

# 研究助手の経験した基礎研究の難しさ ： cDNA ライブラリの取扱い

瀬尾めぐみ<sup>#1</sup> 牧(黒田)由紀子<sup>#1</sup> 住友日香<sup>#1</sup> 大島玲子<sup>#1</sup> 三ツ井貴夫<sup>#1</sup>

#1 独立行政法人 国立病院機構 徳島病院 臨床研究部 776-8585 徳島県吉野川市鴨島町敷地 1354 番地

受付 2022.3.15 受理 2022.3.20 出版受託 2022.3.25

## 要旨

最近では分子生物学技術の進歩により、自作しなくても polyA<sup>+</sup> RNA からリンカープライマー法により作製したプラスミド DNA 型 cDNA ライブラリーが販売されている。そのため大腸菌を用いて容易に増幅することができる。本研究では、このライブラリーを用いて黒質に発現しているタンパクを網羅的に解析した。TaKaRa バイオ社より黒質 cDNA ライブラリーを購入し、大腸菌を用いてトランスフォームを行った。その後、コロニーをピックアップし、LB 培地にて大量培養プラスミド抽出を行った。そのプラスミドをテンプレートとして使用し、インサート外に設定されたユニバーサルプライマー (T7, T3 primer) を用いて PCR を行い、増幅産物を全ゲノムシーケンス解析した。全ゲノムシーケンス<sup>1)</sup>の結果、得られたリードをゲノムにマッピングしたところ、9割が EIF1 遺伝子であった。このことからマップされたリードは、cDNA ライブラリー由来の約 300bp の PCR 産物であることが推察された。そのため、大量培養したプラスミドをテンプレートに再度 PCR を行い、アガロースゲルで電気泳動を行うと、約 300 bp にはっきりとしたバンドが検出された。購入したプラスミドを増やしたものは同じものという先入観にとらわれることなく、一つ一つ確認していくことの重要性を改めて痛感した。

**キーワード：** PolyA<sup>+</sup>、 cDNA ライブラリー、全ゲノムシーケンス PCR

## はじめに

最近では分子生物学技術の進歩により、自作しなくても polyA<sup>+</sup> RNA からリンカープライマー法により作製したプラスミド DNA 型 cDNA ライブラリーが販売されている。そのため大腸菌を用いて容易に増幅することができる。本研究では、このライブラリーを用いて黒質に発現しているタンパクを網羅的に解析した。

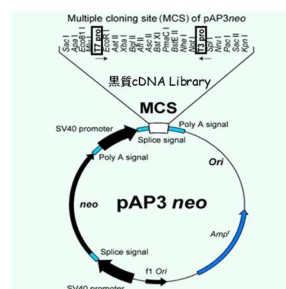
## 対象と方法

### 黒質 cDNA Library

TaKaRa バイオ社より黒質 cDNA Library を購入し、大腸菌を用いてトランスフォームを行った。その後、コロニーをピックアップし、LB 培地にて大量培養を行いプラスミド抽出を行った。増やしたプラスミドを template として使用し、インサート外に設定されたユニバーサルプライマー (T7, T3

primer) を用いて PCR を行い、増幅産物について全ゲノムシーケンス解析 (ダナフォーム 横浜 日本) を行った。ベクターマップ、増幅 PCR 条件は図 1 に示す。

図 1 Template に用いた黒質 cDNA Library



Plasmid のため、大腸菌を用いて大量増殖し、増やしたプラスミドをテンプレートにし、T3, T7 プライマーで増幅し全ゲノムシーケンス解析を行った。

<PCR 条件>

|                   | μl              |
|-------------------|-----------------|
| template          | 100ng           |
| Primer            | T7(10pmol/μl) 5 |
| Primer            | T3(10pmol/μl) 5 |
| TakaRa DnaMix     | 25              |
| dH <sub>2</sub> O |                 |
| Total             | 50              |

T7 primer primer: TAA TAGACTACTA TAGG  
T3 promoter primer for pAP3neo: ATT ACCGCT CACTA TAGGG

## 2. 増幅した template の検証

TaKaRa バイオ社より黒質 cDNA Library を購入した sample と大腸菌を用いてトラン

**Correspondence to:** 瀬尾 めぐみ. 独立行政法人 国立病院機構 徳島病院 臨床研究部 776-8585 徳島県吉野川市鴨島町敷地1354番地 Phone: +81-88-324-2161 Fax: +81-88-324-8661 e-mail: seo.megumi.ey@mail.hosp.go.jp

スフォームを行い、プラスミド抽出した サンプルをそれぞれ template にし、PCR 増幅を行った。PCR 条件は、Premix(TaKaRa) 12.5uL, T7 primer(10pmol/uL) 2.5uL, T3 for pAP neo3 primer(10pmol/uL) 2.5uL, dH2O 6.5uL, template(50ng) 1uL total 25uL, 98 °C 3min, 98 °C 10sec, 55°C 5sec, 72°C 2min, 30cycles, 72°C 5min.

また、EIF1 の中でも 323bp の領域に集中していた。ペアになるリードの両端にプライマー配列があることから、約 300bp の PCR 産物由来であると考えられた。PCR 産物のサイズ分布をグラフに示すと、やはり 300bp 付近に顕著な peak が認められた。このことよりシーケンス結果で得られたデータはこの peak の PCR 産物が EIF1 にマップされたものと考えられた。(図 3.4)

## 結果

### ① 全ゲノムシーケンス

図 2 に示す通り、マップされたリードの 98% は EIF1 でありその他の遺伝子データはほとんど得られなかった。ゲノムにマップされたリード (58,006,716 本) のうち、52,128,402 本が EIF1 にマップされた。

### ② 増幅した template の検証

購入したプラスミドと増幅したプラスミドをそれぞれ template とし PCR を行うと、増幅したプラスミドでは約 300bp の PCR 産物が鮮明に確認できた。(図 5)

図 2

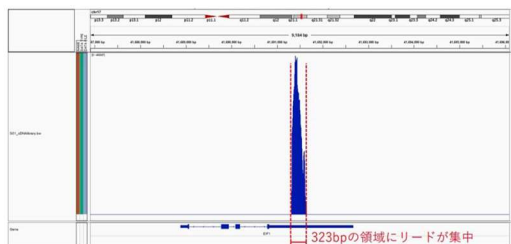
マップされたリードのほとんどはEIF1だった！

| GeneName   | Type                   | Chr   | Length | Seq. cDNAlib | Percent  |
|------------|------------------------|-------|--------|--------------|----------|
| EIF1       | protein_coding         | chr17 | 3,823  | 52,128,402   | 98.4185% |
| PRKN       | protein_coding         | chr6  | 12,024 | 826,912      | 1.4252%  |
| VEGFA      | protein_coding         | chr6  | 14,431 | 2,024        | 0.0034%  |
| UNKL       | protein_coding         | chr15 | 7,494  | 772          | 0.0013%  |
| DGT        | protein_coding         | chrX  | 9,785  | 881          | 0.0015%  |
| VGLL4      | protein_coding         | chr3  | 7,228  | 494          | 0.0008%  |
| COX7A2L    | protein_coding         | chr2  | 5,608  | 233          | 0.0004%  |
| MCCR       | protein_coding         | chr18 | 8,730  | 224          | 0.0004%  |
| PRKDC      | protein_coding         | chr8  | 15,409 | 217          | 0.0004%  |
| DNAJC3     | protein_coding         | chr1  | 2,892  | 145          | 0.0003%  |
| HDAC8      | protein_coding         | chrX  | 32,888 | 120          | 0.0002%  |
| UPF1       | protein_coding         | chr19 | 6,579  | 84           | 0.0001%  |
| RAB37      | protein_coding         | chr17 | 5,072  | 72           | 0.0001%  |
| PAKBP1     | protein_coding         | chr21 | 7,125  | 82           | 0.0001%  |
| MTCO2P25   | unprocessed_pseudogene | chr7  | 1,799  | 38           | 0.0001%  |
| LINC00455  | lncRNA                 | chr12 | 3,722  | 32           | 0.0001%  |
| PCB1       | protein_coding         | chr1  | 2,884  | 30           | 0.0001%  |
| AC101964.2 | lncRNA                 | chr8  | 4,621  | 30           | 0.0001%  |
| MTCO2P26   | unprocessed_pseudogene | chr7  | 891    | 28           | 0.0001%  |
| NAVS       | protein_coding         | chr10 | 13,278 | 28           | 0.0001%  |
| TTC6       | protein_coding         | chr14 | 8,261  | 27           | 0.0001%  |
| PARP6      | protein_coding         | chr15 | 7,848  | 27           | 0.0001%  |
| LINC00806  | lncRNA                 | chr8  | 9,728  | 26           | 0.0000%  |
| SETD1A     | protein_coding         | chr16 | 6,372  | 24           | 0.0000%  |
| C19orf97   | protein_coding         | chr19 | 3,840  | 23           | 0.0000%  |
| SCAF1      | protein_coding         | chr21 | 5,977  | 23           | 0.0000%  |
| UHRF1      | protein_coding         | chr1  | 9,248  | 22           | 0.0000%  |
| OR10U1P    | unprocessed_pseudogene | chr10 | 908    | 22           | 0.0000%  |
| AC117922.2 | lncRNA                 | chr8  | 887    | 21           | 0.0000%  |

マップされたリードの98%がEIF1であり、その他の遺伝子データはほとんど得られなかった。

図 3

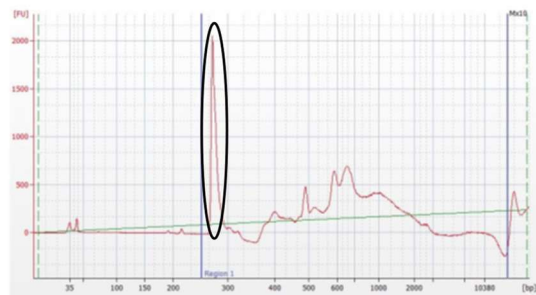
IVGブラウザによるEIF1リードのマップ位置



ゲノムにマップされたリード (58,006,716 本) のうち、52,128,402 本が EIF1 にマップされた。また、EIF1 の中でも 323bp の領域に集中していた。ペアになるリードの両端にプライマー配列があることから、約 300bp の PCR 産物由来であると考えられた。

図 4

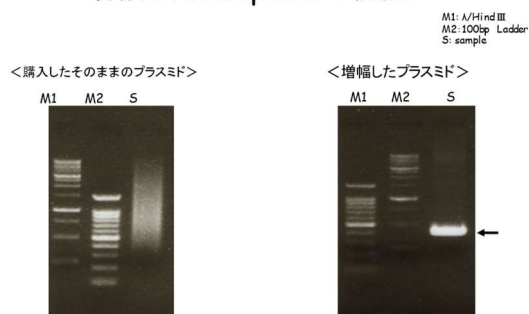
PCR産物のサイズ分布



やはり 300bp 付近に顕著な peak が認められた。このことよりシーケンス結果で得られたデータはこの peak の PCR 産物が EIF1 にマップされたものと考えられた。

図 5

## 増幅したtemplateの検証



購入したプラスミドと増幅したプラスミドをそれぞれ template としPCRを行うと、増幅したプラスミドでは約 300bpのPCR産物が鮮明に確認できた。

## 考察

- ① 黒質 cDNA Library を購入し、大量培養を行いプラスミド抽出を行った。そのプラスミドを template として、インサート外に設定されたユニバーサルプライマー (T7, T3 primer) を用いて PCR を行い、PCR 産物を全ゲノムシーケンス解析した。
- ② 全ゲノムシーケンスの結果、得られたリードをゲノムにマッピングしたところ、9 割が EIF1 遺伝子であった。このことからマップされたリードは、cDNA ライブラリー由来の約 300bp の PCR 産物であることが推察された。
- ③ 購入したプラスミドを増やしたものは同じものという先入観にとらわれることなく、一つ一つ確認していくことの重要性を改めて痛感した。

## 文献

- 1) Tyler S. Alioto TS, Buchhalter I, Derdak S, et al.. "A comprehensive assessment of somatic mutation detection in cancer using whole genome sequencing.", Nature Communications, doi: 10.1038/ncomms10001