA probes and the murine I region: the localization and orientation of Ad alpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**(7):2194-2198.
- Diatchenko, L., Chenchik, A., and Siebert, P. (1998) Suppression subtractive hybridization: A method for generating subtracted cDNA libraries starting from poly (A⁺) or total RNA. In *RT-PCR Methods for Gene Cloning and Analysis*. Eds. Siebert, P. & Larrick, J. (BioTechniques Books, MA), pp. 213-239.
- Diatchenko, L., Lau, Y.-F. C., Campbell, A. P., Chenchik, A., Moquadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E. D. & Siebert, P. D. (1996) Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**(12):6025-6030.
- Duguid, J. R. & Dinauer, M. C. (1990) Library subtraction of *in vitro* cDNA libraries to identify differentially expressed genes in scrapie infection. *Nucleic Acids Res.* **18**(9):2789-2792.
- Endege, W. O., Steinmann, K. E., Boardman, L. A., Thibodeau, S. N. & Schlegel, R. (1999) Representative cDNA libraries and their utility in gene expression profiling. *BioTechniques* **26**(3):542-550.
- Farrell, Jr., R. E. (1993) *RNA Methodologies: A Guide for Isolation and Characterization* (Academic Press, San Diego, CA).
- Gurskaya, N. G., Diatchenko, L., Chenchik, A., Siebert, P. D., Khaspekov, G. L., Lukyanov, K. A., Vagner, L. L., Ermolaeva, O. D., Lukyanov, S. A., and Sverdlov, E. D. (1996) Equalizing cDNA subtraction based on selective suppression of polymerase chain reaction: Cloning of Jurkat cell transcripts induced by phytohemagglutinin and phorbol 12-myristate 13-acetate. *Anal. Biochem.* **240**(1):90-97.
- Hara E., Kato, T., Nakada, S., Sekiya, S. & Oda, K. (1991) Subtractive cDNA cloning using oligo(dT)₃₀-latex and PCR: isolation of cDNA clones specific to undifferentiated human embryonal carcinoma cells. *Nucleic Acids Res.* **19**(25):7097-7104.
- Hedrick, S. M., Cohen, D. I., Neilson, E. A. & Davis, M. M. (1984) Isolation of cDNA clones encoding T cell-specific membrane-associated proteins. *Nature* **308**(5955):149-153.

Hubank, M. & Schatz, D. G. (1994) Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. *Nucleic Acids Res.* **22**(25):5640-5648.

Identifying T-cell signaling molecules with the Clontech PCR-Select cDNA Subtraction Kit. (July 1996) *Clontechniques* **XI**(3):32-33.

James, B. D. & Higgins, S. J. (1985) *Nucleic Acid Hybridization* (IRL Press Ltd., Oxford).

Jeong M. H., Jin, Y. H., Kang E. Y., Jo, W. S., Park, H. T., Lee, J. D., Yoo., Y. J. & Jeong S. J. (2004) The modulation of radiation-induced cell death by genistein in K562 cells: Activation of thymidine kinase 1. *Cell Res.* **14**(4):295-302.

Kellogg, D. E., Rybalkin, I., Chen, S., Mukhamedova, N., Vlasik, T., Siebert, P. & Chenchik, A. (1994) TaqStart Antibody: Hotstart PCR facilitated by a neutralizing monoclonal antibody directed against Taq DNA polymerase. *BioTechniques* **16**(6):1134-1137.

Knaup, K.X. & Roemer K. (2004) Cell type-specific regulation of calmodulin 2 expression by mutant p53. *FEBS Letters* **569**(1-3):70-74.

Lian, Z., Liu, J., Li, L., Tufan, N. L., Wu, M. C., Wang., H. Y., Arbuthnot, P., Kew, M. & Feitelson, M. A. (2004) Human S15a expression is upregulated by hepatitis B virus X. *Mol. Carcinog.* **40**(1):34-46.

Lukyanov, K. A., Launer, G. A., Tarabykin, V. S., Zaraisky, A. G., & Lukyanov, S. A. (1995) Inverted terminal repeats permit the average length of amplified DNA fragments to be regulated during preparation of cDNA libraries by polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* **229**:198-202.

Lukyanov, K. A., Matz, M. V., Bogdanova, E. A., Gurskaya, N. G. & Lukyanov, S. A. (1996) Molecule by molecule PCR amplification of complex DNA mixtures for direct sequencing: An approach to *in vitro* cloning. *Nucleic Acids Res.* **24**(2):2194-2195.

Matz, M., Lukyanov, S., Bogdanova, E., Diatchenko, L., & Chenchik, A. (1999) Amplification of cDNA ends based on template-switching effect and step-out PCR. *Nucleic Acids Res.* **27**(11):1558-1560.

Norton, P. A., Reis, H. M., Prince, S., Larkin, J., Pan, J., Liu, J., Gong, Q., Zhu, M. & Feitelson, M. A. (2004) Activation of fibronectin gene expression by hepatitis B virus x antigen. *J. Viral Hepat.* **11**(4):332-341.

Pan J., Clayton, M. & Feitelson M. A. (2004) Hepatitis B virus x antigen promotes transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) activity by upregulation of TGF-beta1 and downregulation of alpha2-macroglobulin. *J. Gen. Virol.* **85**(Pt. 2):275-282.

PCR-Select Differential Screening Kit (April 1997) *Clontechniques* **XII**(2):18-19.

Sakaguchi, N., Berger, C. N. & Melchers, F. (1986) Isolation of cDNA copy of an RNA species expressed in murine pre-B cells. *EMBO J.* **5**(9):2139-2147.

Sambrook, J. & Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Edition (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

Sargent, T. D. & Dawid, I. B. (1983) Differential gene expression in the gastrula of *Xenopus laevis*. *Science* **222**(4620):135-139.

Siebert, P. D., Chenchik, A., Kellogg, D. E., Lukyanov, K. A. & Lukyanov, S. A. (1995) An improved method for walking in uncloned genomic DNA. *Nucleic Acids Res.* **23**(6):1087-1088.

Wang, Z. & Brown, D. D. (1991) A gene expression screen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**(24):11505-11509.

PCR-Select テクノロジーに関する重要な文献

サブプレッション・サブトラクティブハイブリダイゼーション技術は、クロンテックの PCR-Select cDNA Subtraction Kit の構築の基礎となっている技術で、Diatchenko *et al.* (1996) によって最初に発表されました。以下の文献（参考文献のリストに含まれています）は、PCR-Select テクノロジーを用いて得られた実験データを掲載しています。

Cao *et al.* (2004)
Knaup *et al.* (2004)
Norton *et al.* (2004)

Jeong *et al.* (2004)
Lian *et al.* (2004)
Pan *et al.* (2004)

PCR-Select を用いた文献の更なるリストについては、クロンテックのウェブサイト (www.clontech.co.jp) をご覧ください。

補遺 A：サプレッション PCR

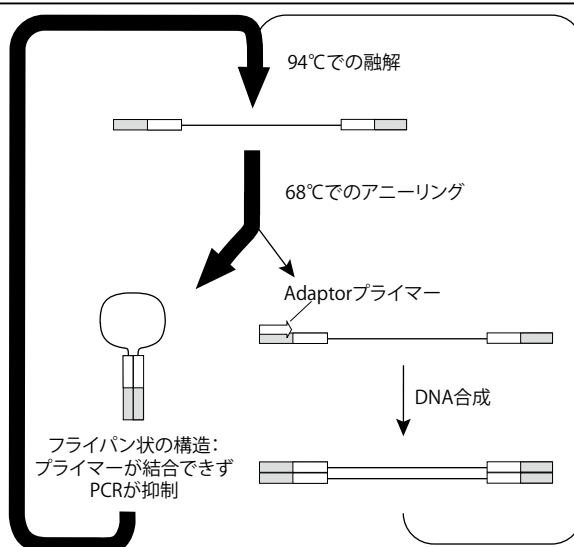


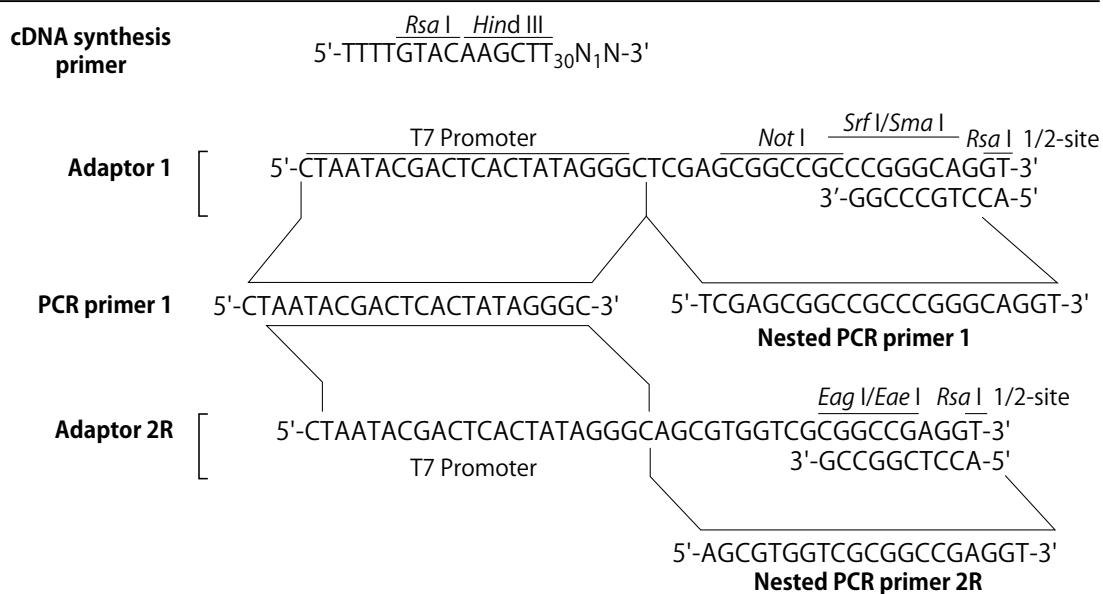
図 10. サプレッション PCR

PCR-Select cDNA アダプターは、サプレッション PCR と呼ばれる方法によって、望ましくない増幅反応が PCR の過程で起こらないよう設計されています (U.S. Patent #5,565,340; Siebert *et al.*, 1995)。抑制は、一本鎖 cDNA の両末端に相補的な配列が存在する場合に起こります。各プライマーとのアニーリングステップでは、ハイブリダイゼーションの反応速度論に従って、短いプライマーとのアニーリングよりも分子内アニーリングの方が速く進行し、フライパン状の二次構造が優位に形成されます。この構造がプライマーとのアニーリングを妨げます。また、プライマーがアニールして伸長することもあります。新たに合成された鎖は末端に倒置反復配列をもつことになるため、結局、フライパン状の構造を形成することになります。このように、PCR の過程では非特異的な増幅が効率的に抑制され、両端に異なるアダプターを持つ cDNA 分子が特異的に増幅されることになります。

Adaptor 1 と Adaptor 2R の 5' 末端には、22 ヌクレオチドの同一塩基配列が存在します。そのため 1st PCR 増幅では 1 種類のプライマーしか必要とせず、プライマーダイマーの形成を避けることができます (Lukyanov *et al.*, 1995)。また、発現差のある分子の 3' 末端と 5' 末端に同一塩基配列が存在するため、サプレッション効果をわずかに受けることになります。これらの同一塩基配列と PCR Primer 1 は同じ長さであるため、サプレッション効果は非常に短い cDNA (200 nt 未満) に対してのみ有効に働くことになります。これは、短い分子ほどフライパン状の構造を効率的に形成するからです (Lukyanov *et al.*, 1995)。そのため、長い分子ほど優先的に濃縮されることになります。

その効果は、本質的に短い分子ほどサプレッション効率が良くなる傾向 (短い cDNA フラグメントほどハイブリダイゼーションや PCR 増幅、クローニング効率が良くなる) とバランスを取ることができます。

補遺 B：アダプターとプライマーの塩基配列



Control Primers : **G3PDH 5' Primer** 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'

G3PDH 3' Primer 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

図 11. PCR-Select cDNA 合成に用いるプライマーとアダプター、および PCR プライマーの塩基配列
アダプター 1 および 2R を *Rsa*I 消化 cDNA にライゲーションすると、*Rsa*I サイトが復活する。

購入者への注意

弊社の製品を転売したり、転売目的に加工したりしないでください。また、弊社の認可文書なしに製造に利用しないでください。

本製品は研究用試薬としてのみご利用いただけます。医薬品または診断目的での使用あるいはヒトへの適用も認められておりません。本製品に含まれる試薬類を用いて PCR-Select 法を研究目的で実行する場合にのみ、本製品の購入および使用が認められます。キットに含まれる試薬類の複製や増幅、修飾、組み替え、再販は禁止されています。

Notice to Purchaser

Clontech products are to be used for research purposes only. They may not be used for any other purpose, including, but not limited to, use in drugs, in vitro diagnostic purposes, therapeutics, or in humans. Clontech products may not be transferred to third parties, resold, modified for resale, or used to manufacture commercial products or to provide a service to third parties without written approval of Clontech Laboratories, Inc.

The purchaser of this product is entitled to utilize the reagents contained herein to practice the PCR-Select methods for research purposes. Reproduction, amplification, modification, reformulation, or resale of the reagents provided in the kit is not permitted.

PCR-Select™ cDNA Subtraction products are covered by U.S. Patent Nos. 5,565,340 and 5,759,822, as well as pending foreign patent applications.

LIMITED LICENSE

Use of this product is covered by one or more of the following US patents and corresponding patent claims outside the US: 5,079,352 and 6,127,155. The purchase of this product includes a limited, non-transferable immunity from suit under the foregoing patent claims for using only this amount of product for the purchaser's own internal research. No right under any other patent claim (such as method claims in U.S. Patents Nos. 5,210,015, 5,487,972, 5,994,056 and 6,171,785) and no right to perform commercial services of any kind, including without limitation reporting the results of purchaser's activities for a fee or other commercial consideration, is hereby conveyed by the purchase of this product expressly, by implication, or by estoppel. This product is for research use only. Diagnostic uses require a separate license from Roche. Further information on purchasing licenses may be obtained by contacting the Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA.

GeneAmp® is a registered trademark of Roche Molecular Systems, Inc., licensed to The Applied Biosystems Corporation.

Clontech, the Clontech logo and all other trademarks are the property of Clontech Laboratories, Inc., unless noted otherwise.

Clontech is a Takara Bio Company. ©2008 Clontech Laboratories, Inc.

製品についての技術的なお問い合わせ先

TaKaRa テクニカルサポートライン

Tel 077-543-6116 Fax 077-543-1977

ホームページアドレス <http://www.takara-bio.co.jp/>

タカラバイオ株式会社