

カンショにおける RACE 法を利用した全長 cDNA クローニング

木村貴志・出田 収¹⁾・斉藤 彰

(九州農業試験場・¹⁾国際農林水産業研究センター沖縄支所)

Takashi KIMURA, Osamu IGETA and Akira SAITO :

Full Length cDNA Cloning From Sweetpotato using RACE Method

RACE 法は cDNA の既知の内部塩基配列の情報をもとに未知の領域である 5' 末端 (5'RACE) や 3' 末端 (3'RACE) をクローニングする手法である。従来のライブラリスクリーニングに比べて確実に全長クローンを得ることができるとともに、PCR を用いるため量的に少ない cDNA のクローニングが容易になる。本研究では、RACE 法によるカンショ塊根由来の全長 cDNA クローニングを試みた。

1. 材料および方法

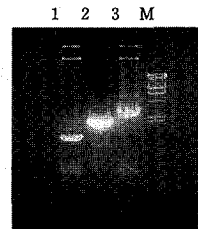
カンショ (高系 14 号) 塊根からの全 RNA 抽出は SDS フェノール法に従った。またポリ (A) RNA の単離には Oligotex-dT30 (Super) (宝酒造) を用いた。cDNA の合成およびアダプター結合は、Marathon cDNA Amplification Kit (CLONTECH) を用い、RACE の PCR 反応の温度サイクルは添付のプロトコールに従った。RACE 用のプライマーとして、既にクローニングしてあるカンショの Q エンザイム II の cDNA 断片の塩基配列をもとにして、27 塩基のオリゴヌクレオチドを 2 種類 (GSP1 および GSP2, 第 1 図) 作製した。Q エンザイム II の 5' 末端および 3' 末端特異的プライマーについても 27 塩基のオリゴヌクレオチドを作製した (5'GSP および 3'GSP, 第 1 図)。耐熱性ポリメラーゼは Advantage cDNA PCR Kit (CLONTECH) を用いた。PCR 産物の検出は 0.8% アガロースゲル電気泳動により行い、クローニングは pT7Blue Perfectly Blunt Cloning Kit (Novagen) を用いた。クローニングした PCR 産物のシーケンスはダイデオキシ法を用いて蛍光 DNA シーケンサーで決定した。

2. 結果および考察

1 μ g の塊根由来ポリ (A) RNA を材料として 2 本鎖

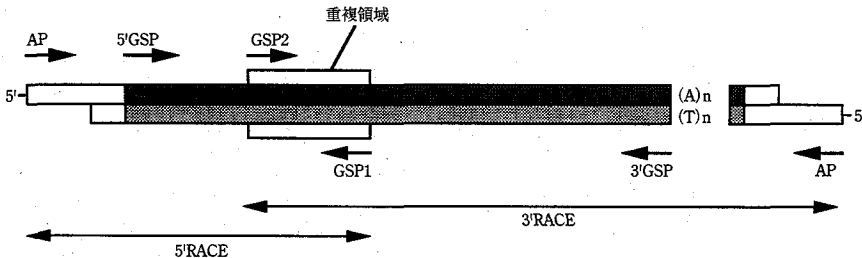
cDNA を合成し、末端を平滑化した後アダプターをつなげて PCR ライブラリーを完成させた。この cDNA を希釈してテンプレートに用いて RACE を行った結果、5'RACE、3'RACE (第 1 図) とともに目的の大きさの増幅断片を得ることができた。これらの増幅断片をクローニングしてそれぞれについて複数クローンの塩基配列を解析した結果、第 1 図に示した両者の重複領域の塩基配列は完全に一致していた。5'RACE 産物の塩基配列より推測されるオープンリーディングフレームはアミノ末端領域を完全に含んでいると考えられた。全長 cDNA を得るため 5'GSP 及び 3'GSP を用いて PCR を行い、得られた増幅産物 (第 2 図) をクローニングして塩基配列を解析した結果、目的の全長 cDNA であることが明らかとなった。

RACE 法を用いた今回の実験より、容易にカンショ塊根由来の全長 cDNA を得ることができた。今回作出した PCR ライブラリーは 100 回以上の PCR に利用することができることから、cDNA クローニングのたびに逆転写反応を行う必要がなく、非常に効率的である。



第 2 図 PCR による全長 cDNA の増幅

注) 1: 5'GSP 及び GSP1 による増幅
2: 3'GSP 及び GSP2 による増幅
3: 5'GSP 及び 3'GSP による増幅
M: サイズマーカー, λ /HindIII



第 1 図 アダプター結合 cDNA と RACE 用プライマー

注) AP: アダプタープライマー
5'GSP: 5'末端特異的プライマー
3'GSP: 3'末端特異的プライマー
GSP1: 5'RACE 用遺伝子特異的プライマー
GSP2: 3'RACE 用遺伝子特異的プライマー