



Innovative
Tools to
Accelerate
Discovery

SMART™ RACE cDNA Amplification Kit

ユーザーマニュアル

PT3269-1 (PR752279J)

2007年6月6日

製品コード: 634914

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

第1章	はじめに&プロトコルの概要	3
第2章	コンポーネントのリスト	8
第3章	必要な追加試薬類	9
第4章	SMART RACE増幅の一般的な注意	10
第5章	プライマーデザイン	11
	A.プライマー配列	11
	B.遺伝子内のプライマー配列の位置	14
	C.タッチダウンPCR	14
	D. Nestedプライマー	14
第6章	total RNA およびpoly A ⁺ RNAの調製と取扱い	14
	A.一般的な注意	14
	B. RNAの単離	14
	C. RNAの解析	14
第7章	1stストランドcDNA合成	15
第8章	陽性コントロールPCR実験	17
第9章	cDNA末端の高速増幅(RACE)	20
第10章	RACE産物の特性決定	22
	A. GSPおよびNGSPから得られたRACE産物の比較	22
	B. サザンブロット解析	22
	C. RACE産物のクローニングとシーケンシング	23
第11章	トラブルシューティングガイド	26
第12章	参考文献	33
第13章	関連製品	34
付録A	5'-RACEの詳細なフローチャート	35
付録B	3'-RACEの詳細なフローチャート	36
付録C	サブプレッションPCRとステップアウトPCR	37

図の一覧

図1.	SMART cDNA合成の仕組み	3
図2.	SMART RACE手順の概要	5
図3.	遺伝子特異的プライマーとcDNAテンプレートの関係	12
図4.	5'および3'-RACEサンプルの結果	19
図5.	5'-RACE反応の仕組みの詳細	35
図6.	3'-RACE反応の仕組みの詳細	36
図7.	サブプレッションPCRとステップアウトPCR の仕組み	37

表の一覧

表1.	SMARTテクノロジーで得られる追加の5'-RACE配列	4
表2.	陽性コントロールRACE実験のセットアップ	18
表3.	5'-RACE PCR反応のセットアップ	20
表4.	3'-RACE PCR反応のセットアップ	21

第1章 はじめに&プロトコルの概要

SMART™ RACE cDNA Amplification Kitは、SMARTテクノロジーを使用して5'と3'の両方のcDNA末端を高速増幅する(RACE)新しい方法です。このキットは、弊社のMarathon™ cDNA Amplification Kit (Chenchikら、1995; 1996)とSMART(Switching Mechanism At 5' end of RNA Transcript)cDNA 合成テクノロジー(特許出願中)とを統合したものです。MarathonとSMARTの強力なコンビネーションにより、標的転写産物の完全な5'配列を、これまでにない一貫性で単離できます。さらに、SMARTテクノロジーにより、アダプターライゲーションを行う必要がなく、1stストランドcDNAをそのままRACE PCRに使用できます。このためRACEの煩雑さは大幅に減り、また迅速に結果が得られます(Chenchik ら、1998)。

SMART RACE キットには、RACE反応の感度を高めながらもバックグラウンドを下げるという、PCRテクノロジーの最近の進歩も反映されています。その結果、非常に稀少な転写産物の完全長cDNAを構築する場合であっても、出発物質としてpoly A+ RNAとtotal RNAのどちらも使用できます。

ClontechのSMARTテクノロジーは、逆転写反応で完全長のcDNAを作製する機構です(Zhuら、2001)。これはSMART II ATM オリゴヌクレオチドとMMLV RTによって可能となりました。MMLV RTは、RNAテンプレートの末端に到達すると、ターミナルトランスフェラーゼ活性を示し、1stストランドcDNAの3'末端に3~5残基(主にdC)を追加します(図1)。SMARTテクノロジーでは、この活性がSMARTオリゴに利用されます。このオリゴの末端伸長のdG残基は、dCリッチのcDNAテールにアニールし、RT用の伸長したテンプレートとなることが出来ます。MMLV RTがmRNA分子からSMARTオリゴにテンプレートを切り替えた後、元のRNAの完全なcDNA複製は、末端にSMART配列が追加されて合成されます。RTのdCテーリング活性は、酵素がRNAテンプレートの末端に到達した場合に最も効力が高いため、SMART配列は通常、完全な1stストランドcDNAにのみ追加されます。このプロセスにより、高品質のRNAを使用すると、5'配列が最大量となるcDNAセットが形成されることとなります。

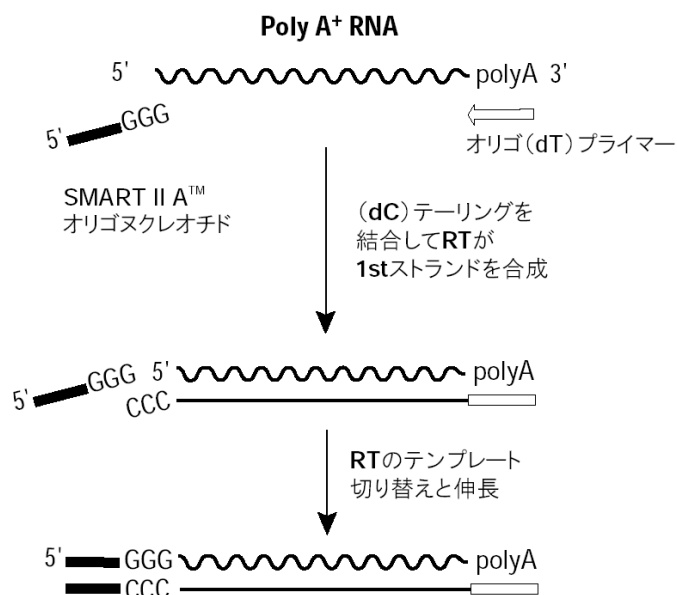


図1. SMART cDNA合成の仕組み

1stストランド合成は、改変型オリゴ(dT)プライマーを使用してプライミングされます。逆転写酵素がmRNAテンプレートの末端まで到達したら、数個のdC残基を追加します。SMART II A OligonucleotideはcDNAのテールにアニールし、MMLV RTの伸長されたテンプレートになります。

第1章はじめに&プロトコルの概要 前頁の続き

逆転写の後、1stストランドcDNAはそのまま5'および3'-RACE PCR反応に使用可能なため、時間のかかる2ndストランド合成やアダプターライゲーションは必要ありません。SMARTテクノロジーを取り入れることによって、RACE PCR増幅に“汎用プライミング”を使用できます。この方法は、サプレッションPCRおよびステップアウトPCRのテクニックと共に、標的cDNA増幅における高い特異性を保証します。これらの方法は、下記および付録Cに詳細が記載されています。

SMART RACE cDNA増幅に必要なのは、5'および3'-RACE反応用の遺伝子特異的プライマー(GSP)をデザインするための、最低23~28のヌクレオチド(nt)配列情報だけです。(さらに配列情報が加わると、RACE産物の解析が容易になります。)必要なものが限られているので、cDNAサブトラクション、ディファレンシャルディスプレイ、RNAフィンガープリンティング、ETS、ライブラリスクリーニングなど、様々な方法で同定した遺伝子の特性決定に、SMART RACEは理想的な手法となります。

SMART RACE cDNA増幅は柔軟なツールです —— 多くの研究者が、特定のcDNAの5'または3'末端だけを増幅するために、このキットを従来のキットの代わりとして使用しています。5'および3'RACEの両方を行っている研究者もあり、その多くは、このプロトコルの後半に記載されている2つの方法のどちらかを使用して、完全長cDNAのクローニングに進みます。多くの場合、cDNAライブラリーを全く構築あるいはスクリーニングせずに、完全長のcDNAを得ることができます。

表 1. SMART テクノロジーで得られる追加の 5'-RACE 配列

ヒト遺伝子	mRNA サイズ (kb)	追加配列 (bp)※	ゲノム配列 との一致	転写開始 部位の有無
トランスフェリンレセプター	5.0	+25	あり	あり
平滑筋 g- アクチン	1.28	+31	あり	あり
血管平滑筋 α - アクチン	1.33	+17	あり	あり
細胞骨格 γ - アクチン	1.9	+1	あり	あり
23kDa HBP	0.67	+9	n/a	あり
p53	2.6	+4	あり	あり
インターフェロン - γ レセプター	2.06	+14	あり	あり
14-3-3 タンパク質	1.03	+1	n/a	n/a
インターフェロン - α レセプター	2.75	+17	あり	あり

n/a = データなし

※ GenBank cDNA 配列と比較

第 1章はじめに&プロトコルの概要 前頁の続き

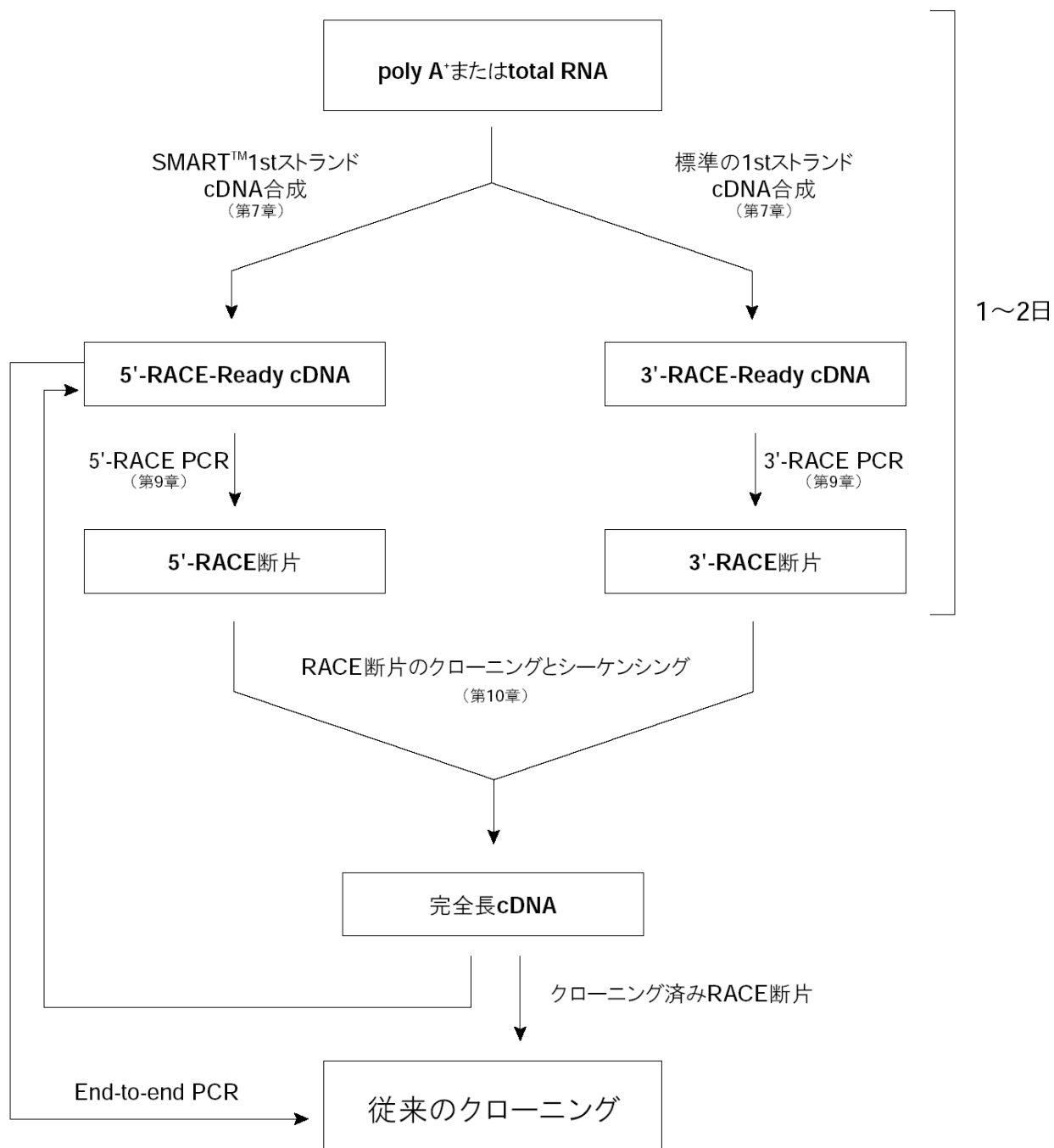


図2. SMART RACE手順の概要 SMART RACEの仕組みについての詳細なフローチャートは付録AとBに記載されています。クローニングしたRACE断片があれば、サブクローニングで完全長cDNAを構築するために、重複領域にある制限酵素部位を使用できます。他の方法としては、5'産物の5'末端と3'産物の3'末端の配列決定を行い、転写産物の最末端の配列を得ることができます。この情報を使用し、5'-RACE-Ready cDNAをテンプレートとして、完全長のcDNAを作製するためのLD PCRに使用する5'および3'遺伝子特異的プライマーをデザインできます。

第1章 はじめに&プロトコルの概要 *前頁の続き*

SMART RACE cDNA増幅プロトコルの概要

SMART RACE cDNA増幅の概要を図2に示しています。RACE反応の仕組みに関する詳細は付録AとBに記載されています。

● プライマーデザイン(第5章)

5'や3'-RACE反应用到に、遺伝子特異的プライマーをデザインしなければなりません(それぞれGSP1とGSP2)。すでに述べたように、Nestedプライマー(NGSP1とNGSP2)で、RACE産物の解析が容易になります。それらは必要に応じて、Nested RACE PCRに使用できます。プライマーデザインについては第5章で詳しく述べます。図3はSMART RACE反応に使用するプライマーとテンプレートの関係を示しています。

● 1stストランドcDNA 合成(第7章)

SMART テクノロジーでは、5'末端の伸長という利点は5'-RACEにのみ関係しているため、SMART RACEキットには、2つの独立したcDNA集団(5'-RACE-Ready cDNAと3'-RACE-Ready cDNA)を合成するプロトコルが含まれています。5'-RACE用のcDNAは、すでに述べたように、改変型ロックドックオリゴ(dT)プライマーとSMART II A オリゴヌクレオチドを使用して合成します。改変型オリゴ(dT)プライマーは5'-RACE CDS Primer(5'-CDS)といい、3'末端に任意のヌクレオチドが2つあります。これらのヌクレオチドはプライマーをpoly-Aテールの起点に位置させ、従来のオリゴ(dT)によるプライミングにはつきものの3'の異質性をなくします(Borsonら、1994)。3'-RACE cDNAは、従来の逆転写法で合成されますが、特別なオリゴ(dT)プライマーを使用します。3'-RACE CDS Primer A(3'-CDS)プライマーには、5'-CDSプライマーと同様にロックドックヌクレオチドの位置が含まれており、また5'末端にはSMART配列の一部があります。SMART配列を5'および3'-RACE-Ready cDNA集団の双方に組み込むことにより、Universal Primer A Mix (UPM)を使用して両方の RACE PCR反応をプライミングできます。UPMは、別個の遺伝子特異的プライマーと共に、SMART 配列を認識します。

● 陽性コントロールRACE実験(第8章)

ユーザー独自のテンプレートでRACEを行う前に、キットに同梱のコントロールRNAを使用して、陽性コントロールRACE実験を行うことを強くお奨めします。

● RACE PCR反応(第9章)

RACE-Ready cDNAの作製後には、異なる遺伝子特異的プライマーを使用するだけで、多くの様々な遺伝子を用いて5'および3'-RACEを行うための十分な材料が揃うことになります。SMART RACE プロトコルの全てのPCR反応は、Advantage® 2 Polymerase Mixとの使用のために最適化されています。Advantage 2 Polymerase MixはTITANIUM™ Taq DNA Polymerase — ヌクレアーゼ欠損でN末端が欠失したTaq DNAポリメラーゼと、自動ホットスタートPCR 用のTaqStart™ Antibody (Kelloggら、1994) — と微量のブルーフリーディングポリメラーゼから成ります。Advantage2テクノロジーを使用すると、オリジナル配列に対して忠実度の高い産物が得られる、長距離(LD)PCR反応を行うことができます(Barnes、1994; Chengら、1994)。その結果、従来のRACE手順で可能であったものよりも長いテンプレートを増幅できるようになります。

第1章 はじめに&プロトコルの概要 *前頁の続き*

● RACE産物の特性決定(第10章)

完全長cDNAを構築する前に、希望する標的が増幅されているかを確認することを強くお勧めします。RACE産物は次の方法を1つ以上行うことで特性を決定できます：(1)GSP1およびUPMで得られたPCR産物とNGSP1およびUPMで作製した産物とを比較する、(2)PCR産物のSouthernBlotを、遺伝子特異的内部プローブ(標識NGSP1など)でプロービングする、(3)RACE産物をクローニングしてシーケンシングする。一般に、少なくともいくつかの配列情報を得ることをお勧めします。

この段階でRACE産物を慎重に特性決定すると、たとえ両方の RACE反応で単一の主産物ができた場合であっても、後の実験の混乱と無駄な努力を避けることができます。この解析は、複数のRACE産物がある場合や、多重遺伝子族の一つで作業していることが疑われる場合、特に重要です。

“完全長”cDNAについて：完全長cDNA、特に5'末端における完全長cDNAを保証するcDNA合成法はありません。真の5'末端を決定するには、RNaseプロテクションアッセイ、プライマー伸長アッセイ、cDNA またはゲノム配列情報など、いくつかの組み合わせが必要です。SMART RACEで得られたcDNAの多くは、完全な5'末端を含んでいますが、RNAの強い二次構造により、RTやTaq DNAポリメラーゼ(またはその両方)の作用が阻害されている場合があります。弊社の経験では、SMART RACE産物と完全長cDNAはこの点で、従来のRACE法やライブラリーから得たcDNAと遜色のないものです。

5'配列を可能な限り多く得るには、5'-RACE産物の独立した5~10クローンの5'末端をシーケンシングすることをお勧めします。

第2章 コンポーネントのリスト

Control Total RNAとSMART II A オリゴヌクレオチドは分解しやすいため、必ず-70°Cでなくさないように保存してください。その他の試薬は -20°Cで保存してください。

1st ストランド合成

- 7 μ l SMART II Aオリゴヌクレオチド(12 μ M)
5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG-3'
- 7 μ l 3'-RACE CDS Primer A(3'-CDS; 12 μ M)
5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(T)₃₀V N-3'
(N = A、C、G または T; V = A、G または C)
- 7 μ l 5'-RACE CDS Primer(5'-CDS; 12 μ M)
5'-(T)₂₅ V N-3'
(N = A、C、G または T; V = A、G または C)
- 200 μ l 5 \times First-Strand buffer
250 mM Tris-HCl(pH8.3)
375 mM KCl
30 mM MgCl₂
- 200 μ l ジチオスレイトール(DTT; 20mM)
- 1 ml 精製水 H₂O

5'-RACE および 3'-RACE PCR

- 400 μ l 10 \times Universal Primer A Mix(UPM)
ロング(0.4 μ M):
5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'
ショート(2 μ M):
5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3'
- 50 μ l Nested Universal Primer A(NUP; 10 μ M)
5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'

コントロール試薬

- 5 μ l Control Human Placental Total RNA(1 μ g/ μ l)
- 25 μ l Control 5'-RACE TFR Primer(10 μ M)
- 25 μ l Control 3'-RACE TFR Primer(10 μ M)

第2章 コンポーネントのリスト 前頁の続き

一般試薬

- 70 µl dNTPs Mix (dATP、dCTP、dGTP および dTTP、各10mM)
- 2 × 1 ml Tricine-EDTA Buffer
 - 10 mM Tricine-KOH (pH8.5)
 - 1.0 mM EDTA

NucleoTrap® Gel Extraction Kit※

- 100 µl NucleoTrap Suspension
- 6 ml NT1 Buffer
- 6 ml NT2 Buffer
- 7 ml NT3 Buffer
- 5 ml NE Buffer
- 完全版ユーザーマニュアル (PT3169-1)

※NucleoTrap® Gel Extraction Kitは、日本国内では日本ジェネティクス社で販売しています。詳しくは日本ジェネティクス社のウェブサイト<http://www.n-genetics.com/> をご覧ください。

第3章 必要な追加試薬類

キットには含まれていませんが、下記の試薬類が必要です。

- 0.5 ml PCR反応チューブ Perkin-Elmer GeneAmp 0.5 ml反応チューブをお奨めします (カタログ番号N801-0737 または N801-0180)。
- ミネラルオイル (Sigma Cat. #M-3516 など)
- MMLV Reverse Transcriptase
クロンテック社では、"MMLV-based reverse transcriptase (RNase H reduced)" (MMLV由来の逆転写酵素でRNase H 活性を低下させたもの) の使用を推奨しています。
- Advantage® 2 PCR Kit

第4章 SMART RACE増幅の一般的な注意

作業を開始する前に、プロトコールを全てお読みください。

- このプロトコールのサイクルパラメータは、hot-lid thermal cycler、Advantage 2 Polymerase Mix、およびSMART RACE Kitに同梱の試薬とトランスフェリンレセプター(TFR)コントロールで最適化されています。使用するポリメラーゼミックス、テンプレート、遺伝子特異的プライマー、サーマルサイクラーによって、最適なサイクルパラメータが異なる可能性があります。試験サンプルを使用して5'および3'RACEを行う前に、陽性コントロールPCR実験を行ってください(第8章)。これらの反応はControl Human Placental Total RNAとControl 5'および3'-RACE TFR Primerから作製されたcDNAを使用するものであり、お使いのサーマルサイクラーに合わせてPCRプログラムを変更する必要があるかどうかを判断する際に役立ちます。
RACE PCRの効率は、RNAサンプル中の目的mRNAの量に依存していることに注意してください。また、プライマーが異なれば、アニール/伸長の最適温度も異なります。PCR条件の最適化についてのヒントは第11章を参照してください。
- 5'-RACEおよび3'-RACE PCR反応では、何らかのホットスタートを使用する必要があります。後述のプロトコールは、自動ホットスタートPCR用のTaqStart Antibodyを含むAdvantage 2 Polymerase Mixを使用して最適化されています(Kelloggら、1994)。ホットスタートは、ワックスビーズを使用して(Chouら、1992)、あるいは手動(D'Aquilaら、1991)で行うこともできます。
- このプロトコール内でDNAサンプルを懸濁したり希釈したりする場合は、本キットに同梱のTricine-EDTA Bufferの使用をお奨めします。トリシンバッファーはトリスベースのバッファーと比較して、高温でのpH維持に優れています。トリスベースのバッファーは、DNAを変性させる低pH状態になる可能性があります。
- RNAサンプルをヌクレアーゼから保護するために、作業中は常に手袋を着用してください。
- ペレットの懸濁と反応液の混和は、溶液を穏やかに上下にピペティングするか、チューブの底を静かに叩いて行ってください。次に短時間遠心し、全ての内容物をチューブの底に集めてください。
- 特に指定がない限り、全ての反応は氷上で行ってください。
- 酵素は最後に反応ミックスに添加してください。
- 推奨量の酵素を使用してください。推奨酵素量は、SMART RACE増幅プロトコールおよび試薬に対して慎重に最適化されています。
- 臭化エチジウムは発癌物質です。この試薬を取り扱う場合および廃棄する場合は、適切な予防措置をとってください。詳細は Sambrook ら(2001)の Molecular Cloning: A Laboratory Manualを参照してください。

第5章 プライマーデザイン

A. プライマー配列

遺伝子特異的プライマー(GSP)は次のようなものでなければなりません:

- 23～28nt
- 50～70% GC
- $T_m \geq 65^\circ\text{C}$ 、最良の結果は $T_m > 70^\circ\text{C}$ で得られます(タッチダウンPCR が使用可能)。

SMART RACE反応に使用するプライマーとテンプレートの関係や、反応後に得られるRACE産物は、図3 に詳しく記載されています。SMART RACEのプロトコルを完全に行うには、少なくとも2つ以上のGSP、つまり5'-RACE PCR用のアンチセンスプライマーと、3'-RACE PCR用のセンスプライマーが必要です。5'または3'-RACEのどちらか一方しか行わない場合、必要となるGSPは1つだけです。どのプライマーも長さ23～28 ntでなければなりません。一般に、30 nt以上の長いプライマーを使用するメリットはありません。図3に示すプライマーは、重複する5' および 3'-RACE産物を作ることになります。重複領域に適切な制限酵素部位があれば、制限酵素による消化とライゲーションによって後から断片を結合し、完全長の cDNAを作ることができます。RACE産物に100～200 bpの重複を作るプライマーをデザインすることにより、PCR反応の陽性コントロールとしてもそのプライマーと一緒に使用できます。ただし重複断片を作るプライマーの使用は必須ではありません。巨大なcDNAや稀少なcDNAの場合、cDNAの両端に近いプライマーを使用する方がよい場合があります。従って重複断片はできません。また、プライマーそのものが重複する可能性もあります(すなわち相補的)。GSPのGC含量は 50～70%、 T_m は最低 65°C でなければなりません。隣接ヌクレオチド頻度分析で決定して、 T_m は可能な限り 70°C 以上にすべきです(Freierら、1986。弊社では T_m の計算には Primer Premierソフトウェアを使用しています)。弊社の経験では、アニール温度が 70°C を超える場合、特に難しいサンプルでは、プライマーが長いほどRACEの増幅が堅牢になります。 T_m が 70°C 以上の場合、“タッチダウンPCR”が使用できます(後述のセクションC)。また、同程度の T_m になるよう GSP1とGSP2をデザインすると、SMART RACE プロトコルでそれらのプライマーを使用しやすくなります。GSP1およびGSP2の T_m は、様々な温度でPCRを行って実験的に計算または決定できます。折りたたまれ、分子内水素結合を形成する可能性のある自己相補的なプライマー配列は使用しないでください。また、特に3'末端がUniversal Primer Mixのプライマーと相補的なプライマーも避けてください。(UPMプライマー配列については第2章を参照してください。)

注意: 5'および3'GSPの5'末端に制限酵素部位を組み込まないでください。弊社の経験では、それらの余分な配列がバックグラウンドの上昇につながる場合があります。

第5章 プライマーデザイン 前頁の続き

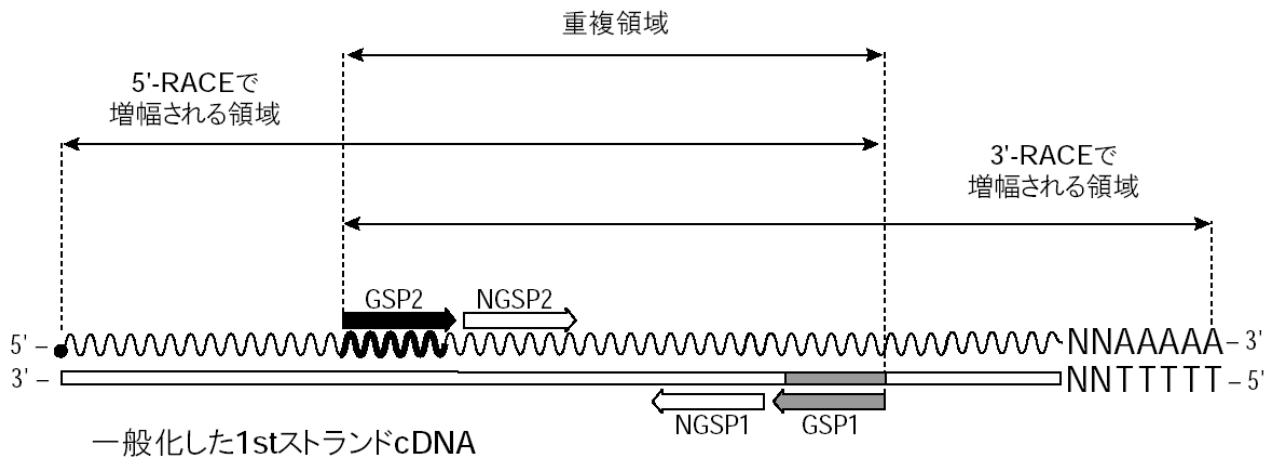


図3. 遺伝子特異的プライマーとcDNAテンプレートの関係 この模式図は、一般化した1stストランドcDNAテンプレートを示しています。このRNA/DNAハイブリッドは、5'-RACE-Ready cDNAや3'-RACE Ready cDNAを正確に描出したものではありません。構造の詳細については付録AとBを参照してください。ここでデザインした遺伝子特異的プライマーは、重複するRACE産物を作ることに注意してください。この重複により、これらのプライマーを併せてコントロールPCR反応に使用できます。また、この重複領域内に適切な制限酵素部位があれば、サブクローニングで完全長のcDNAを構築することが可能となります。

B. 遺伝子内のプライマー配列の位置

弊社では、SMART RACE Kitを使用した、GSP部位から6.5kbまで伸長する5'および3' cDNA断片の増幅で、良好な結果を得ています。ただし、最良の結果を得るには、5'および3'-RACE産物が2 kb以下になるようプライマーを選択することをお奨めします。

C. タッチダウンPCR

タッチダウンPCR (Don ら、1991; Roux、1995)で、SMART RACE増幅の特異性が著しく改善されることがわかりました。タッチダウンPCR は、PCR サイクルの初期にUniversal Primerの T_m よりも高いアニール温度を使用します。GSPの T_m が $>70^\circ\text{C}$ の場合、これらのサイクル中は遺伝子特異的な合成のみが起き、決定的な量の遺伝子特異的産物の蓄積が可能となります。次にアニール温度をUPMに使用できるレベルにまで下げ、遺伝子特異的テンプレートの効率的かつ指数的な増幅が可能となります。(詳細については付録A～Cを参照してください。)

上述の通り、このプロトコールではタッチダウンサイクルプログラムが可能になるよう、 $T_m > 70^\circ\text{C}$ のプライマーを使用することをお奨めします。($T_m < 70^\circ\text{C}$ のプライマーを使用すると、タッチダウンサイクルプログラム以外の合成も含まれます。)

D. Nestedプライマー

最初の実験には、Nested PCRは使用しないことをお奨めします。UPM PrimerとGSPでは通常、RACE産物が良好に得られ、非特異的バックグラウンドのレベルは低くなっています。ただし、Nested GSP (NGSP1およびNGSP2)をプローブとするサザンブロットは、RACE産物の特性決定に有用です。さらに、Nested PCRは、単一のGSPでは5' または3'-RACE反応のバックグラウンドや非特異的増幅のレベルが高すぎる場合に必要となります。Nested PCRでは、一次増幅は外側のプライマーで行い、スメアが現れた場合は、内側のプライマーを使用して一次PCR産物の一部を再増幅します。SMART RACEプロトコールには、Nestedプライマーが使用できる場合には、オプションの

第5章 プライマーデザイン 前頁の続き

ステップが記載されています。キットに同梱のNested Universal Primer Aは、5'および3'-RACEの両方に使用できます。

Nested遺伝子特異的プライマーは、上記で述べたガイドラインに従ってデザインしなければなりません。可能であれば、Nestedプライマーと外側の遺伝子特異的プライマーとの重複は避けて下さい。配列情報が限られていて重複しなければならない場合は、内側のプライマーの3'末端は可能な限りユニークな配列にしてください。

第6章 total RNA および poly A⁺ RNAの調製と取扱い

A. 一般的な注意

出発物質として使用するtotal RNAまたはpoly A⁺ RNAの品質と純度は、高品質のcDNA合成にとって重要な要素です。下記の注意事項は、異物混入とRNAの劣化を避けるために有用です：

- 手袋を着用してください。
- 用時調製した精製水(MilliQグレードなど)を、DEPC(ジエチルピロカーボネート)処理せずに、そのまま使用してください。
- 全てのガラス器具は 0.5N NaOHで洗い、つぎに精製水ですすぎます。それから160~180°Cにて4~9時間加熱してください。
- 使い捨てのプラスチックピペットとピペットチップのみを使用してください。

B. RNAの単離

Clontechは、NucleoBond® RNA/DNA Mini Kit ※など、total RNAの精製のキットをいくつかご用意しています。poly A⁺RNAは、様々な方法で単離できます(Farrell, 1993; Sambrookら, 1989)。

※日本国内では日本ジェネティクス社で販売しています。詳しくは日本ジェネティクス社のウェブサイト <http://www.n-genetics.com/> をご覧ください。

C. RNAの解析

RNAサンプルは、変性ホルムアルデヒドアガロース/EtBrゲルで電気泳動して確認することをお奨めします。哺乳類のtotal RNAは通常、明るい二つのバンドが 4.5kbと1.9 kbに現れます。これらのバンドはそれぞれ28Sと18SのリボソームRNA に対応しています。これらのバンドの強度比はおよそ1 ~ 2:1です。哺乳類の細胞から得た poly A⁺ RNA サンプルは、リボソームRNAのバンドが弱く、0.5~12 kbにスミアが認められます。哺乳類以外の組織由来の場合は、サイズ分布が小さくなる場合があります。

第7章 1stストランドcDNA合成

下記の2つの10 μ l反応では、total RNAまたはpoly A⁺ RNA 50ng~1 μ gをRACE-Ready1stストランドcDNAに転換します。

可能な限り、poly A⁺ RNAを使用することをお奨めします。ただしtotal RNAが50 μ g未満の場合は、RNAの量と質を効率的に解析するには最終収量が少なくなりすぎるため、poly A⁺ RNAの精製はお奨めしません。最適な結果を得るには、下記の反応にpoly A⁺ RNA 1 μ g またはtotal RNA 1 μ gを使用してください。

実験サンプルでの反応に加え、キットに同梱のHuman Placental Total RNAを使用して、陽性コントロールのcDNA合成を行うことを強くお奨めします。このcDNAは、第8章で陽性コントロールRACE反応に使用することになります。

1. 以下の試薬をそれぞれ0.5 mlのチューブに入れます。

5'-RACE-Ready cDNA用		3'-RACE-Ready cDNA用	
1 ~ 3 μ l	RNAサンプル	1 ~ 3 μ l	RNAサンプル
1 μ l	5'-CDSプライマー	1 μ l	3'-CDSプライマーA
1 μ l	SMART II Aオリゴ		

2. それぞれの反応液に滅菌水を加え、最終量を5 μ lとします。
3. 内容物を混和し、微量遠心機でチューブを短時間遠心します。
4. チューブを70 $^{\circ}$ Cで2分間インキュベートします。
5. チューブを氷上で2分間冷却します。
6. チューブを短時間遠心し、内容物を底に集めます。
7. 以下の試薬をそれぞれの反应用チューブ(すでに5 μ l が入っている)に添加します。

2 μ l	5 \times First Strandバッファー	1 μ l	DTT (20 mM)
1 μ l	dNTPs Mix (10mM)		
1 μ l	MMLV RT		

10 μ l 総量

8. 穏やかにピペッティングして内容物を混和します。
9. 短時間遠心して内容物を底に集めます。
10. チューブを42 $^{\circ}$ Cのエアーインキュベーターで1.5時間インキュベートします。
注意: このインキュベートにウォーターバスやサーマルサイクラーを使用すると、反応ミックスの液量が(蒸発により)減少する場合があります、その結果1stストランド合成の効率が低下することがあります。
11. Tricine-EDTA Bufferで1st ストランド反応産物を希釈します:
 - total RNA < 200 ngで始めた場合は20 μ l添加
 - total RNA > 200 ngで始めた場合は100 μ l添加
 - poly A⁺ RNAで始めた場合は 250 μ l添加

第7章 1stストランドcDNA合成 前頁の続き

12. チューブを72°Cで7分間加熱します。
13. サンプルは-20°Cで3ヶ月間保存できます。

この時点で 3'および5'-RACE-Ready cDNAサンプルを得たことになります。第9章のRACE反応には、それぞれの目的RNAに対して、このサンプルの一部しか使用しません。複数の遺伝子のPCR増幅に十分な量の一本鎖cDNA があります。

5'および3'-RACEの完了後にLD PCRを使用して完全長cDNAを構築する場合は、PCR反応のテンプレートとして使用するために、5'-RACE Ready cDNAの一部を取っておくことを忘れないでください。

第8章 陽性コントロールPCR実験

cDNAを使用して5'および3'-RACE反応を行う前に、Control Human Placental Total RNAから作製したRACE-Ready cDNAを使用して、以下の陽性コントロールRACE PCR実験を行うことを強くお奨めします。これらの反応ではTFR cDNAの両端を増幅することになります。この手順は、ご使用のサーマルサイクラーで SMART RACEプロトコルが問題なく働くことを保証するので、大幅に時間を短縮できます。プロトコルの後半で問題が生じたとき、この実験の結果は、問題がRACE PCRにあるのか(例えばサーマルサイクラーの違い)cDNAにあるのかを素早く決定するためのヒントになります。

Advantage 2 PCR Kit (639206又は639207)を使用してSMART RACE PCR反応を行うことをお奨めします。目的のcDNAのGC含量が高い場合、続く解析にはAdvantage®-GC 2 Polymerase Mix (639114) またはPCR Kit (639119又は639120)を使用できます。最高の正確性を持つ産物が必要な場合には、Advantage®-HF 2 PCR Kit (639123又は639124)で 3.5 kbまでテンプレートを増幅できます。詳細は第11章(トラブルシューティングガイド)を参照してください。

1. 使用時に不足しないよう、全PCR反応に1反応分を追加した量のMaster Mixを調製します。50 µlのPCR反応につき、以下の試薬を混和します。

34.5 µl	PCR グレードの水
5 µl	10 × Advantage 2 PCR Buffer
1 µl	dNTPs Mix (10mM; SMART RACE またはAdvantage 2キットに同梱)
1 µl	50 × Advantage 2 Polymerase Mix

41.5 µl 総量

2. ボルテックスで(泡を立てないよう)十分に混和し、チューブを微量遠心機で短時間遠心します。
3. 表2 に示すようにPCR反応を準備します。表の順番通りにコンポーネントを0.5 ml(または0.2 ml)のPCRチューブに添加し、穏やかに攪拌します。

第8章 陽性コントロールPCR実験 *前頁の続き*

表2. 陽性コントロール RACE 実験のセットアップ

チューブ番号： 説明：	1 5'-RACE コントロール	2 3'-RACE コントロール	3 内部 コントロール (5' cDNA)	4 内部 コントロール (3' cDNA)
コンポーネント				
コントロール 5'-RACE-Ready cDNA	2.5 µl	—	2.5 µl	—
コントロール 3'-RACE-Ready cDNA	—	2.5 µl	—	2.5 µl
5'-RACE TFR Primer (10µM)	1 µl	—	1 µl	1 µl
3'-RACE TFR Primer (10µM)	—	1 µl	1 µl	1 µl
UPM (10 ×)	5 µl	5 µl	—	—
H ₂ O	—	—	4 µl	4 µl
マスターミックス	41.5 µl	41.5 µl	41.5 µl	41.5 µl
最終量	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
予想される産物のサイズ	2.6 kb	2.9 kb	0.3 kb	0.3 kb

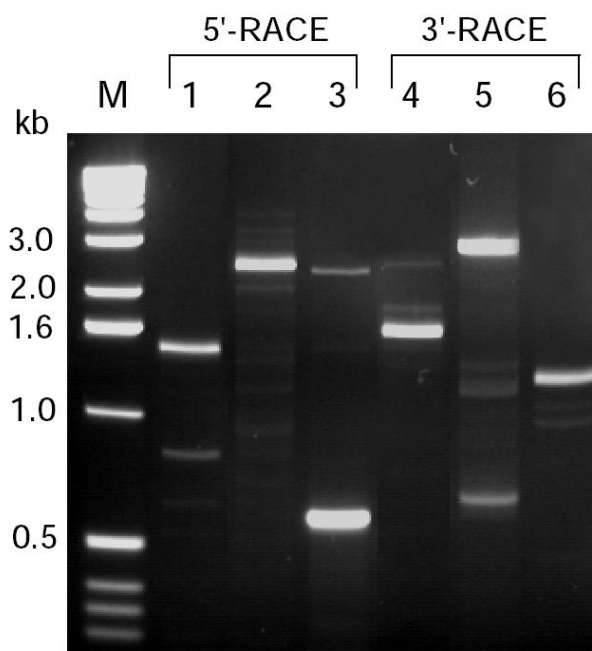
4. 各チューブの内容物にミネラルオイル2滴を重層し、しっかりとキャップを閉めます。
注意：フタ側も加熱できるタイプのサーマルサイクラーを使用している場合は、ミネラルオイルは不要です。
5. タッチダウンPCRに適切なプログラムを使用して、サーマルサイクルを開始します。
 - 5 サイクル：
94°C 30秒
72°C 3分
 - 5 サイクル：
94°C 30秒
70°C 30秒
72°C 3分
 - 27 サイクル：
94°C 30秒
68°C 30秒
72°C 3分
6. 各サンプルを5 µl とり、1.2% アガロース/EtBrゲルで解析します。残りの45 µlは、コントロール実験が問題なく実施できたことがわかるまで -20°Cで保存します。

第8章 陽性コントロールPCR実験 前頁の続き

予想される結果(図4のレーン2および5を参照してください): 5'-RACEコントロール反応では2.6 kbのバンドができるはずですが、3'-RACEコントロール反応では 2.9 kbのバンドができるはずですが。これらのバンドが認められない場合は、チューブをPCR装置に戻して、残りのサンプルに 5サイクルを追加してみてください。それでも目的とする産物が認められない場合は、第11章のトラブルシューティングを参照してください。プライマーと試験用のcDNAで 5'および3'-RACE を試みる前に、陽性コントロール反応の総サイクル数42以下で、単一の強いバンドが予想通りの大きさと作製されるようにすることをお奨めします(72°Cのアニール5サイクル+70°Cで5サイクル+68°Cで32サイクル)。

図4. 5'および3'-RACEサンプルの結果

CLONTECHでは、poly A⁺ RNAやtotal RNAを出発材料として、様々な遺伝子の5' および3'-RACE断片を増幅するのに、SMART RACE Kitを使用しています。このゲルは、totalRNAで開始した5'および3'-RACE増幅の代表例をいくつか示したものです。レーン1&4: インターフェロンγ レセプター。レーン2&5: トランスフェリンレセプター。レーン3&6: HPRT。トランスフェリンレセプターの増幅を示すコントロールのPCR 反応は、レーン2&5のようなRACE産物になるはずですが。5'産物は2.6kb、3'産物は 2.9kb です。ゲルからわかるように、トランスフェリンレセプター3'-RACEでは、弱い0.6kb産物が生じる場合があります。



第9章 cDNA末端の高速増幅(RACE)

ここでは、5'および3' cDNA断片を作製する5'-RACEおよび3'-RACE反応について説明します。第8章で述べたように、TFRプライマー、UPM、コントロールRACE-Ready cDNAを使用して、陽性コントロール5'および3'-RACEを行うことをお奨めします。Nested Universal Primer A (NUP)が同梱されていますが、一般にSMART RACE反応では、Nested PCRは必要ではありません。

全てのSMART RACE PCR反応はCLONTECHのAdvantage 2 Polymerase Mixでの使用に最適化されていることに注意してください。

1. 使用時に不足しないよう、全PCR反応に1反応分を追加した量のPCR Master Mixを調製します。同じMaster Mixを5'および3'-RACE反応の両方に使用できます。50 μ lのPCR反応につき、以下の試薬を混和します：

34.5 μ l	PCR グレードの水
5 μ l	10 \times Advantage 2 PCR Buffer
1 μ l	1 μ l dNTPs Mix (10mM)
1 μ l	50 \times Advantage 2 Polymerase Mix
41.5 μ l	総量

2. ボルテックスで(泡が立たないように)十分に混和し、微量遠心機で短時間遠心します。
3. 5'-RACEの場合：表3のようにPCR反応をセットアップします。
3'-RACEの場合：表4のようにPCR反応をセットアップします。
表の順番通りにコンポーネントを0.5ml PCR チューブに添加します。

表3. 5'-RACE PCR 反応のセットアップ

コンポーネント	1 5'-RACE サンプル	2 5'-TFR ※1 (陽性コントロール)	3 GSP 1 + 2 ※2 (陽性コントロール)	4 UPM のみ (陰性コントロール)	5 GSP1 のみ (陰性コントロール)
5'-RACE-Ready cDNA (実験用)	2.5 μ l	2.5 μ l	2.5 μ l	2.5 μ l	2.5 μ l
UPM (10 \times)	5 μ l	5 μ l	—	5 μ l	—
GSP1 (10 μ M)	1 μ l	—	1 μ l	—	1 μ l
GSP2 (10 μ M)	—	—	1 μ l	—	—
コントロール 5'-RACE TFR Primer (10 μ M)	—	1 μ l	—	—	—
H ₂ O	—	—	4 μ l	1 μ l	5 μ l
Master Mix	41.5 μ l	41.5 μ l	41.5 μ l	41.5 μ l	41.5 μ l
最終量	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l

※1 使用しているRNAがヒト由来ではない場合、この反応は不要です。

※2 使用しているGSPが重複RACE断片を作らない場合、この反応は不要です。
コントロール反応についての詳細は第11章をご覧ください。

第9章 cDNA末端の高速増幅(RACE) 前頁の続き

表 4. 3'-RACE PCR 反応のセットアップ

コンポーネント	1 3'-RACE サンプル	2 3'-TFR ※1 (陽性コントロール)	3 GSP 1 + 2 ※2 (陽性コントロール)	4 UPM のみ (陰性コントロール)	5 GSP2 のみ (陰性コントロール)
3'-RACE-Ready cDNA (実験用)	2.5 µl	2.5 µl	2.5 µl	2.5 µl	2.5 µl
UPM (10 ×)	5 µl	5 µl	—	5 µl	—
GSP1 (10µM)	—	—	1 µl	—	—
GSP2 (10µM)	1 µl	—	1 µl	—	1 µl
コントロール 3'-RACE TFR Primer (10µM)	—	1 µl	—	—	—
H ₂ O	—	—	4 µl	1 µl	5 µl
Master Mix	41.5 µl	41.5 µl	41.5 µl	41.5 µl	41.5 µl
最終量	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl

※1 使用しているRNAがヒト由来ではない場合、この反応は不要です。

※2 使用しているGSPが重複RACE断片を作らない場合、この反応は不要です。

コントロール反応についての詳細は第11章をご覧ください。

- 各チューブの内容物にミネラルオイル2滴を重層し、キャップをしっかりと閉じます。
注意: フタ側も加熱できるタイプのサーマルサイクラーを使用している場合、ミネラルオイルは不要です。
- 次のプログラムのいずれかを使ってサーマルサイクルを開始します(プログラム1も2も、陽性コントロール5'および3'-RACE TFRおよびUPM Primerで働きます)。出発物質が polyA⁺ RNA か total RNA かに応じて、以下に示すように適切なサイクル数を選んでください。

サイクリングについての注意:

必要なサイクル数は転写産物の量によって左右されるため、目的遺伝子の最適サイクルパラメータは、経験的に求める必要がある場合があります。プロトコルに従って、PCRをまず20 ~ 25サイクル走らせ、各チューブから5 µl 採取して、適切な DNA サイズマーカーと共に 1.2% アガロース/EtBrゲルで解析します。弱いバンドしかない場合やバンドが全く認められない場合は、PCR装置にチューブを戻し、5サイクルを追加します(タッチダウンPCR の第3セットのサイクルに従います)。最適伸長時間は、増幅される断片の長さによって異なります。弊社では一般に、2~4 kbのcDNA断片で3分間としています。0.2~2 kbの場合、伸長時間を2分に短縮しています。5~10 kbの場合は、最高10分まで伸長時間を延長しています。

注意: 第8章の図4はTFRサンプルの結果を示しています。

第9章 cDNA末端の高速増幅(RACE) 前頁の続き

プログラム1(GSP Tm > 70°Cの場合に使用)

- 5 サイクル:
94°C 30秒
72°C 3分

- 5 サイクル:
94°C 30秒
70°C 30秒
72°C 3分

- 20 サイクル(poly A+ RNA)
または
- 25 サイクル(total RNA)
94°C 30秒
68°C 30秒
72°C 3分

プログラム2(GSP Tm = 60~70°Cの場合):

- 20 サイクル(poly A+ RNA)
または
- 25 サイクル(total RNA)
94°C 30秒
68°C 30秒
72°C 3分

6. [オプション]一次PCR反応で目的のバンドが明瞭に現れなかった場合やスメアになった場合、下記を使用したサザンブロットを行うことも可能です:
- a. cDNAプローブ
 - b. Nestedプライマーをプローブとする

または、同梱のNUPプライマーとNGSPを使用する二次PCR、すなわち“Nested”PCR反応を行うことも可能です。(第5章プライマーデザインの考察を参照してください。)

- a. 一次PCR産物5 µlを、Tricine-EDTAバッファー245 µlで希釈します。
- b. 上記の手順1~5を、以下を使用して繰り返します:
 - RACE-Ready cDNAの代わりとして、希釈した一次PCR産物 5µl。
 - NUPプライマー1µlとNested GSP 1µl。
 - プログラム2 で15~20サイクル。

第10章 RACE産物の特性決定

この段階で、RACE断片の特性を決定し、目的の産物が増幅しているか確認することをお奨めします。5'と3'-RACEの両方の反応で単一の主産物ができた場合でも、この手順によって、完全長cDNAを作製する際の混乱と無駄な努力を避けることができます。特性決定は、複数のバンドがある場合や、多重遺伝子族の一つで作業していることが疑われる場合、特に重要です。

RACE産物の特性決定のために3つの方法を説明しています：(1)GSPとNGSPで得られたRACE産物の比較、(2)サザンロット、(3)クローニングとシーケンシング。オプション1と2については、5'および3'-RACE産物解析のためNested GSPが必要となります。プロットとクローニングのプロトコールの詳細については、Sambrookら、(2001)またはその他の適切な実験マニュアルを参照してください。

A. GSPおよびNGSPから得られたRACE産物の比較

5'-RACE反応については、UPM MixとGSP1で行った一次増幅産物と、UPMとNGSP1を使用して得られた産物とを比較します。(3'-RACE反応では、UPMとGSP2で行った増幅産物と、UPMとNGSP2で行った増幅産物とを比較します。) この解析は、複数のバンドが、適切にプライミングされたPCRの結果であるのか、非特異的にプライミングされたPCRの結果であるのかを決定する助けとなります。バンドが本物である場合(すなわち適切なプライミングの結果である場合)、Nested GSPを使用した反応では、若干小さくなるはずですが、産物の移動度の差は、cDNA構造中の外側と内側の“Nested”GSPの位置に対応しているはずですが、UPMとGSP1(またはGSP2)で複数のバンドが現れた場合、UPMとNGSP1(またはNGSP2)の増幅により、そのいくつかが消滅する可能性があります。注意:これらの反応には、Nested Universal Primer A(NUP)は使用しないで下さい。このプライマーでは、全てのPCR産物のサイズ減少が生じます。

B. サザンプロット解析

内部の遺伝子特異的プローブ(通常は他のGSPまたはNGSPの1つ)でサザンプロットを行い、RACE産物を確実に確認することができます。この方法は、特にRACEで複数のバンドが生じたとき、どのバンドが本物であるかを決定するのに有用です。複数のバンドは、3'-RACEよりも5'-RACEでよく認められます。

1. RACE産物をアガロース/EtBrゲルで調べます。
2. ゲルの写真を撮り、標準のプロット法でDNAをナイロンメンブレンに移します。
3. GSP1(またはGSP2)と共通の配列を持たないハイブリダイゼーションプローブを作製します。プローブは、末端を標識したNGSP1(またはNGSP2)でも構いません。別法として、重複する5'および3'断片がGSP1によって定義されている場合は、5'-RACE産物の特性決定のためのプローブとしてGSP2を、また3'-RACE産物の特性決定のためのプローブとしてGSP1を使用できます。先にクローニングしたcDNAの一部から得た、ニックトランスレーションあるいはランダムプライミングした内部制限酵素断片を使用することもできます。

第10章 RACE産物の特性決定 前頁の続き

4. サザンブロットにプローブをハイブリダイゼーションし、中等度から高い強度で洗浄してX線フィルムに露光します。
5. ハイブリダイゼーションパターンを、アガロース/EtBrゲルの写真と比較します。一般に、サザンブロット上の最大のバンドに対応するRACE産物を単離することになります。アガロースゲルではそれよりも大きなRACE産物が存在しても、遺伝子特異的プローブとハイブリダイズしない場合もあります。通常、それらのバンドは、非特異的プライミングによるものです。プローブとハイブリダイズする小さなバンドは、不完全な逆転写の結果である可能性があります。ただし、そういった短いバンドのいくつかが本物であり、スプライシングが異なる転写産物、複数のプロモーター由来の転写産物、また多重遺伝子族の他のメンバーに対応している可能性を除外することはできません。
6. 目的のバンドを突き止めたら、キットに同梱のNucleoTrap® Gel Extraction KitでゲルからDNAを単離し、実験を進めます。

C. RACE産物のクローニングとシーケンシング

1. NucleoTrap Gel Extraction Kitで目的のRACE産物をゲル精製します。次に単離した断片を、そのままTAタイプのPCRクローニングベクターにクローニングします。
2. RACE産物のTAクローニング後に、³²P末端標識NGSPをプローブとするコロニーハイブリダイゼーションか、GSPからのシーケンシングにより、遺伝子特異的挿入断片を含むクローンを同定します。5'-RACE産物では、5'末端の配列を可能な限り多く得るため、8~10個以上の異なる独立クローンを拾うことをお奨めします。最も大きな遺伝子特異的挿入断片を含むクローンを同定したら、可能な限り多くの配列データを取得します。理論的には、オープンリーディングフレーム全体や、5'および3'未翻訳領域をシーケンシングできます。

第10章 RACE産物の特性決定 *前頁の続き*

完全長cDNA作製のオプション

部分的または完全なシーケンシングでRACE産物の特性が決定されれば、2つの方法のいずれかで完全長cDNAを作製できます：

1. cDNAの5'および3'末端からデザインしたプライマーと、5'-RACE Ready cDNAをテンプレートとして使用し、長距離PCR(LD PCR)を行う。
2. 重複領域にある制限酵素部位を使用し、重複する5'および3'-RACE断片をクローニングする(可能であれば)。

一般に、LD-PCR法は、より直接的で、複雑さやアーチファクトが少ない方法です。クローニングを行えば、2つの異なる転写産物由来の5'および3'cDNA断片を結合することができます。この結合は、2種類の多型RNA や、多重遺伝子族からの転写産物の場合にも起こり得ます。一方、end-to-end PCRでは、5'および3'末端プライマーは単一のcDNAを増幅し、ハイブリッドができる可能性はありません。事実上、全てのcDNAはLD PCRの範囲内にあります。

第11章 トラブルシューティングガイド

5'および3'-RACE反応の最適化は一般に望ましいものであり、また多くの場合必要でもあります。このプロセスは通常、RACE反応における目的断片の収量を改善しながら、バックグラウンド量や非特異的バンドまたは不完全なバンド(あるいはその両方)の量を減らすものです。このユーザーマニュアルに記載のcDNA合成プロトコルでは、100以上のRACE PCR反応に十分な量の5'および3'-RACE-Ready cDNAができます。従って、RACE増幅を最適化するための材料は十分にあります。

A. コントロールPCR反応

本ユーザーマニュアルの表3と表4は、収量が最適以下であった場合に、反応のトラブルシューティングのヒントとなるコントロール反応がいくつか記載されています。それらには次のようなものがあります:

- チューブ#2: 陽性コントロールTFR Primer、UPM Primer Mix、および実験用RNAから作製した 5'および 3'-RACE-Ready cDNAを使用する5'または3'-RACE PCR。第8章の図4は、これらのコントロールを使用した5'および3'-RACEの結果を示しています。
- チューブ#3: 両方の GSP を使用して、5'および3'-RACE断片の重複セグメントを増幅(可能な場合)する、もう一つの陽性コントロール。この反応は、プライマー間の重複に対応する単一のバンドを作ります。この結果によって、目的cDNAがRACE-Ready cDNAに存在し、かつRACE-Ready cDNAから増幅できたことが確認できます。適切な5'および3'-GSP(すなわち重複する5'および3'-RACE産物を作るGSP)がない場合、5'および3'-RACE TFR Primerと陽性コントロール RACE-Ready cDNA(ヒトの場合)5 µlを使用します。
- チューブ#4: UPMだけを使用して目的cDNAを増幅する陰性コントロール。40サイクル未満の場合、この反応では全く産物ができません。このコントロールでスメアや余分なバンドのラダーが認められる場合、サイクルパラメータを変更するか、Nested Universal Primer Aを使用する二次増幅を行う必要があると思われる。
- チューブ#5: それぞれのGSPを単独で使用する陰性コントロール。このコントロールは、産物を作らないはずですが、このコントロールでスメアや余分なバンドのラダーが認められる場合、サイクルパラメータを変更するか、Nestedプライマーを使用した二次増幅を行うか、オリジナルのプライマーをデザインしなおす必要があると思われる。

第11章 トラブルシューティングガイド 前頁の続き

B. PCR全般の問題

- GCリッチなテンプレートのトラブルシューティング: PCR産物、特に5'-RACE産物が、予想通りのサイズではないか全く存在しない場合、その原因がGCリッチなテンプレートにある可能性があります。CLONTECHでは、GCリッチなテンプレートの効率的増幅のために、Advantage-GC 2 Polymerase MixとPCR Kitを用意しています。ただし、このポリメラーゼミックスやキットを使用する場合、マスターミックスの組成を変更して、殆どのポリメラーゼに使用する10× Buffer のかわりに、GC-Melt™と5× PCR Reaction Bufferを入れる必要があります。また、これらのテンプレート用にPCRパラメータを最適化する必要もあると思われます。最初のRACE反応はAdvantage 2 Polymerase Mixで、次にAdvantage-GC 2 Polymerase Mixを使用してRACE反応を行い、どちらの反応でも産物のサイズが同じであると確認することをお奨めします。
- 信頼性の高いPCR: クローニングしたRACE産物をさらに解析に使用する場合、Advantage HF 2 PCR Kit を使用して、完全長cDNAを作製することをお奨めします。Advantage-HF 2 PCR Kit は、最も信頼性の高いポリメラーゼで、3.5kb未満の産物を作製するようデザインされています。このキットは3.5kbより大きなcDNAテンプレートには理想的ではないかもしれませんが、追加実験に使用するためにRACE産物をクローニングする、といった用途には特に適しています。ここでも、最初のRACE反応は Advantage 2 Polymerase Mixを使用して行い、産物の存在とGSPが良好に働いているかを確認してください。
- タッチダウンPCRのトラブルシューティング: タッチダウンPCRをトラブルシューティングする場合、サイクルパラメータの最終セット(すなわちアニール温度68°Cで20~25サイクル)の変更から始めることをお奨めします。68°Cでの最少サイクル数の後に増幅産物が認められない場合、チューブをPCR 装置に戻して5サイクルを追加します。それでも産物が認められない場合は、68°Cで3 ~5 サイクル追加します。まだ成功しない場合は、新しくPCR実験を行います。このときサイクルの第3セットのアニール温度を68°Cから65°Cに変更します。この最後のプログラムは、特にGSPのTmが70°Cに近い時に有効です。
- SMART RACEプロトコルを、Perkin-Elmer DNA Thermal Cycler 480またはGeneAmp Systems 2400/9600以外のサーマルサイクラーに適合させる: このマニュアルの中で述べているように、本プロトコルのサイクルパラメータは、Perkin-Elmer DNA Thermal Cycler480 または GeneAmp Systems 2400/9600 以外のサーマルサイクラーを使用している場合、最適化しなければなりません。この2つのサーマルサイクラーのいずれかが使用できる場合は、そちらを使用することを強くお奨めします。

C. RACE産物の重複領域の陽性コントロール増幅でバンドが認められない。(GSP1+GSP2またはTFR1+TFR2のいずれか)

センスおよびアンチセンスGSPとRACE-Ready cDNAを使用したコントロールPCR反応で目的遺伝子の内部断片を増幅することは、非常に重要です。この反応で、予測した内部cDNA断片の作製に失敗した場合、少なくとも2つの可能性が考えられます:

第11章 トラブルシューティングガイド *前頁の続き*

- ポリメラーゼミックスに問題がある可能性があります。Advantage 2 Polymerase Mixを使用していない場合は、そちらに変えてみてください。SMART RACEプロトコルは、Advantage2 Polymerase Mixで最適化されています。第8章の陽性コントロールPCR 実験を必ず行ってください。
- cDNA 合成反応に失敗した可能性があります。1stストランド合成反応をやり直してください。1stストランドcDNAの品質は、下記の第11章Kに記載の手順で解析することもできます。

D. TFR1+TFR2と実験用cDNAを使用してもバンドが全く確認できないが、陽性コントロール胎盤RNAから作製したcDNAを使用すれば、適正な産物が認められる。

- RNAが部分的に劣化しているか、不純物を含んでいる可能性があります。第6章に記載の基準に照らし合わせてRNAの品質を確認してください。

E. GSP1+GSP2を使用してもバンドが全く確認できないが、TFR1+TFR2では適正な産物が認められる。

- この問題は、目的遺伝子の強い二次構造や高いGC含量(あるいはその両方)によってRTが止まってしまったことにより生じる可能性があります。3'-RACEが働いているのに5'RACEが働いておらず、陽性コントロール(GSP1+GSP2)が期待通りの断片を作らない場合に、特にこの問題が考えられます。第11章 トラブルシューティングガイドのBに、GCリッチなテンプレートへの対応についてのヒントがあります。また、1stストランドcDNAの品質は、下記の第11章Kに記載の方法で解析することもできます。
- 出発物質のRNA中で、目的遺伝子の発現が弱い、または全く発現していない場合があります。新しいRNA供給源を探す必要があると思われます。5'および3'-RACE増幅の効率、標的転写産物の量に左右されます。
- プライマーに問題があります。プライマーデザインが不適切であったか、プライマーの調製がうまくいかなかったかのいずれかだと考えられます。まず、アニール/伸長温度を下げてみます。それでもうまくいかない場合は、新しくプライマーをデザインし直すか、GSPの精製をやり直す必要があると思われます。
ゲノムDNAをテンプレートとし、内部断片を(GSP1とGSP2を使用して)増幅すると、さらに情報が得られる場合があります。期待したバンドが現れる場合、プライマーは適切であり、問題は(a)標的RNA がRTのテンプレートとして不適切であるか、(b)選択した組織源でRNAが発現していないかということになります。ただし、プライマーがゲノムDNAのイントロンで隔てられている可能性もあるため、このテストは決定的なものではないことに注意してください。もしイントロンで隔てられている場合、ゲノムDNA の増幅では、予想よりも大きな断片が生じるか、または断片が全くできません。

第11章 トラブルシューティングガイド 前頁の続き

F. 3'-RACEは働いているのに、5'-RACEでは実験サンプルでの増幅もTFRの増幅もうまくいかない。

- これは、完全長cDNA合成の失敗や、テンプレート切り替え反応の失敗(またはその両方)の結果であることが多いようです。1stストランド合成反応をやり直してください。1stストランドcDNAの品質は、下記の第11章Kに記載の方法で解析することもできます。
- MMLV RTが劣化している可能性があります。これは、MMLV RTを常に氷上に置いておかなかった場合や、使用後に直ちに冷凍庫に戻さなかった場合に起きることがあります。

G. 実験RNAサンプルやコントロールRNAサンプルを用いて、遺伝子特異的プライマーや陽性コントロールプライマーを使用しても、RACE反応でのバンドが全く認められない。

PCRサイクルを25~30回行った後もRACE産物が確認されない場合(特に5'および3'-RACE反応の両方で)、チューブをPCR装置に戻し、さらに5サイクル追加します。推奨しているサーマルサイクラーのいずれかを使用していない場合は、使用しているサーマルサイクラーにPCRプログラムを最適化する必要があると思われます。これらの手順で問題が解決しない場合は、cDNA合成やテンプレート切り替え反応(あるいはその両方)が失敗している可能性があります。この場合は、cDNA合成反応をやり直してみてください。1stストランドcDNAの品質は、下記の第11章Kに記載の方法で解析することもできます。

H. 実験用cDNAサンプルを使用すると 5'または3'-RACEのバンドが現れないが、TFR陽性コントロールRACE反応(チューブ#2)では予想通りの産物ができる。

- RNAサンプル中の目的遺伝子が少なかった可能性があります。アニール温度68°CでPCRサイクルをさらに5サイクル追加します。RACE断片が現れるまで 5サイクルずつ追加していきますが、タッチダウンPCRの場合は合計50サイクルを、タッチダウンPCRでない場合は合計40サイクルを超えないようにします。この操作の後でも予想した産物ができない場合、目的遺伝子がもっと多く存在する新しい RNA 源を探さなければならない場合があります。
- 使用しているプライマーに対して、アニール温度が高すぎます。アニール温度を2°Cずつ下げます。
- 使用しているプライマーがPCRに適していません。第5章の基準と照合し、必要に応じて新しいプライマーをデザインしてください。
- 二次コンフォメーションや高いGC含量という遺伝子構造のために、PCRが困難です。cDNA両端により近いプライマーになるようデザインし直すか、GCリッチな領域が既知の場合はその領域を避けます。GCリッチな配列のトラブルシューティングについてのさらなるヒントは、第11章トラブルシューティングガイドBを参照してください。
- 目的の遺伝子が、RTやLD PCRには長すぎます。可能な限り両端に近くなるよう、プライマーをデザインします。次に、キットに同梱の5'-CDS Primerの代わりにGSPかランダムヘキサマーを使用し、逆転写をプライミングして、5'-RACE-Ready cDNA合成をやり直します。

第11章 トラブルシューティングガイド 前頁の続き

I. RACE 産物が複数のバンドで構成されている。

場合によっては、最初の実験で複数の5'および/または3'-RACE産物ができます。既に述べたように、どの産物が本物で、どの産物がアーチファクトかを決定しなければなりません。以下のガイドラインはアーチファクトを消すのに役立ちますが、本物の完全なバンドを確認するには、追加研究(転写開始部位・イントロン/エクソン構造・ポリアデニル化部位のマッピングやゲノムのシーケンシングなど)が必要となります。

複数の断片があるからといって、完全長cDNAの作製を進められないわけではありません。ただし、反応のトラブルシューティングを行うことにより非特異的断片を消すようにすれば、長期的に見て時間を短縮できると思われます。複数の断片が引き続き存在し、実験を先に進めたい場合は、一般に各RACE反応の最大断片から始めてください。なぜならその断片が本物の完全なRACE産物である可能性が最も高いからです。

複数の“本物の”RACE産物の発生源

個々の遺伝子から複数のサイズの転写産物が生じる場合があります、これが複数のRACE断片となりますが、こうなるには少なくとも3つの機構があります：

- 選択的スプライシングにより、5'または3'-RACEで複数の産物ができる。
- 異なる複数の転写開始部位の使用により、複数の5'-RACE産物ができる。
- 異なる複数のポリアデニル化部位の使用により、複数の3'-RACE産物ができる。

あるいは、目的遺伝子が多重遺伝子族のメンバーの場合もあり、そのときは“遺伝子特異的”プライマーが同時にいくつかの相同性の高いcDNAを増幅することがあります。

RNAの多型を明らかにするのは科学の重大な本質ですが、私達にもあるRNAの形式が他の形式のものより豊富な理由を見つけることができるかもしれません。

アーチファクトの発生源

複数のバンドは大抵の場合、実際の完全な転写産物に対応していません。これらのアーチファクトRACE産物は、不完全なものと非特異的なものの2種類に分類できます。

適切なプライミング部位から不完全な断片が作製される原因はいくつか考えられます。

- RTの停止によって 1stストランドcDNA合成が不完全なまま終了すると、一般に複数の5' RACE産物の原因となります。この問題は大きなRNAsではよく認められ、RTの内在的限界によるものであるため、解決するのは困難です。

第11章 トラブルシューティングガイド 前頁の続き

- 出発物質として使用したRNAが劣化していると、一般に複数の5'-RACE産物が生じる原因となります。
- 特定の遺伝子の増幅が困難であると、5'または3'-RACEのどちらでも複数の産物が生じますが、たいていの場合はGC含量が高いことに起因しています。
非特異的RACE産物は、ds cDNAの複数の部位にプライマーが非特異的に結合した場合や、プライマー二量体アーチファクトによって発生します。

解決策:

- まだ行っていない場合は、推奨されたコントロールをすべて使用してRACE反応を行います。特に、GSPを個別に使用した場合にはバンドが生じず、一緒に使用した場合には単一のバンドが生じることを確認します。GSPを単体で使用したときにバンドが常に生じるようであれば、サイクルパラメータを変更するか、下記で述べるように Nestedプライマーをデザインすることをお奨めします。また陽性コントロールRACE PCR実験もやり直してください。
- RACE-Ready cDNAを5～10倍希釈したものを5 µl使用し、反応をやり直します。
- 第6章で述べたように、RNA出発物質のサイズ分布を調べていない場合は、それを調べます。RNAが予想よりも小さく見える場合は、RNAを精製しなおしてからcDNA合成をやり直します。
- 複数のバンドが引き続き存在する場合は、PCRサイクルパラメータを変更してみます。
 1. アニール温度を2～5°Cずつ上昇させて、PCRの厳密性を高めます。多くの場合、非特異的プライミングから生じるバンドは消え、真の産物や不完全な産物が残ります。
 2. サイクル数を減らします。ここでも非特異的プライミングから生じるバンドは消えますが、真の産物や不完全な産物は残ることになります。
 3. 伸長時間を短くします。
 4. 大きなRACE産物の場合は、伸長時間を延長すると、余分なバンドが消えることがあります。
- 複数のバンドが引き続き存在する場合は、新しいプライマーセットをデザインしてみます。
 1. T_mが70°Cより高くなるようプライマーをデザインしなおし、タッチダウンPCR用のサイクルパラメータを使用します。
 2. 元のプライマーで予想されるよりも若干サイズの異なるRACE産物ができるような、新しいプライマーをデザインすることをお奨めします。これらの新しいプライマーは、それだけでも、“Nested PCR”で元のプライマーと組み合わせても使用できます。Nested PCRでは、PCR反応の産物は、元のプライマーの内側に位置する第2のプライマーセットを使用して再度増幅されます。大抵の場合はこれにより、どちらかのプライマーセットだけを使用したときに認められるバックグラウンドと非特異的増幅が大幅に低下します。Nestedプライマーのデザインについては第5章で説明しています。

第11章 トラブルシューティングガイド 前頁の続き

3. Nested RACE PCRを行う前に、UPMとGSP1またはNGSP1を使用して、それぞれ一次増幅を行うことをお奨めします。このテストは、複数のバンドが、適正にプライミングされた PCR の結果であるのか、それとも非特異的にプライミングされたPCRの結果であるのかを確認するのに役立ちます。複数のバンドが本物(すなわち適正なプライミングの結果)である場合、バンドは両方の反応に現れるはずですが、Nestedプライマーを使用した反応の方が若干小さくなります。産物の移動度の差は、cDNA構造内のGSPと NGSP の位置に対応しているはずですが。上記の解決策がいずれも働かない場合、本キットに同梱のCDS Primerの代わりに、GSPまたはランダムヘキサマーを使用して、cDNA合成をやり直してみることもできます。

J. RACE cDNA 産物にスミアが出る。

注意: SMART RACE反応では、非常に複雑なバンドのパターンを示す場合があります、スミアのように見えることがあります。

本物のスミアが現れる場合のほとんどを占める、特に3'-RACE反応の場合には、RACE反応以前に問題が生じています。5'-RACE反応産物のみにもスミアが認められる場合は、逆転写の困難なテンプレートであるか、RNAが劣化していたかを示していると考えられます。両方の反応でスミアが現れる場合は、出発物質の RNA に不純物が混入していたか、逆転写に問題があった可能性が非常に高いことを示しています。これらの場合は、RNAを再度精製してから(またはRNAに劣化がなく不純物もないことを確認してから)、全ての手順をやり直すことをお奨めします。詳細については第6章を参照してください。

明らかにスミアがRACEの前に生じた問題によるものではない場合、複数のバンドが生じた時のトラブルシューティングのヒントを参考にして、RACE反応を最適化してみてください。

K. 1stストランドcDNAの品質の解析

RACE断片の増幅の問題が、逆転写反応の失敗によると疑われる場合、poly A⁺RNAを使用しているのであれば、³²P標識法で1stストランドcDNAの品質を確認できます。これを行うには、1stストランド合成をやり直しますが、そのときに水を1 μl減らして、そのかわりに0.1 μCi/μl [α -³²P]dATP または dCTPを1 μl 添加します。アルカリアガロースゲルに反応産物を流し、オートラジオグラフィーでバンドパターンを調べます。1stストランド反応が成功していれば、RNAで作製したパターンと類似のバンドパターンが見えるはずですが。哺乳類のpoly A⁺ RNA では、一般に0.5~12kbにスミアが生じます。哺乳類のtotal RNAでは、4.5 kbと1.9 kbに明るい2本のバンドが現れます。

第12章参考文献

- Barnes, W. M. (1994) PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from bacteriophage templates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91** :2216-2220.
- Borson, N. D., Sato, W. L. & Drewes, L. R. (1992) A lock-docking oligo(dT) primer for 5' and 3' RACE PCR. *PCR Methods Applic.* **2** :144-148.
- Chenchik A., Moqadam, F. & Siebert, P. (January 1995) Marathon cDNA amplification: A new method for cloning full length cDNAs. *CLONTECHniques* **X** (1):5-8.
- Chenchik, A., Moqadam, F. & Siebert, P. (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.), 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*. 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** :5695-5699.
- Chou, Q., Russell, M., Birch, D., Raymond, J. & Bloch, W. (1992) Prevention of pre-PCR mispriming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. *Nucleic Acids Res.* **20** :1717-1723.
- 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** :3749.
- Don, R. H., Cox, P. T., Wainwright, B. J., Baker, K. & Mattick, J. S. (1991) "Touchdown" PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res.* **19** :4008.
- Farrell, Jr., R. E. (1993) *RNA Methodologies: A Lab Guide for Isolation and Characterization* (Academic Press, San Diego, CA).
- Freier, S. M., Kierzek, R., Jaeger, J. A., Sugimoto, N., Caruthers, M. H., Neilson, T. & Tumer, D. H. (1986) Improved free energy parameters for predictions of RNA duplex stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83** :9373-9377.
- Frohman, M. A., Dush, M. K. & Martin, G. R. (1988) Rapid production of full-length cDNA from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85** :8998-9002.
- Kellogg, D. E., Rybalkin, I., Chen, S., Mukhamedova, N., Vlasik, T., Siebert, P. & Chenchik, A. (1994) TaqStart Antibody: Hot start PCR facilitated by a neutralizing monoclonal antibody directed against Taq DNA polymerase. *BioTechniques* **16** :1134-1137.
- 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** (6):1558-1560.
- Roux, K. H. (1995) Optimization and troubleshooting in PCR. *PCR Methods Applic.* **4** :5185-5194.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition* (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).
- 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.
- Zhu, Y.Y., Machleder, E. M., Chenchik, A., Li, R. & Siebert, P. M. (2001) Reverse transcriptase template switching: A SMART™ approach for full-length cDNA library construction. *BioTechniques* **30** :892-897.

第13章 関連製品

Clontechの最新の全製品リストについては、<http://www.clontech.co.jp> をご参照ください。

製品名	製品コード
●Marathon-Ready cDNAs	多数
●CLONTECH PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit	637401
●Advantage® 2 PCR Kit	639206
●Advantage® 2 Polymerase Mix	639201
●Advantage®-GC 2 PCR Kit	639119
●Advantage®-GC 2 Polymerase Mix	639114
●Advantage®-HF 2 PCR Kit	639123

付録A 5'-RACEの詳細なフローチャート

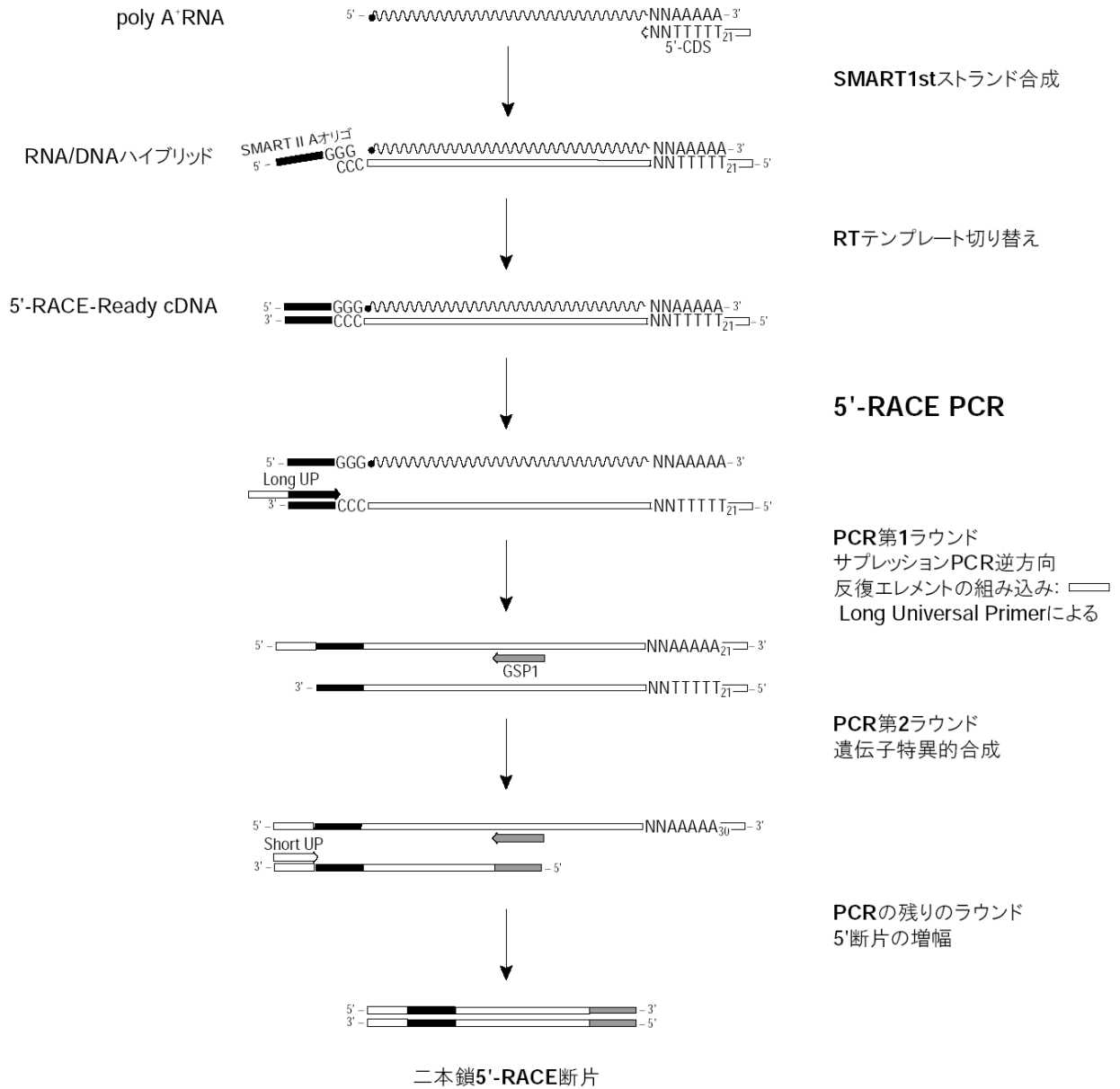


図5. 5'-RACE反応の仕組みの詳細

付録B 3'-RACEの詳細なフローチャート

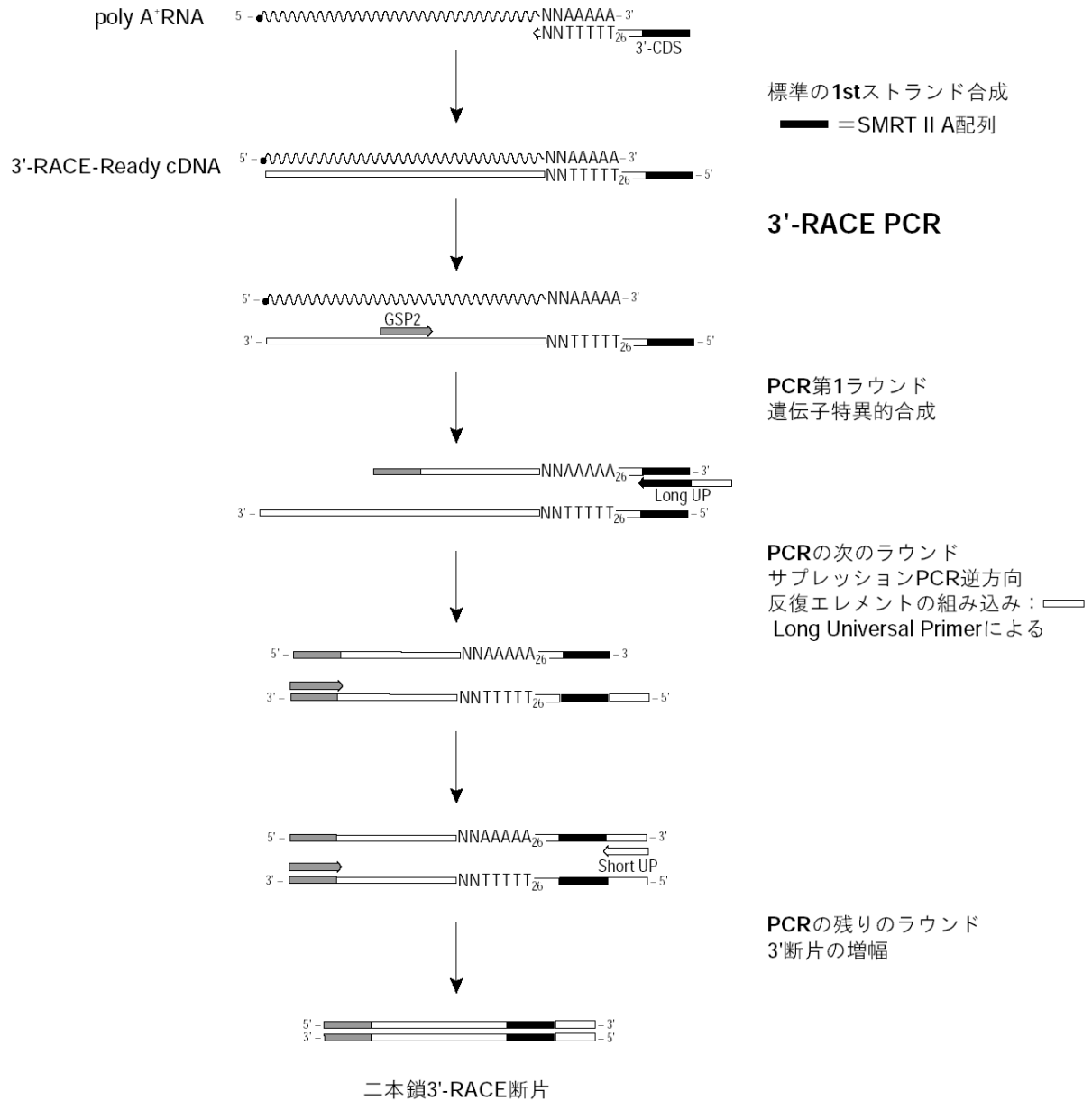


図6. 3'-RACE反応の仕組みの詳細

付録C サプレッションPCRとステップアウトPCR

弊社のSMARTによる5'-RACE実験の初期には、かなりのバックグラウンドの増幅が認められる傾向にありました。この不要なバンドは、5'-RACE-Ready cDNA合成時にSMART II Aオリゴによる逆転写酵素の非特異的プライミングによって生じていると判断しました。逆転写とテンプレート切り替えが完了すると、これらのcDNAは両端にSMART配列を持つこととなります(図7)。その結果、SMART配列に基づくプライマーを使用するRACE PCRは、目的の遺伝子特異的断片だけでなく、これらのcDNAも増幅してしまいます。この問題は、サプレッションPCRとステップアウトPCRの使用により解決されました。

サプレッションPCR(Siebertら、1995)では、逆方向反復がDNA配列の両端に組み込まれて、PCR中の増幅を妨げます。この抑制効果は、これらの逆方向反復が分子内でアニールして、PCRでは増幅できない“フライパンの柄”構造を形成した時に発揮されます(図7のフローチャートの一番下を参照)。SMART RACE KitはステップアウトPCRというテクニックを使用してこれらの逆方向反復を追加し、逆転写時にSMART II A オリゴのプライミングによって合成されたcDNA種の増幅を抑制します。ステップアウトPCRは2種類のプライマーの混合物を使用して、テンプレートDNAの一端(または両端)に追加配列を組み込みます(Matzaら、1999)。これらのプライマーの1つは際立って長く、アニールしないオーバーハングとして追加配列を持っています。このオーバーハング配列は、PCRの早期ラウンドでテンプレートDNA末端に組み込まれます。オーバーハング配列が追加されると、オーバーハング配列にのみ相補的なセカンドプライマーに交代し、効率的なPCR増幅のプライマーとして働きます。大きな組み込みプライマーは効果的な増幅には不適切なため、この短いプライマーは必要不可欠です。この短いプライマーは、PCR時のテンプレートDNAへのアニールの際に長いプライマーと競合しないよう、長いプライマーよりも高い濃度で含まれています。

同じように、Universal Primer A Mixは、SMART RACEで、サプレッションPCR逆方向反復エレメントをcDNAの両端に追加します。このミックス中のプライマーの1つである“長い”Universal Primer (UP)は、SMART配列と3'末端が相補的であり、サプレッション配列を含む20 bpの5'ヒールを持っています(図7)。RACE PCRの早期ラウンド中に、このプライマーは、cDNA集団に存在する全てのSMART配列の5'側にサプレッション配列を組み込みます。その結果、オリゴ(dT)で適切にプライミングされ、かつ1stストランドcDNAの3'末端に1つのSMART配列を持つ全てのcDNAは、その末端にサプレッション配列を1つ持つこととなります。逆に、SMART II Aオリゴでプライミングされ、従ってSMART配列に挟まれた全てのcDNAは、再度逆方向反復が側方に来ることになり、サプレッションPCRの対象となります。従って、一端にのみSMART配列を持ち、かつ遺伝子特異的配列を持つcDNAだけが増幅されます。既に述べたように、“短い”UPIは長いUPよりも5倍高濃度ですが、長いUPの5'ヒール配列のみを持っており、逆方向反復が組み込まれた後は、単に効率的なPCRプライマーとして働きます。

付録C サプレッションPCRとステップアウトPCR 前頁の続き

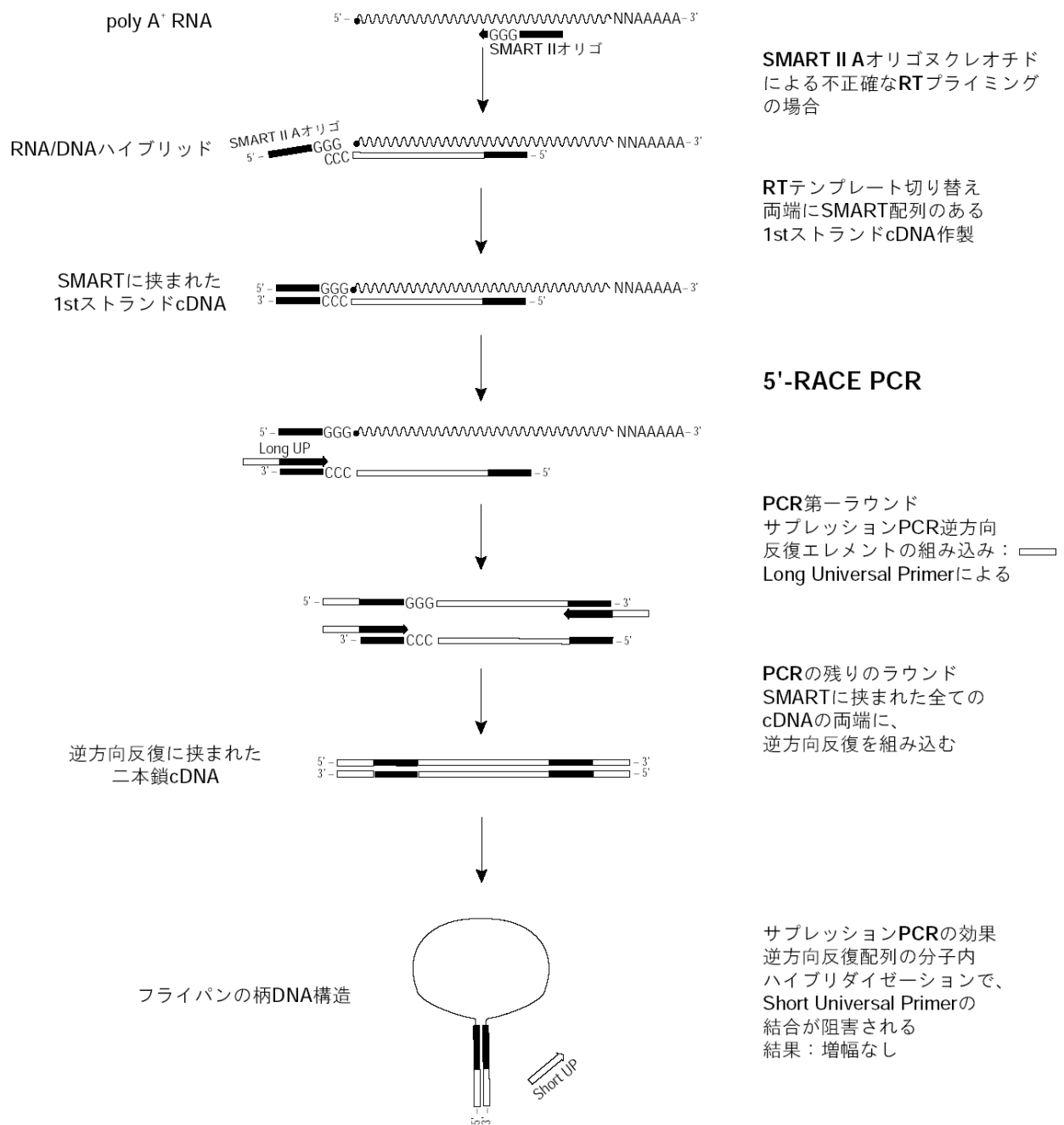


図7. サプレッションPCRとステップアウトPCRの仕組み 不正確に、逆転写反応がSMART II Aオリゴヌクレオチドによって“非特異的に”プライミングされます。この結果、両端にSMART配列を持つcDNAが合成されます。セットアウトPCRのテクニックによって、サプレッションPCR逆方向反復エレメントが、全てのSMART配列の隣に組み込まれます。PCR中に、これらの逆方向反復が分子内で互いにアニールします。この迅速な一次反応により、二次のShort Universal PrimerがcDNAに結合できなくなります。結果として、増幅できないフライパンの柄様構造が形成されます。

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