

私にもできた

● ライフサイエンス実験シリーズ ● ● ● VOL.2

LIFE SCIENCE SERIES

遺伝子発現解析編 (前編)

技術の多様化にともなって、日々の研究に占めるライフサイエンス研究試薬・キットの役割は日に日に大きくなってきています。その一方において、情報が増えすぎてどの試薬を使えば良いか分かりにくくなっている、との声も聞かれます。本シリーズは、そのような情報を一旦整理し、初心者の方にも分かりやすく効果的にライフサイエンス実験を解説できないか、との趣旨から企画されました。

第一回目は、『PCRを用いる遺伝子クローニング』を取り上げさせていただきました*。今回は、研究の中心がタンパク質へと移って行く中においても欠くことのできない、『遺伝子発現解析』についてご紹介させていただきます。本稿が、皆様の研究の一助になれば幸いです。



T社バイオ研究所



T社バイオ研究所付近の風景

AKさん
先輩



A子さん
T社 新人研究員

1 遺伝子発現実験に使われるRNAについて

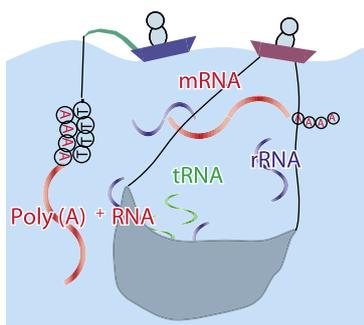
「ライフサイエンス実験で用いられる材料の中でできれば扱いたくないものは？」というアンケートをとったとすれば、リボ核酸(RNA)は確実に上位にランキングされるはずです。RNAの取り扱いについて、ある種の脅迫観念のようなものが出来上がっている方もおられるかもしれません。遺伝子発現解析は、まさにそのRNAを解析します。実験をはじめる前にすこし情報を整理しておきましょう。

1-1 発現実験に用いられるRNAには大きく分けて2種類ある

発現解析実験に使用されるRNAは大きく分けて2種類です。一つは、Total RNAで、主にRNAの化学的性質を利用して精製されたものです。最もよく用いられる精製方法は、AGPC法(Acid guanidium-Phenol-Chloroform法)であり、酸性フェノール中でDNAの水溶性が低下することを利用します。最近では、各社から改良AGPC法のキットが多数販売されています。Total RNAはmRNA、rRNA、およびtRNAの混合物です。そのうちの約1~2%が発現解析の対象となるmRNAだと言われています。また、シリカビーズの表面にRNAを特異的に吸着する精製方法(弊社の『MagExtractor™-RNA-(Code No:NPK-201)』がこれに相当します)等もありますが、いずれもRNAの化学的性質を利用しており、得られるRNAはTotal RNAです。

もう一つは、Poly(A)⁺ RNAと呼ばれるもので、Oligo(dT)とのハイブリダイゼーションを利用してpolyA末端を有するmRNAのみを選択的に分離したものです。

mRNAとは厳密には異なります。精製段階でpoly A末端を有するmRNAが濃縮されるので、mRNAを高感度で検出したい場合に有用です。ただ、Total RNAに比べてリボヌクレアーゼ(RNase)の分解を受けやすいという欠点もあります。



1-2 RNaseの恐怖

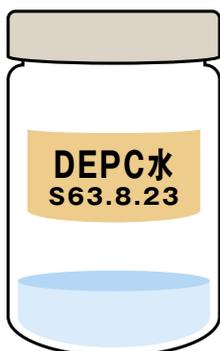
— 本末転倒にご注意 —

RNA分解酵素として知られるRNaseには多くの分子種が知られていますが、いずれも生物の存在するあらゆる所に存在し、また失活しにくいという特徴を有しています。微量でもサンプルに混入するとRNAを分解してしまうため、実験に致命的な影響を及ぼします。

RNAを扱うときはマスク、手袋など完全防備で臨むことも多いのですが、無意識のうちに無頓着なことをしているケースもあり、注意が必要

です。RNA精製において重要なのは、①すばやくサンプルをタンパク質変性剤になじませること、②RNAがタンパク質変性剤やアルコールの環境にある間に高純度化すること、および③精製した後のRNAの取扱いに気をつけること、の3点です。

外的要因で注意することは、唾液や汗などからのRNaseの混入だけではありません。プラスミド抽出などで『試薬として用いるRNase』こそ最大の危険因子です。そのRNaseの量は唾液等の比ではありません。



よって、共有の実験台などはまさに高度危険地帯です。さらに付け加えるならば、細胞などの出発材料を回収する遠心管を念入りに滅菌するよりも、先輩から代々受け継がれてきたような古めかしいDEPC処理水に貴重なRNAを溶解してしまわないことの方が、数倍重要です。

1-3 魅惑の特殊試薬

RNA実験で、ジエチルピロカーボネート(DEPC)処理された滅菌水が広く使われています。この試薬は、アミノ基を修飾することによりRNaseを不可逆的に失活させます。加熱することにより未反応のDEPCは分解されますが、それ以前にトリスなどのアミノ基を有する試薬と混合するとおかしな反応が起きてしまいます。

また、DEPCは大変甘くて魅惑的な匂いがしますが、有害ですので取扱いには注意が必要です。最近では、DEPC処理していないRNase freeの水も販売されていますので、そちらを使う方が良いのかも知れません。DEPCは加熱により分解されますが、分解物まですべてが除去できている保証はどこにもありません。また、ノーザンブロットに用いるホルムアルデヒドなど、RNA解析に用いる試薬には有害なものが多いので、注意が必要です。

1-4 発現解析色々

一昔前まで、遺伝子発現解析といえばノーザンブロット解析が主流でした。かなりの熟練を要する方法であり、結構面倒な方法でした。その流れは形を変え、現在、DNAチップを用いる解析法に引き継がれていると言えます。

その一方でRT-PCRを用いる発現解析法は、感度は良いのですが定量性に問題があると言われていました。その流れは、競合PCR法などを経て、現在、定量性・簡便性に優れたリアルタイムPCR法に落ち着いた感があります。

しかし、どの解析法も一長一短あり、古い方法であっても、自分の実験に最も適した方法を用いることが重要です。例えば、ある一種類の遺伝子の発現を臓器別に比較するような場合、DNAチップを用いるよりもノーザンブロット解析を行った方が明らかに低コストであり、さらにmRNAサイズなどの情報も得られるという利点があります。

また、RT-PCR法を用いて定量解析を行う場合でも、特殊な方法を用いるまでもなく、ワンポイントメモ③で紹介した事例のように、段階希釈したサンプルを通常のRT-PCR法を用いて解析するだけで、効果的に差を示すことができる場合もあります。

2 実践！遺伝子発現解析

A子さんは今年T社バイオ研究所のライフサイエンス試薬開発グループに配属された新人研究員です。大学時代には少し異なる分野の研究を行っていたことから、しばらく様々なチームで研修することになりました。まずは、プロテオミクス研究チームで、タンパク質発現に用いるための発現プラスミドの構築を行い、失敗もありましたが、無事課題を完了しました（前号参照）。その後のタンパク質発現実験もそつなくこなし、次月度から遺伝子解析チームへ移ることになっています。季節はいつの間にか冬を迎えました。

A子さんは次のチームで、「遺伝子発現解析技術」の習得を行うことになっており、以下のような課題が既に出されています。

課題:

- ヒトトランスフェリンレセプター(TFR)遺伝子の発現解析を複数の方法で行うこと。
- 古典的および最新の方法を用いて解析すること。

条件: TFR cDNAのほぼ全長をクローニングして、それを実験に用いること。

ヒント: TFR遺伝子はレア発現遺伝子である(HeLa細胞での発現は確認できている)。

クローニングした遺伝子はプローブやPCRの鋳型として使用可能。

アクセッションNO. X01060の配列を参照すること。

今まで遺伝子発現解析など行ったことのないA子さんは、この課題に少し戸惑っています。古典的な方法はおそらくノーザンブロット解析で、最新の方法はリアルタイムPCR解析なのでしょうか。A子さんは何から手をつけてよいのかイメージが沸きませんが、前回の検討でRT-PCRまでは何とか行っていたので、ある程度それを応用できるはずだと。

チームリーダーのTKさんに相談したところ、残りの半月は主に次のテーマの準備を行なって良いことになりました。TKさんは以前RNA関連の仕事をしてきたとのこと、基礎的なアドバイスはいただけるみたいです。

結局、この前の課題の経験を使ってHeLa細胞からヒトTFRの遺伝子のクローニングくらいはできるだろうということになりました。幸運なことに、HeLa細胞のTotal RNAは、同じチームのAKさんが持っていました。以前ノーザンブロット実験をしたときにAGPC法で分離したものと。ただ昔のことなので、G3PDH(グルコース3リン酸脱水素酵素)などのハウスキーピング遺伝子の増幅をRT-PCRで確かめてから使った方が良くと言って、その増幅用のプライマーもくれました。A子さんは、TFR増幅用のプライマーが届くまでの間、そのプライマーを使ってRNAの品質をチェックすることにしました。

翌日、AKさんを聞いたところ、「確認しない方が悪い」と逆に反撃されてしまいました。ただ、同時にTotal RNAのDNase I処理の方法も教えてもらいました。どんな方法で精製しても、微量のゲノムDNAの混入は避けられないとのこと。

そして今度は、そのプロトコールに従ってRNAを処理し、同様の実験を行いました。その結果、今度はきれいなバンドを得ることができました(図1)。もちろん、今度はコントロール実験も行いました。確認に少し手間取ってしまいましたが、このRNAを用いて次の実験に進んでも良さそうです。

M + - + - DNase I 処理
RTase 反応



図1
G3PDH 遺伝子の増幅結果
M:1kb ladder markers



2-1 なんでバンドが？—思わぬ伏兵—

A子さんは早速、RT-PCRを仕掛けて帰宅し、翌朝すぐに電気泳動で増幅を確認しました。さすがに仕事が速いです。泳動の結果からすると、おそらくRNAの品質は問題ないようです。しかし、なんだかバンドが少しブロードで、ぼんやりしています。TKさんに相談したところ、すかさず、「逆転写反応マイナス(RT(-))のサンプルの結果は？」という返事が返ってきました。

TKさん曰く、G3PDHにはシュード遺伝子が多く、ゲノムDNAが少しでも混入しているとそれもほぼ同じ位置にバンドとして検出され、その増幅はぼんやりしているとのことでした。頭の回転の速いA子さんは、瞬時に自分の失敗に気づきました。AKさんは、このサンプルのことをノーザンブロット用と言っていました。DNase I処理などしていない可能性大です。こんな日に限って、AKさんはまたしても出張のようです。どこを探しても見当たりません。

【プロトコール#1】 Total RNAのDNase I処理

試薬	添加量	
Total RNA溶液	X	
RNase free H ₂ O	8.5-X	
10×DNase I Buffer*	1	
RNase free DNase I (10U/μl)**	0.5	
Total	10	* 100 mM Tris-HCl, 20 mM MgCl ₂ (pH7.5) など
氷上 10~30min		** 酵素は市販品を使用

- 10 μl DNase I処理液
 - ↓ ← 100 μl DW
 - ↓ ← 100 μl TE飽和フェノール
 - ボルテックス、氷上 5min
 - 12,000r.p.m. × 5min
 - 上清
 - ↓ ← 100 μl クロロホルム
 - 12,000r.p.m. × 5min
 - 上清
 - ↓ ← 5 μl グリコーゲン*** (2mg/ml)
 - ↓ ← 100 μl 5M 酢酸アンモニウム
 - ↓ ← 200 μl イソプロパノール
 - 20℃, 30min
- 12,000r.p.m. × 5min
 - 沈殿
 - ↓ ← 1 ml 70%エタノール
 - 12,000r.p.m. × 5min
 - 沈殿
 - ↓ ← 適量のRNase free H₂Oにて溶解

*** 共沈剤。分子生物学用を用いる。

2-2 Poly(A)⁺ RNAの精製—RT-PCR

A子さんは、まずTFR cDNAのほぼ全長にあたる約4.5kbを増幅し、TAクローニングを行う計画です。こうしてクローニングしたcDNAはノーザンブロット解析用のプローブやPCRのコントロール鋳型として使用することができます。

TFR遺伝子はレア発現遺伝子ということなので、A子さんは念のためにTotal RNAからpoly(A)⁺ RNAを精製して、それを鋳型としてRT-PCRを行うことにしました。Poly(A)⁺ RNAは、分けてもらったTotal RNAから、『MagExtractor™ -mRNA-(Code No:NPK-801)』を用いて精製する予定です。このキットは、oligo (dT)を結合した磁性ビーズを用いてpoly(A)⁺ RNAを分離します。磁性分離には、前号にも登場した磁性スタンド『Magical Trapper (Code No:MG5-101)』を使います。

操作内容はプロトコール#2のとおりです。(このプロトコールにもDNase I処理工程が組み込まれていますね!)。ちなみに、このプロトコールを用いて精製したpoly(A)⁺ RNAを同じプロトコールを用いて再度精製することで、より精製度の高いpoly(A)⁺ RNAを得ることができるのですが、今回の検討にはそれほど高純度なRNAは必要でないため、精製は一回にとどめることにします。

A子さんは、AGPC法で分離した50μgのHela細胞Total RNAから出発し、最終的にpoly(A)⁺ RNAを溶出液20μl中に回収しました。この回収液にはまだrRNA等が若干混入していますが、Total RNA中の1%程度がPoly(A)⁺ RNAであると仮定するとPoly(A)⁺ RNAは約0.5μg程度含まれているはずですよ。

次にA子さんは、改良型逆転写酵素をベースとした逆転写キット『ReverTra Ace -α[®] (Code No:FSK-101)』を用いて逆転写反応を行うことにしました(プロトコール#3)。プライマーは、キット添付のoligo (dT)primerとRandom primerに加え、specific primerとしてHTFR R1を使用し、回収したRNA溶液4μl(Poly(A)⁺ RNA約100ng相当)を鋳型として反応を行いました。

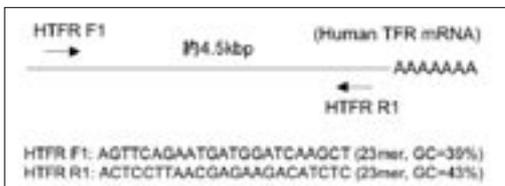


図2 Human TFR mRNAとプライマー

PCR増幅には、得られた逆転写反応溶液1μlを直接用います。今回の検討では、『KOD -Plus- Ver.2 (Code No:KOD-211)』、および念のために『Blend Taq[®]-Plus-(Code No:BTQ-201)』を用いました(プロトコール#4・5)。

前号で説明しましたので詳細な説明は割愛しますが、前者は高い校正活性を有する高正確性ポリメラーゼであり、後者はTaq ポリメラーゼをベースとして開発された高効率ポリメラーゼです。KOD -Plus- Ver.2は大変高い正確性を示す酵素ですが、サンプルによってはTaq系の酵素が適している場合もあります。そこで、今回は両方の酵素を用いて増幅を実施しました。両酵素とも、ポリメラーゼに対する抗体が混合されており、ホットスタートに対応します。

ワンポイントメモ ①

Taqポリメラーゼで増幅した場合でも、すべての増幅断片の3'末端に一塩基付加が起きているわけではないようです。

実際、アンチセンスプライマーの5'末端の塩基の種類によってポリメラーゼのTdT活性による塩基付加の効率に差があることが分かっています。プライマーの5'末端をTaqではAかG、Blend Taq[®]ではAにしたときの活性が最も高いようです。よって、効率よくTAクローニングを行いたい場合はそれを考慮すると良いと考えられます。HTFR F1とR1は、それを考慮して設計されています。

【プロトコール#2】

MagExtractor™ -mRNAを用いるTotal RNAからのPoly(A)⁺ RNAの精製

試薬	添加量
Total RNA (~100 μg)	X μl (88-x)
溶出液*	10
10×DNase I Buffer*	1
RNase Inhibitor (10 units/μl)*	1
DNase I (1 unit/μl)*	1
Total	100

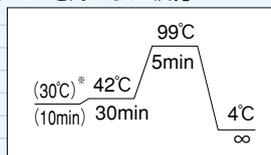
*キット添付

- ↓ 氷上, 15 min
 - ↓ ← 溶解液400μl (2-MEを含む)*
 - ↓ ← 吸着液 800μl
- 前処理済みTotal RNA

- 磁性ビーズ (250 μl)
- 磁性スタンドによる磁気分離 (5分)
- ← 前処理済みTotal RNA
- ボルテックス撹拌 (均一になる程度)
- 10 min 室温静置
- 磁気分離
- ← 1 ml 洗浄液*添加
- ボルテックス撹拌 (均一になる程度)
- 磁気分離
- ← 1 ml 洗浄液*添加
- ボルテックス撹拌 (均一になる程度)
- 磁気分離
- ← 1 ml 洗浄液*添加
- ボルテックス撹拌 (均一になる程度)
- 磁気分離
- スピンドウン後、再度上清を除去
- ← 過量の洗浄液*を添加
- ボルテックス撹拌 (均一になる程度)
- 65℃, 2 min 加熱
- ボルテックス撹拌 (均一になる程度)
- スピンドウン
- 磁気分離
- 上清

【プロトコール#3】 ReverTra Ace -α[®]を用いるRT反応

試薬	添加量
RNase Free H ₂ O	11-X μl
5×RT Buffer	4
Random primer (25pmole/μl) or oligo (dT) primer (10pmole/μl) or specific primer (10pmole/μl)	1
dNTPs	2
RNase inhibitor	1
Poly(A) ⁺ RNA (10-100ng) or Total RNA (10-1000ng)	X
ReverTra Ace [®] -α<逆転写酵素>	1
Total	20



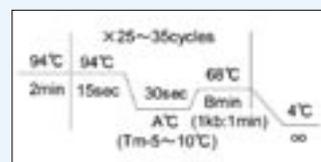
※ Random primerを用いる場合に行います。

ワンポイントメモ ②

逆転写反応後の加熱工程を不思議に思われている方もいるかも知れません。これは、DNA/RNAハイブリッド上に留まった逆転写酵素を引き剥がすことによりPCR効率を向上させるのが目的です。また、DNA/RNAハイブリッドは、DNA/DNAハイブリッドに比べ結合が強く、それを変性する目的もあります。特にReverTra Ace[®]のようなRNaseH⁻の酵素から合成されるcDNAは比較的長く、あらかじめ変性させておくことで、PCR効率を向上させることができます。

【プロトコール#4】 KOD -Plus- Ver.2を用いるPCR高効率&高正確PCR

試薬	添加量	() samples	✓
DW	32 μl	()	<input type="checkbox"/>
10×Buffer for KOD-Plus-Ver2	5	()	<input type="checkbox"/>
2mM dNTPs	5	()	<input type="checkbox"/>
25mM MgSO ₄	3	()	<input type="checkbox"/>
Forward primer (10pmole/μl)	1.5	()	<input type="checkbox"/>
Reverse primer (10pmole/μl)	1.5	()	<input type="checkbox"/>
KOD-Plus- (1U/μl)	1	()	<input type="checkbox"/>
49 μl づつ注			
Genomic DNA (10~200ng)		1	<input type="checkbox"/>
Plasmid DNA (1~50ng)			<input type="checkbox"/>
逆転写反応溶液			<input type="checkbox"/>
Total	50		<input type="checkbox"/>



**【プロトコル#5】 Blend Taq® -Plus- を用いるPCR
高効率 & Long PCR**

試薬	添加量	() samples	<input checked="" type="checkbox"/>
DW	35.5μl	()	<input type="checkbox"/>
10×Buffer for Blend Taq®	5	()	<input type="checkbox"/>
2mM dNTPs	5	()	<input type="checkbox"/>
Forward primer(10pmole/μl)	1.5	()	<input type="checkbox"/>
Reverse primer(10pmole/μl)	1.5	()	<input type="checkbox"/>
Blend Taq®-Plus- (2.5U/μl)	0.5	()	<input type="checkbox"/>
49μlづつ分注			
Genomic DNA (1~1000ng)	1		
Plasmid DNA (1~50ng)			
逆転写反応溶液			
Total	50		

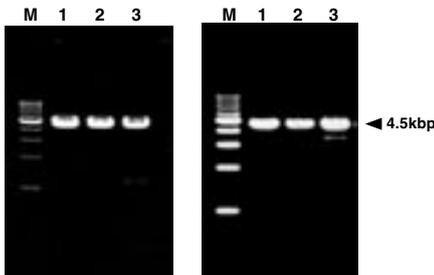
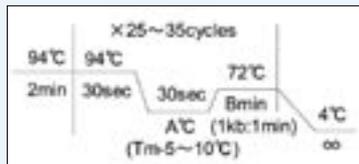


図3
TFR遺伝子のRT-PCR結果
アニーリング:55°C、
伸長:4.5min
1:Oligo (dT) primer
2:Random primer
3:Specific primer
M:1kb ladder markers

KOD -Plus- Ver.2 (30 cycles) **Blend Taq® -Plus- (25 cycles)**

その結果、図3に示すように、両方法においてきれいな増幅を確認することができました。やはりBlend Taq®-Plus-を用いた方が若干効率が良かったようです。しかし今回は、正確性を考慮してKOD -Plus-Ver.2にて増幅したPCRプロダクトをクローニングに用いることにしました。今回のプライマーはGC=39%、43%と理想(50%)より少し低かったのですが、若干長めに設計したせいか、一度で良好な結果を得ることができました。

2-3 平滑末端プロダクトのTA クローニング

A子さんは、KOD -Plus- Ver.2の増幅産物(Oligo (dT))を『TARget Clone™-Plus-(Code No:TAK-201)』を用いてTAクローニングしようとしています。このキットは、KOD、KOD -Plus-、およびKOD -Plus-Ver.2で増幅したPCRプロダクト専用のTAクローニングキットです。KOD ポリメラーゼは高い校正活性を有しているため、増幅産物はほぼ平滑末端になっています。そこで本キットでは、まずPCRプロダクトに抗KOD ポリメラーゼ抗体とTaq ポリメラーゼの混合物であるA-attachment Mixを添加します。抗体によってKOD ポリメラーゼの校正活性がブロックされるとともに、Taq ポリメラーゼの持つTdT活性によってDNAの3'末端に主にアデニンが一塩基付加されます。その後は、通常のTAクローニングと同様です(プロトコル#6)。A子さんは、ライゲーション産物を使ってJM109(DH5αでも可)を形質転換をし、X-gal/IPTG培地にプレーティングして帰りました。

翌朝、A子さんは白コロニーのインサートを、コロニーダイレクトPCR法を用いて確認しました。今回A子さんは、この確認にBlend Taq® (Code No:BTQ-101)を用いてみました。

コロニーダイレクトPCRならば、ホットスタート法に対応していないBlend Taq®でも十分なはずですが。その結果、図6に示すように、4コロニー中3コロニーにインサートを確認することができました。A子さんはさらに、増幅産物をMagExtractor™ -PCR&Gel Clean up-(Code No:NPK-601)で精製した後、その一部を用いてシーケンスを行い、配列が正しいことを確認しました(プロトコルは前号参照)。

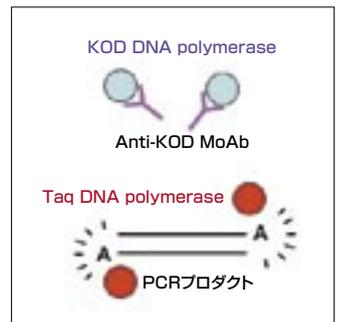


図4 TArget Clone™ -Plus-の原理

【プロトコル#6】 KOD PCRプロダクトのTAクローニング

試薬	添加量	試薬	添加量
PCRプロダクト from KOD	9μl	DW	(3-X) μl
10x A-attachment Mix	1	2x Ligation Buffer	5
Total	10	pTA2 Vector (50ng/μl)	1
60°C、10min			
		上記処理済PCRプロダクト	X
		T4 DNA Ligase	1
		Total	10
		室温 (15~25°C)、30min	

pTA2 Vector:PCR産物は1:3以上が理想

【プロトコル#7】 Blend Taq® を用いるコロニーダイレクトPCR

試薬	添加量	() samples	<input checked="" type="checkbox"/>
DW	21.9μl	()	<input type="checkbox"/>
10×Buffer for Blend Taq®	3	()	<input type="checkbox"/>
2mM dNTPs	3	()	<input type="checkbox"/>
Forward primer(10pmole/μl)	0.9	()	<input type="checkbox"/>
Reverse primer(10pmole/μl)	0.9	()	<input type="checkbox"/>
Blend Taq®(2.5U/μl)	0.3	()	<input type="checkbox"/>
30μlづつ分注			

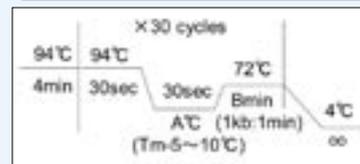


図5
コロニーダイレクト
PCRフロー

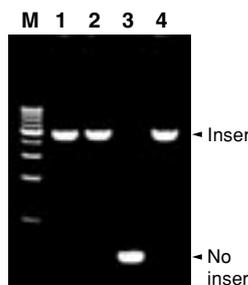


図6
コロニーダイレクトPCR結果
F primer: TCGAGGTCGACGGTATCGAT (20mer, GC=55%)
R primer: CGCTCTAGAACTAGTGGATC (20mer, GC=50%)
アニーリング:55°C、伸長:5min
M:1kb ladder markers



ワンポイントメモ ③

Total RNAの28S rRNAと18S rRNAのバンド比をRNAの品質の指標とされている研究者の方も多いかと思えます。そこでここでは、RNAの分解がPCRに及ぼす影響について調べた結果をご紹介します。

今回、まず段階希釈したRNaseを用いてTotal RNAを部分分解しました。その後、フェノール法を用いてTotal RNAを精製し、そのRNAをさらに段階希釈した後、Oligo (dT) primerを用いて逆転写反応を行い、5'および3'側の700および500bpを増幅するプライマーを用いてマルチプレックスPCRによる解析を行いました。

その結果、完全分解されたRNA(F)では、増幅は認められませんでした。部分分解されたもの(E)については増幅を認めました。ただ、Oligo (dT) プライマーから増幅領域までの距離が長い場合(この場合、5'側の700bp)、増幅効率の低下が確認されました。

また、それぞれの領域について、どのプライマーでの逆転写の効率が良いかについて調べた結果、Oligo (dT) primerを用いた方が良いでしょう。これは、やはり逆転写プライマーから増幅領域までの距離や、プライマーがアニールする確率などが関係しているのではないかと考えられます。

よって、発現解析を行う際には、どのプライマーで逆転写するか、どの領域を増幅するか、さらには、Totalもしくはpoly (A)⁺ RNAのどちらで行うかなどについて、様々な影響を考慮して決定する必要があると思われる。

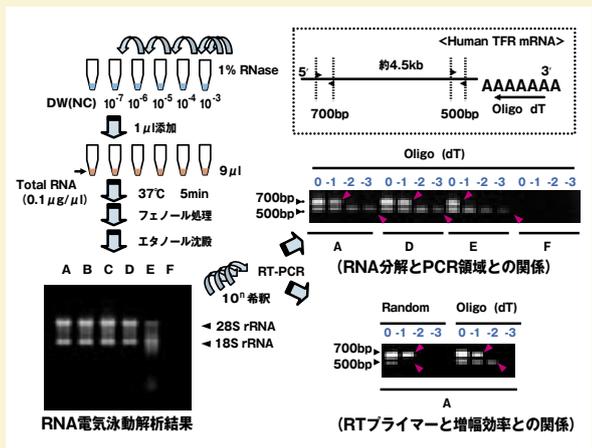


図7 RNAの部分分解実験フローと結果

今回、泳動にはGelMate®電気泳動装置(Code No:GEP-101W)を用いました。この装置のゲルの大きさは、通常のミニゲルよりは少し大きいので、ノーザン解析やサザン解析にはちょうど良いのです。

泳動後、プロトコール#10に従ってRNAを染色した後、酢酸ナトリウムバッファーにて脱色し、きちんと泳動されているかUV照射下確認を行いました(図8)。泳動から後の工程は、特にRNaseに関しては気を使う必要はありません。

大変きれいに泳動されていることを確認したので、次はいよいよブロットングです。キッチン用スポンジはここで使用するようです。A子さんは、流水中でスポンジを何度も洗浄した後、ブロットングに用いる20×SSC溶液で置換し、図9に示すように適当な大きさの容器にセットしました。今回は、チップの空き箱を利用しました。

その後、具体的には図11に示したような形で作業を進めました。ここで、メンブレンはアマシャムバイオサイエンス社のHybond N+を用いました。このポジティブチャージメンブレンがTKさんのお気に入りとのこと。この方法を用いると約4時間という短時間でブロットングが終わるメリットがあります。市販のスポンジの大きさは、何故かGelMate®のゲルの大きさとピッタリです。

ブロットング終了後、ゲルをUV照射してRNAの残留を確認しましたが、無事メンブレンに転写されているようでした。ブロットングのコツはなるべくメンブレンや濾紙をゲルの大きさに切ること、ペーパータオルがスポンジに直接接触しないように、ラップでメンブレンの四方を囲むことです。

【プロトコール#8】 変性ゲルの作製 (100ml分)		【プロトコール#9】 RNA前処理	
試薬	添加量	試薬	添加量
アガロース	1g	10×MOPS	0.5 μl
DW	72ml	ホルムアルデヒド	1.75
10×MOPS	10ml	ホルムアミド	5
電子レンジで溶解⇒60付近まで冷ます		RNA	2.75
ホルムアルデヒド溶液 18ml(ドラフトにて) ゲル型に流し込む(ドラフトにて)		65°C, 15min加温⇒氷上で急冷	
		6×泳動色素	1
		Total	11

【プロトコール#10】 電気泳動およびゲルの処理	
(1)1×MOPSIにて電気泳動(50V)	
(2)1 μg/mlエチジウムブロマイド in 0.05N NaOHにてゲルを染色(15min)	
(3)200mM 酢酸ナトリウムバッファー (pH4.0) にて15min×2回洗浄	
(4)UV照射下にて写真撮影⇒ブロットングへ	

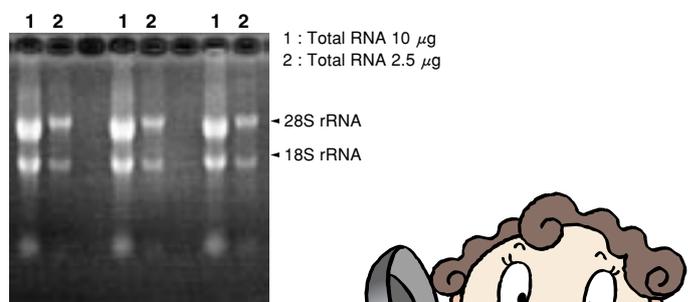


図8 変性ゲルでの電気泳動結果



2-4 ノーザンブロットングに挑戦!

クローニングを1週間で完了したA子さんは手持ち無沙汰になってしまいました。そこで、今回取得したTFR遺伝子をプローブとして、HeLa細胞に発現しているTFR mRNAを、ノーザンブロットング法を用いて検出することにしました。突然のことなので、すぐに使える器具もなく困っていましたが、TKさんが秘伝の方法を伝授してくれるとのこと。A子さんは、その日帰る途中に言いついでおりスーパーでキッチン用のスポンジを購入しました。何に使うのかは不明です。

翌日まずA子さんは、使用する電気泳動装置やゲルメーカーを念入りに洗浄するところからはじめました。特に、プラスミドなどの電気泳動に使用していたような器具は念入りに洗浄する必要があります。

RNAは複雑な2次構造を形成するため均一に泳動するためには、ホルムアルデヒドを含む変性アガロースゲルを使用する必要があります。A子さんはこのゲルをプロトコール#8に従って、ドラフトで作製しました。

一方、Total RNAもプロトコール#9に従って変性しました。そして、変性ゲルにそれぞれ10 μgと2.5 μgとなるようにアプライしました。泳動は、1×MOPSバッファーを用いて電圧50Vで行いました。



図9 低コスト簡易プロッター



図10 GelMate®電気泳動装置

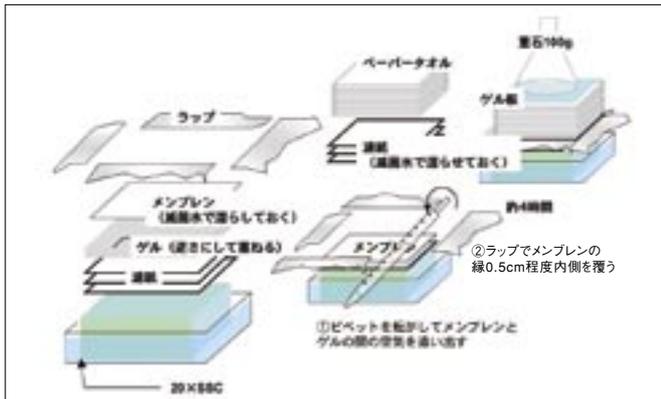


図11 キッチン用スポンジを用いる簡易プロット法

ワンポイントメモ ④ 試薬調製法

20×SSC (1L)

<3M NaCl, 0.3Mクエン酸ナトリウム>

- (1) NaCl:175g、クエン酸三ナトリウム・2H₂O:88gを900mlの滅菌水に溶解する。
- (2) 1N HClを用いてpH7.0に調整した後、1Lにフィルアップする。

10×MOPS (1L)

<0.2M MOPS, 50mM 酢酸ナトリウム, 10mM EDTA (pH7.0)>

- (1) MOPS: 41.9g、酢酸ナトリウム・3H₂O:6.8g、EDTA・2Na・2H₂O:3.7gを約800mlの滅菌水に溶解する。
- (2) 2N NaOHにてpHを7.0に調整。
- (3) 1Lにフィルアップする。
- (4) 必要に応じてフィルター滅菌する。<暗所保管>

*保存中に徐々に黄色に着色してきます。着色が濃くなった段階で再調製します。

【プロトコル#11】 プロット後のRNA固定処理(Hybond N+を用いる場合)

- (1) ラップ上で0.05N NaOHで湿らせた濾紙に転写面を上にして、メンブレンを乗せる。(5min)
 - (2) 2×SSCにて1minリンス
 - (3) 80℃にて30分~2時間ベーキング
 - (4) 繰り返しプローブする場合、UVクロスリンクする。(2回程度使用するだけならば不要)
- *このまま室温で数ヶ月保存可能。

プローブは、今回作製したプラスミドからTFR遺伝子4.5kbをPCR増幅した後、『MagExtractor™-PCR&Gel Clean up-』で精製したDNAを鋳型として、ランダムプライミング法にて³²Pラベルし、調製しました(今回は、市販のキットを用いました)。経験上、このラベル法がもっともコンスタントにきれいな結果が得られるとのこと。ラベル後のプローブの精製は、また『MagExtractor™-PCR&Gel Clean up-』を用いて行いました。この方法は、『PerfectHyb™ (Code No: HYB-101)』の取扱い説明書に記載されていますので参照してください。

ハイブリダイゼーションは、プロトコル#11の方法で処理したメンブレンを用い、プロトコル#12に沿って行いました。ここでは、高効率ハイブリダイゼーションバッファーであるPerfectHyb™を用います。今回、ハイブリダイゼーションおよび洗浄には、ハイブリオープンを用いましたが、ハイブリバッグを用いる方法でも問題ありません。

次の日、Aさんは感光しておいたX線フィルムを現像し、4.5kb付近に明瞭なバンドを確認しました(図12)。はじめてにしては上出来の結果に、Aさんはラジオアイントープ施設の暗室の中でほくそえんでいます。今回、ついでに一般的によく使用されるデンハルトを用いる方法でもトライしましたが、残念ながらバンドを検出することはできませんでした。やはり、レア発現遺伝子なので、従来法ではTotal RNAからバンドを検出するのは難しかったようです。その証拠に、通常のサンプルならば少なくとも2時間のハイブリで十分な結果を得ることのできるPerfectHyb™を用いても、満足いく結果が得るのに16時間のハイブリが必要でした。

さらに翌日、勢いに乗ったAさんは、TKさんからもらった様々な臓器由来のPoly(A)⁺ RNAが乗ったメンブレンを用いて、同様の解析を行ってみました。結果Aさんは、TFR mRNAの発現がPlacentaとHeartで発現が強いことまで突き止めてしまいました(図13)。

【プロトコル#12】 PerfectHyb™を用いる高効率ハイブリダイゼーション解析

- (1) 10cm×10cm (100cm²) のメンブレンに対して最低5mlのPerfectHyb™を加え、68℃にて20分以上プレハイブリダイゼーションを行います。
- (2) プローブを滅菌水で希釈し5分間ボイルします。
(ハイブリ時のプローブ終濃度の目安⇒1~2×10⁶ cpm/mlもしくは1~10ng/ml)
- (3) 68℃にて加温しておいたPerfectHyb™(10cm×10cm (100cm²)のメンブレンに対して最低5ml)にプローブを加え、混和します。
- (4) プレハイブリダイゼーション溶液を捨て、(3)で調製したハイブリダイゼーション溶液を加えます。
- (5) 68℃にて1時間~オーバーナイトでハイブリダイゼーションを行います。
- (6) 68℃に加温しておいた2×SSC・0.1%SDSにて5分間洗浄を2回行います。
- (7) 68℃に加温しておいた2×SSC・0.1%SDSにて15分間洗浄を2回行います。
- (8) メンブレンをろ紙の上に取り出して乾燥し、X線フィルムを感光します。

ワンポイントメモ ⑤

最近、Non-RIでのノーザンプロット解析も盛んに行われるようになってきました。様々な方法がありますが、ジゴキシゲニンなどの低分子物質でラベルされたプローブを、ハイブリダイゼーション後、ラベル化抗体で検出する方法が、感度およびS/Nの点で優れているようです。プロトコル#12においても、終濃度0.2~1ng/mlのNon-RIラベルプローブを用いることで高感度な解析が可能です。

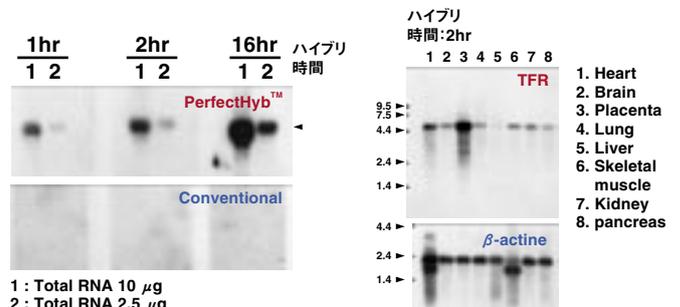


図12 Total RNAを用いたノーザンプロット解析結果

図13 Poly(A)⁺ RNAを用いたノーザンプロット解析結果

Aさんは、なんと次のチームに行く前に、次の課題の前半部分(古典的遺伝子発現解析)をすべて終えてしまいました。Aさんの新チームでの活躍に期待しましょう。

突然、研究所の屋根に固い雪が当たる音が聞こえ、窓の外に目をやると一面が雪に覆われてゆきます。つい本格的な冬がやってきたようです。



A子さん KOD -Plus- Ver2での増幅でエキストラバンドが出たので、ゲルから切り出しました。TAクローニングしたいのですが、プロトコール#6をそのまま使えますか？

TKさん プロトコール#6はPCR反応液をそのまま使用するプロトコールです。この場合、A-attachment mixに加え、dNTP、Mg、Bufferを1×になるよう添加します。これには、増幅に使用したポリメラーゼの試薬を使うことができます。例えば、精製したPCR産物:6.4μl、10×Buffer for KOD-Plus- Ver.2:1μl、2mM dNTP:1μl、25mM MgSO₄:0.6μl、A-attachment mix:1μlという感じです。

A子さん Total RNAの品質を確認したいだけなのですが、変性ゲルは作製が面倒です。もう少し簡単なチェック法はありますか？

TKさん rRNAバンドのチェックだけであれば、PCRプロダクト泳動用の1XTAEで作製したアガロースゲルなどを用いて解析してかまいません。しかし、この方法では時として泳動像に乱れが生じることがあります。コツは、作りたてのフレッシュなゲルを用いることです。またやはり、1×MOPSバッファーで調製したゲルの方がより良い結果を得ることができるようです。当然、ホルムアルデヒド等の添加は必要ありません。さらに、電気泳動サンプルに50%となるようにホルムアミドを添加し、80℃で2分間加熱してから泳動すると更にシャープなバンドを得ることが可能です。

A子さん β-actinをプローブとしたノーザンプロット解析でHeartとSkeletal muscleには低分子域にもう一本バンドがみえます。これは何ですか？

TKさん HeartやSkeletal muscleには、β-actin以外にαやγ-actinなどの筋肉型アクチンが多く発現していることが知られています。これらはβ-actinとの配列の相同性が高く、下に確認されるバンドはこれら筋肉型アクチンのmRNAが検出されているものと考えられます。ちなみに、同じメンブレンを用いて何度か解析を行う場合、発現量の多いβ-actinなどの検出はリブローピングのことを考えて最後に行うのが鉄則です。

A子さん Blend Taq®とBlend Taq®-Plus-の使い分けは？

TKさん Blend Taq®は優れたパフォーマンスを示す高効率Taqポリメラーゼです。Blend Taq®-Plus-には、更に特異性高く増幅ができるように抗Taq抗体が混合されており、ホットスタートPCRを行うことができます。一方、インサートチェックなどの用途には、Blend Taq®で十分対応可能です。ちなみに、両酵素の正確性はTaqの3~4倍程度です。

製品紹介 (T社バイオ研究所における定番製品)

用途	品名	包装	Code No.	価格
高正確PCR	KOD -Plus-	200U×1本	KOD-201	¥30,000
〃 (さらに高効率)	KOD -Plus-Ver.2	200U×1本	KOD-211	¥32,000
正確性の不要なPCR全般	Blend Taq®	250U×1本	BTQ-101	¥19,000
〃 (Hot start可能)	Blend Taq® -Plus-	250U×1本	BTQ-201	¥21,000
高効率RT	RevaTra Ace - α -®	100回用	FSK-101	¥53,000
DNA断片の精製	MagExtractor™ -PCR&Gel Clean up-	200回用	NPK-601	¥25,000
Poly (A) ⁺ RNAの精製	MagExtractor™-mRNA-	5回用	NPK-801	¥40,000
Total RNAの精製	MagExtractor™-RNA-	100回用	NPK-201	¥25,000
プラスミドの精製	MagExtractor™-Plasmid-	500回用	NPK-301	¥30,000
磁性分離 (磁性スタンド)	Magical Trapper	1個	MGs-101	¥38,000
TA Cloning	TARget Clone™	10回用	TAK-101	¥12,000
〃 (KOD専用)	TARget Clone™ -Plus-	10回用	TAK-201	¥16,000
高効率形質転換	Competent High JM109	0.1ml×10本	DNA-900	¥17,000
高効率形質転換	Competent High DH5 α	0.1ml×10本	DNA-903	¥17,000
パーソナル電気泳動装置	GelMate® 2000	1台	GEP-101W	¥40,000
高効率ハイブリ解析	PerfectHyb™ hybridization solution	250ml	HYB-101	¥29,000

☞印は消防法に基づく危険物です。本キットのパーツには、消防法における危険物が含まれます。

TOYOBO 東洋紡績株式会社



ライフサイエンス事業部 (大阪)
〒530-8230 大阪市北区堂島浜二丁目2番8号
TEL 06-6348-3786 FAX 06-6348-3833
(E-mail) order_lifescience@bio.toyobo.co.jp
ライフサイエンス事業部 (東京)
〒103-8530 東京都中央区日本橋小網町17番9号
TEL 03-3660-4819 FAX 03-3660-4951
(E-mail) order_lifescience@bio.toyobo.co.jp

Toyoboテクニカルライン
TEL 06-6348-3888
(9:00~12:00 13:00~17:00(土、日、祝を除く))
FAX 06-6348-3833
(E-mail) techosk@bio.toyobo.co.jp
Toyobo Web Site
[http://www.toyobo.co.jp/bio]

取扱店