SMART™ cDNA増幅とサイズ分画の組み合わせによる大きなサイズの完全長クローンの効率的濃縮

Ruth Wellenreuther, Ingo Schupp,
The German cDNA Consortium,
Annemarie Poustka. and Stefan Wiemann

Department of Molecular Genome Analysis,
German Cancer Research Center（DKFZ）,
Heidelberg, Germany

ゲノムの機能解析は、完全長cDNAクローンを分離するためのcDNAライブラリーの質にしばしば左右されます。従来法で作製されたcDNAライブラリーには、高い割合で5'側を欠損したcDNAが含まれており、特に大きなサイズの転写物で顕著です。さらに完全長cDNAの濃縮法の大半は操作が煩雑で、時間がかかり、実施しにくいものです。SMART™ cDNA増幅技術は便利で強力、かつ簡単に実施できる完全長cDNAの濃縮法です。本稿では、SMART™技術をcDNAの綿密なサイズ分画と組み合わせて用い、より長いcDNAクローンを濃縮しました。この方法で得られたライブラリーは平均インサートサイズが長く、5'末端EST（Expressed sequence Tags）のシーケンシングとBLAST解析によって示されるように、大きなサイズの転写物に由来する完全長クローンを高い割合で含みます。

はじめに

哺乳類の遺伝子の完全長cDNAクローンは機能解析には不可欠です。cDNAライブラリーはこのようなクローンの重要なリソースとなっています。従来法により作製されるcDNAライブラリーの問題点は、5'側を欠いたmRNAを用いたためや1stストランド合成が不完全であったため、5'側が欠落しているcDNAが高い割合で含まれていることです。cDNAライブラリーにおいて完全長クローンの割合を増加させるため、いくつかの手法が開発されています（2−6）。しかし、これらの手法は手間がかかり、cDNA合成に先立ってmRNAでのさまざまな精密作業が要求され、かつ大量の試料（5−100 μgのmRNA）が必要です。対照的に、SMART™ cDNA Library Construction Kitは、簡便な方法で、非常に小容量の開始試料（0.025−1 μgのmRNA）を用いて実施することができます。SMART増幅技術はcDNAライブラリー構築のためのPCRベースの方法です。cDNA合成後、完全長に逆転写されたcDNAにのみSMARTオリゴを5'側に付加し、選択的に増幅します。

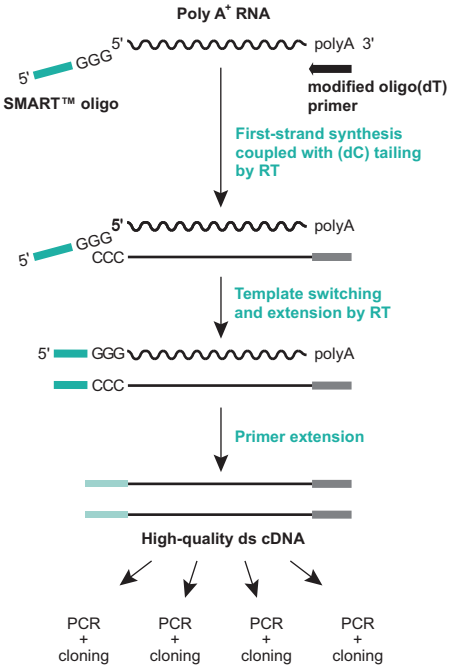

図1. SMART™ライブラリー構築プロセス
1st strand cDNAをSMART™技術を用いて1 μgのmRNAから合成します。本法は逆転写酵素（RT）固有のターミナルトランスフェラーゼ活性に基づいています。RTがmRNAテンプレートの5'末端に達すると、デオキシシチジン（dC）ヌクレオチドが、新たに合成したcDNAストランドの末端に付加されます。SMARTオリゴがdC配列にアニールし、伸長されたテンプレートが産生されます。RTはSMART oligoの末端までcDNAの合成を継続します。2nd strand cDNAは、SMART oligoに組み込まれているユニバーサル配列およびオリゴ（dT）プライマーを用いたプライマー伸長法により容易に合成されます。cDNAはアガロースゲル電気泳動によりサイズ分画を行います。各サイズ画分をそれぞれ増幅し、クローン化します。詳細については、（10）をご参照ください。

しかし、クローニング（ライゲーションと大腸菌への形質転換）中に、大きなフラグメントが不利となるサイズの偏りが生じます。従って、極めて大きなサイズのインサートを持つクローンを、完全長cDNAライブラリーの中に発見することはほとんどありません（7,8）。このサイズの偏りを回避するため、PCR増幅の前にcDNAのサイズ分画ステップを組入れました。本研究において、我々はSMART技術にcDNAのサイズ分画を組合せ、インサートの平均サイズが大きい完全長cDNAのサブライブラリーを得ました。長いcDNAクローンを含むこのサブライブラリーにおいては、完全長クローンの割合も高いものでした。

長い完全長インサートによるSMART™ cDNAサブライブラリーの構築

SMART™ cDNA合成後、PCRによる増幅の前にcDNAのサイズ分画のステップを導入することにより、定めたサイズ範囲内でcDNAを増幅し、クローン化することが可能となりました。PCR、ライゲーション、および大腸菌への形質転換のステップを各分画サイズに実施したことにより（図1）、これらの反応においては短いフラグメントの競合によるサイズの偏りが回避されます。分画は2回の連続するアガロースゲルによるゲル電気泳動により実施します（図2）。大型のフラグメントを含む画分から作製されたサブライブラリーは、極めて大きな平均インサートサイズを示します。従来的に作製されたcDNAライブラリーでは、このようなインサートサイズは実際よりも極めて低い量が示されます。

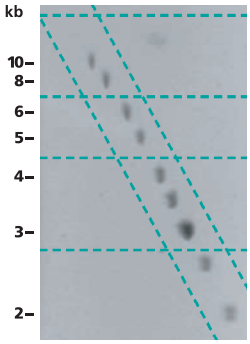

図2. SMART™ cDNAの2回の連続アガロースゲルによるサイズ分画。
1.5−10 kbのDNAラダーをcDNAとともに分画し、各サイズ画分のゲル切片を切り出します。最初の泳動ゲルからゲル切片を切り出し、90度回転させて新しいゲルトレイに置きます。この切片の周囲に新しくゲルを注ぎ、2番目のゲルとします。電気泳動後、DNAラダーを含むゲルの部分を染色して、定規を横に置いて撮影します。図は2番目のゲルの染色されたラダーです。切り取り線を点線で示しています。これに従い、ゲルの染色されていない部分からcDNAを切り出します。

SMART™ cDNA増幅とサイズ分画の組み合わせによる大きなの完全長クローンの効率的濃縮 …続き

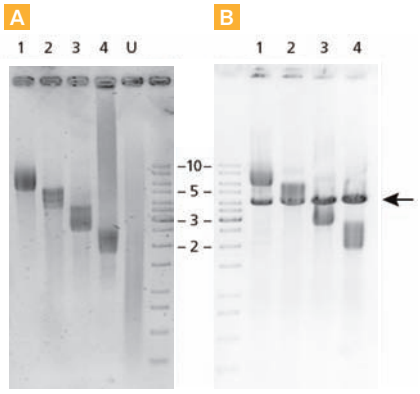

図3. SMART™ cDNAとサブライブラリーの品質管理。

パネルA。PCR増幅したcDNAのクローニング前のサイズ画分です。レーン1：7−10 kb画分。レーン2：4−7 kb画分。レーン3：3−4 kb画分。レーン4：2−3 kb画分。U：分画されていないコントロール。サイズマーカー（単位kb）。

パネルB。**パネルA**に示した増幅したサイズ画分をクローニングすることによって得たサブライブラリーのインサートの分析です。5,000−10,000クローンのプールからのプラスミドDNAを*Sfi* I制限酵素で消化しました。矢印はベクターのバンドを示します。スメアはサブライブラリーのインサートサイズの範囲に対応します。

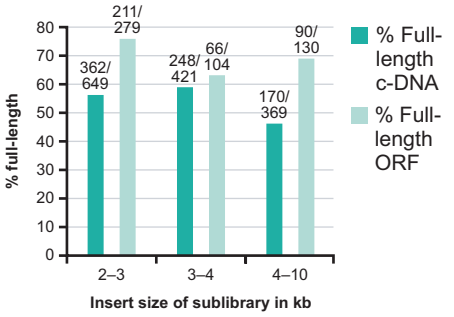

図4. SMART™技術により全てのインサートサイズにおいて高い割合で完全長クローンが産生されます。

ライブラリーの完全長クローンの含有量を推定するため、子宮体癌細胞株ライブラリーからの5'EST配列にBLAST解析を行いました。cDNAおよびORFの完全性を、それぞれヒトRefSeq（「完全長クローン」）およびSwissProt（「全長ORF」）データベースの検索結果から算出しました。3827の5'ESTを分析しました。ヒトRefSeqには1439件、SwissProtには513件のヒットがありました。完全長cDNAおよび全長ORFのヒット数の割合を算出しました。BLAST解析のパラメータ、および完全長cDNAと完全長ORFの基準は文献を参照してください（10）。

図3はPCR増幅後のcDNAサイズ画分（パネルA）、およびサイズ画分サブライブラリーのプールしたクローンの制限酵素消化（パネルB）を示します。各cDNAサイズ画分およびそのサブライブラリーは、ほとんどが分画により定められたサイズ範囲内のフラグメントから構成されています。

完全長クローンの高い割合

これらのサブライブラリーに含まれる完全長クローンの含有量を測定するため、各クローンの5'末端ESTをBLASTアルゴリズム（9）を用いて、ヒトのRefSeqデータベースと比較しました。既知のmRNAとヒットした総数を100％とし、5'末端のマッチするクローンの割合を算出しました。続いて、ORF（Open Reading Frame）の含有量をSwissProtデータベースに対するBLAST解析により決定しました。図4は子宮体癌細胞株から作製した3サイズの画分のライブラリーにおける完全長cDNAおよび全長ORFの含有量を示します。分析したサブライブラリーによって、完全長cDNAクローンは46％から59％の割合、全長ORFは63％から76％の割合でした。完全長cDNAクローンの含有量は、従来のcDNAライブラリーとは異なり、cDNAおよびORFのサイズの増加と共に大きく低下することはありません。4−10 kbのインサートを含むサブライブラリーでは、全長ORFクローンの割合は約70％ですが、これはこのサイズ範囲では極めて高い割合です。

結　論

SMART™ cDNA増幅とcDNAサイズ分画の組合せにより、大きなサイズのインサートを含むcDNAライブラリーを得ました。SMART技術を利用した濃縮は、その他の完全長cDNA濃縮法よりも、はるかに強力で便利な方法です。そして、このライブラリーの5'末端ESTのBLAST解析から、長い転写物由来の完全長クローンが十分に確認されました。

製品名	包装量	Cat. No.	価格
SMART™ cDNA Library Construction Kit	1kit	634901	￥190,000

関連製品

- Creator™ SMART™ cDNA Library Construction Kit（Cat. No.634903）
- SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit（Cat. No.634902）
- Super SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit（Cat. No.635000）
- Large Insert cDNA Libraries（many）
- Creator™ SMART™ cDNA Libraries（many）
- SMART™ RACE cDNA Amplification Kit（Cat. No.634914）

Notice to Purchaser

The Creator™ and SMART™ legal statements （27ページ参照）

参考文献

1. Gubler, U. & Hoffman, B. J.（1983）*Gene* **25**（2-3）:263-269.
2. Kato, S., *et al.*（1994）*Gene* **150**（2）:243-250.
3. Suzuki, Y., *et al.*（1997）*Gene* **200**（1-2）:149-156.
4. Edery, I., *et al.*（1997）*Mol. Cell. Biol.* **15**（6）:3363-3371.
5. Carninci, P. & Hayashizaki, Y.（1999）*Methods Enzymol.* **303**:19-44.
6. Carninci, P., *et al.*（1996）*Genomics* **37**（3）:327-336.
7. Zhu, Y. Y., *et al.*（2001）*Biotechniques* **30**（4）:892-897.
8. Sugahara, Y., *et al.*（2001）*Gene* **263**（1-2）:93-102.
9. Altschul, S. F. *et al.*（1990）*J. Mol. Biol.* **215**（3）:403-410.
10. Wellenreuther, R., *et al.*（2004）*BMC Genomics* **5**（1）:36.