

In Situ Hybridization用 RNA プローブの in vitro 作製と信頼性の検討

高木 均, 田中幸枝, 坪井節子, 松川 茂 (福井医科大学 実験実習機器センター)

Hitoshi Takagi, Yukie Tanaka, Setsuko Tuboi, Shigeru Matsukawa

Production of Dig-labeled sense and anti-sense RNA probes only with in vitro system
and reliability check of the probes for application to in situ hybridization

The popular way to prepare RNA probes contains several laborious steps of time-consuming process such as recombinant experiments (usually about 5 days). Here we examined the simple, easy method to generate template DNA for synthesis of template specific RNA probe by using a LignScribe PCR Promotor Addition Kit. With this method comprising of only two successive processes, ligation of a T7 promoter sequence to target DNA previously amplified and PCR of T7 promoter-target DNA hybrid, we could obtain template DNA for preparing RNA probe in about 2hrs without any subcloning procedures. According to this method, we synthesized c-myc gene specific digoxigenin(Dig)-labeled sense and anti-sense RNA probes and evaluate the product size and purity. Finally, these probes generated according to the present method was proven to be practically useful for in situ hybridization experiment to detect intracellular c-myc mRNA.

1. はじめに

遺伝子発現の実験においては、核酸の検出を行うために RNA プローブが頻繁に使用されている。しかし、RNA プローブを作るには目的の遺伝子の cDNA を RNA ポリメラーゼ (T7, SP6 など) のプロモーターを有するプラスミドにサブクローニングしなければならず (in vivo 法)、多くの時間と労力が必要である。また、組替え DNA 実験申請が必要となる。今回、我々は Ambion 社の LignScribe PCR Promoter Addition Kit を用い、PCR 増幅した目的遺伝子の cDNA に RNA ポリメラーゼのプロモーターを直接付加することで RNA プローブ合成用のテンプレートを in vitro で短時間に作製し、それより RNA プローブを作製する方法を試みた (in vitro 法)。この方法では、RNA プローブ合成用のテンプレートを約 2 ~ 3 時間で作製でき、遺伝子特異的プライマーを選択することによりセンスまたはアンチセンス RNA プローブを選択的に作製できる。しかし、この方法で作製した RNA プローブの問題点としてアンチセンス RNA プローブへのセンス RNA プローブの混入、また、その逆の可能性がある。プローブの純粋さが問題となる。そこで、我々はこの方法により c-myc 遺伝子に対する特異的な DIG (digoxigenin) 標識 RNA プローブを試験管内反応だけで作製した。そして、RNA プローブの純度と信頼性を確認すると共に、実際に HeLa 細胞における c-myc mRNA の発現を in situ Hybridization により検出できるか実証実験を行った。

2. RNA プローブ作製手順

PCR 増幅した目的遺伝子の cDNA に RNA 合成プロモーター配列 (T7 Promoter Adapter) を ligation する。Ligation の反応時間を 10 ~ 15 分程度の短時間に留めると、cDNA のどちらか一方にアダプターが結合した 2 種類の cDNA が得られる。次に、cDNA に T7 Promoter Adapter が結合した cDNA のうち、センス

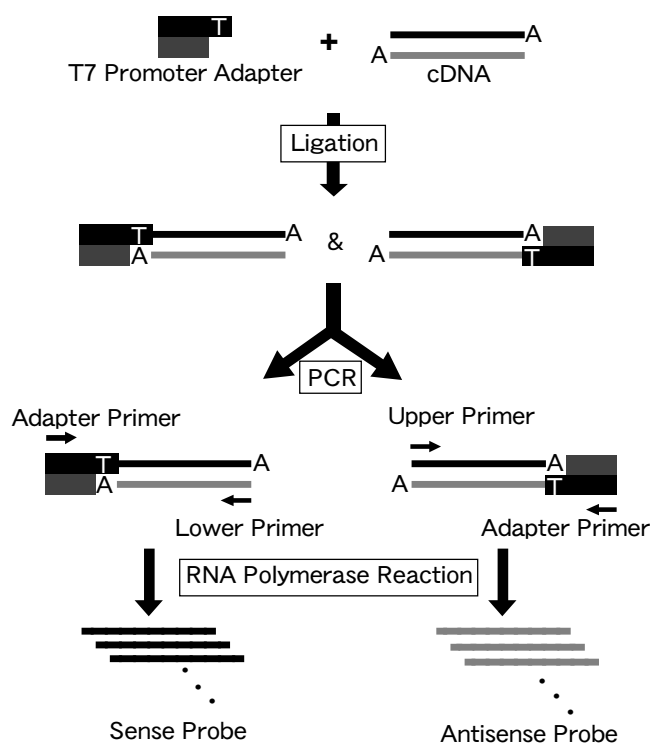


図1 RNA プローブ作製手順

プローブ作製のテンプレートを増幅する場合は、アダプター特異的な配列を持つ Adapter Primer と cDNA の Lower Primer で増幅する。また、cDNA の Upper Primer と Adapter Primer で増幅すると、アンチセンスプローブ用のテンプレートが増幅される。このように、センスもしくはアンチセンス用のテンプレートを別々に増幅することができ、最後に RNA ポリメラーゼ反応を行い標識されたセンスプローブまたはアンチセンスプローブが作製できる (図 1)。

3. RNA プローブの作製

(1) Ligation

ヒト白血球から RT-PCR により増幅した c-myc 遺伝子の cDNA (524bp) と RNA 合成プロモーター配列 (T7 Promoter Adapter) を結合させるため、室温で 15 分 ligation 反応を行った (表 1)。

(2) テンプレートの PCR

PCR はホットスタート法により行い、PCR サイクルは 94, 64, 72 で 40 サイクル行った。増幅されたテンプレート DNA を確認するためポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行ってみると、524bp の cDNA に約 60bp のアダプターが結合しているため、約 580bp の大きさのテンプレートが増幅されているのが確認できた (図 2)。

(3) RNA 合成

PCR 増幅したテンプレートをもとに RNA 合成反応を 37 で 2 時間行った (表 2)。反応後、作製した RNA プローブを確認するためプローブを精製した後、変性

cDNA (25ng/ μ l)	1 μ l
T7 Promoter Adapter	1 μ l
T4 DNA Ligase (10 x)	1 μ l
Ligation Buffer (10 x)	1 μ l
H ₂ O	6 μ l
Total	10 μ l

表 1 ligation 反応

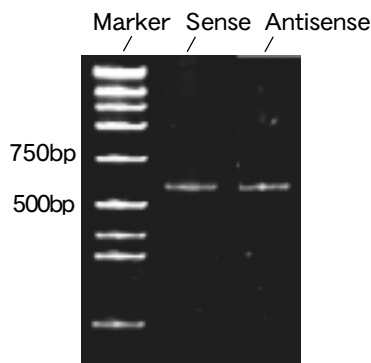


図 2 テンプレートの電気泳動

gel:5%Acrylamide, buffer:0.5 x TBE, current:40mA, time:20min

ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行った (図 3)。作製した RNA プローブの収量を分光光度計で測定した結果、センスプローブは 6.8 μ g, アンチセンスプローブは 3.8 μ g 合成されていた。

4. プローブのテスト

作製した RNA プローブの検出限界を検討するため、メンブレンに希釈したプローブをスポットし、アルカリフォスファターゼ標識の DIG 抗体と反応させ化学発光により検出を行った。その結果、センス、アンチセンスプローブとも 0.13pg まで検出できた (図 4)。

Template DNA	200 ng
T7 RNA Polymerase (50U/ μ l)	1 μ l
DIG RNA Labeling Mix (10 x)	2 μ l
Polymerase Buffer (10 x)	2 μ l
DTT (50mM)	2 μ l
H ₂ O	13 μ l
Total	20 μ l

表 2 RNA 合成反応

DIG RNA Labeling Mix : DIG-11-UTP(3.5 mM), UTP(6.5 mM), ATP(10 mM), GTP(10 mM), CTP(10 mM) [Roche]

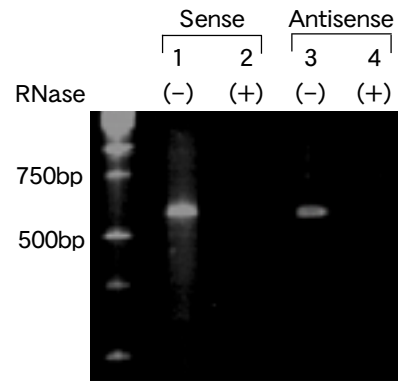


図 3 RNA プローブの電気泳動

RNase(-)のサンプルはバンドが検出されなかったが、RNase(+)のプローブはバンドが検出され、RNA プローブが合成されていることが確認できた。

gel:5%Acrylamide · 8MUrea, buffer:0.5 x TBE, current:40mA, time:25min

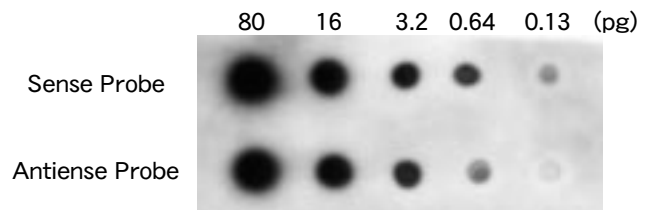


図 4 DIG 標識 c-myc RNA プローブの検出限界の検討 RNA プローブの希釈系列を Hi-Bond-N⁺ ナイロンメンブレンに 1 μ l スポットし、アルカリフォスファターゼ標識の DIG 抗体と反応させ化学発光により検出を行った。

次に、RNAプローブによるハイブリダイゼーションの選択制と検出限界の検討を行うため、コントロールDNAの希釈系列をメンブレンにスポットし、作製したRNAプローブによりハイブリダイゼーションを行った(図5)。ポジティブコントロールはc-myc遺伝子を挿入したpGEM-T Easy Vectorを用い、ネガティブコントロールは同じベクターに別の遺伝子(SfiIM)を組み込んだものを用いた。その結果、センスとアンチセンスプローブともポジティブコントロールにおいてのみ1.6pgまで検出できた。

5. in vitro 法の問題点

最初のステップでcDNAとアダプターのligationを行うが、この時cDNAの両端にアダプターが結合したテンプレートが生成され、センスもしくはアンチセンステンプレートと共にPCR増幅される可能性がある(図6)。このような副生成物テンプレートはcDNAの両端にT7プロモーター領域を持つため、センス及びアンチセンスプローブの両方が生成され、アンチセンスRNAプローブへのセンスRNAプローブの混入、また、その逆の可能性がありプローブの純粋さが問題となる。しかし、両端にアダプターが結合したcDNAでは、アダプター配列が約60塩基あり、末端同士が相補的なために図7のようなフライパン型の構造ができPCR増幅が抑制される事が知られている。このため、副生成物テンプレートは、ほとんど増幅できないと考えられる。そこで、確認の為、PCR増幅したセンス及びアンチセンスRNAプローブ用テンプレートをそれぞれプラスミドベクターに挿入しサブクローニン

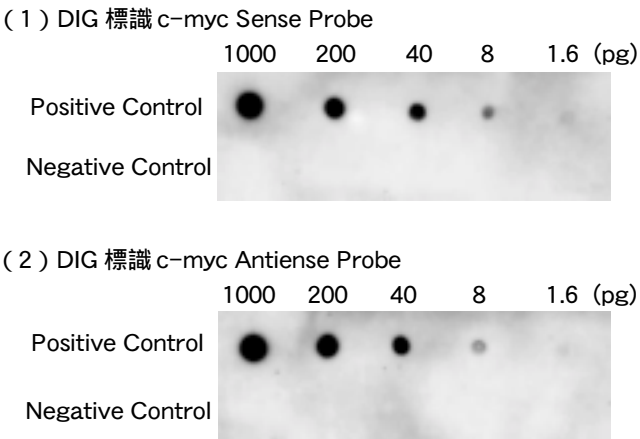


図5 DIG 標識 RNA プローブによる Hybridization の選択制と検出限界

コントロールDNAの希釈系列をメンブレンにスポットし、作製したDIG 標識 RNA プローブによりハイブリダイゼーションを行った。Positive Controlはc-myc遺伝子を挿入したpGEM Vector、Negative Controlは同じベクターに別の遺伝子(SfiIM)を組み込んだものを用いた。

グを行い、DNAシーケンサーで配列を決定した。その結果、センスプローブのテンプレートはc-mycの上流にプロモーターアダプターがあり、一方、アンチセンステンプレートはc-mycの下流にプロモーターアダプターがあるのが確認でき、アダプターがcDNAの両端に結合した副生成物テンプレートは確認できなかった。しかし、サブクローニングではPCR増幅したテンプレートのごく一部をクローニングしているだけであるため、テンプレートの中に、ごくわずかに副生成物

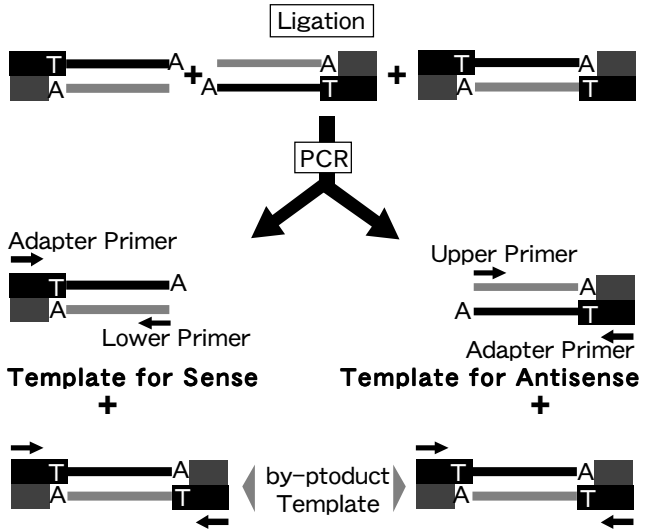


図6 in vitro 法の問題点

cDNAの両端にアダプターが結合した副生成物テンプレートからはセンス及びアンチセンスプローブの両方が生成されるためプローブの純粋さが問題となる。

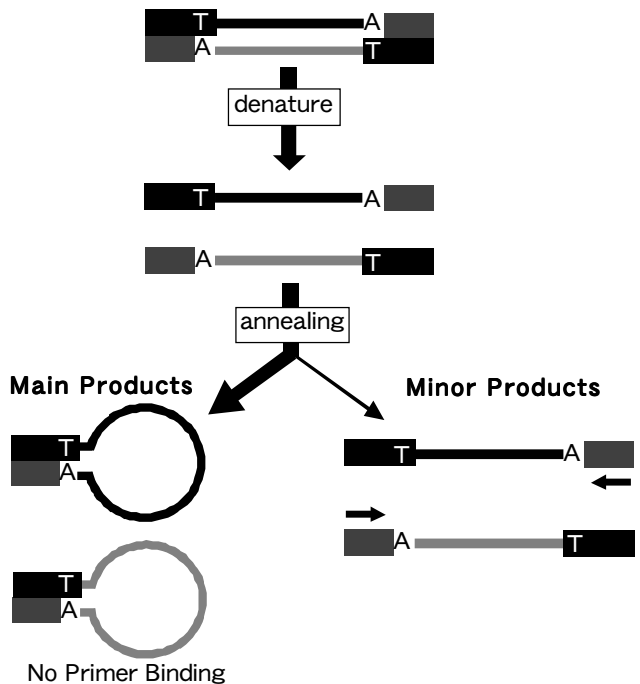


図7 Suppression PCR

cDNAの両端にアダプターが結合した場合、アニーリングした1本鎖のほとんどはフライパン型の構造になり、PCR増幅が抑制される事が知られている。

テンプレートが含まれている可能性もある。そこで、サブクロニングしたテンプレートより c-myc のセンス及びアンチセンス RNA を DIG 標識を付加せずに作製した。そして、作製した未標識 c-myc RNA の希釈系列をメンブレンにスポットし、DIG 標識 RNA プローブでハイブリダイゼーションを行い、RNA プローブの純度を検討した(図8)。その結果、DIG 標識センスプローブは、未標識のアンチセンス c-myc RNA とハイブリダイズするが、一方、反応するはずの無いセンス RNA とともに、わずかに反応しているのが確認できた。これは、副生成物テンプレートがわずかに出来ることにより、センスプローブの中にアンチセンスプローブが混入していることが考えられる。そして、その混入の割合は RNA の希釈率よりおよそ 1/100 ぐらいであると思われる。

同様に、アンチセンスプローブも、ごくわずかにアンチセンス c-myc RNA とハイブリダイズしており、セ

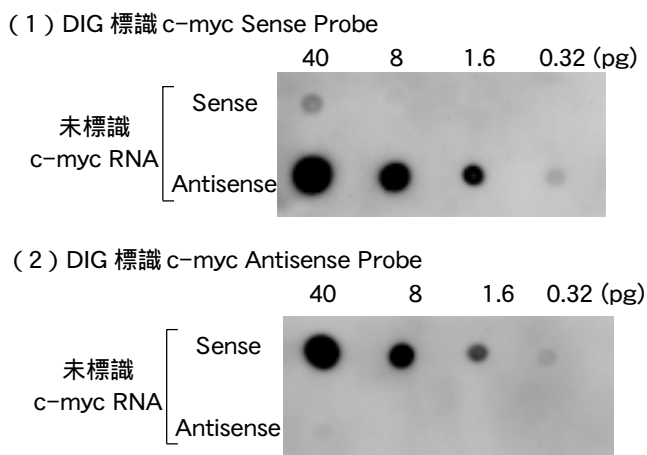


図8 DIG 標識 RNA プローブと未標識 c-myc RNA との Hybridization

未標識 c-myc RNA の希釈系列をメンブレンにスポットし、DIG 標識 RNA プローブでハイブリダイゼーションを行いプローブの純度の検討を行った。

ンスプローブが混入していると考えられる。しかし、両方のプローブともその混入の割合は 1/100 からそれ以下と思われるので、実際には問題ないと考えられる。

5. in situ Hybridization

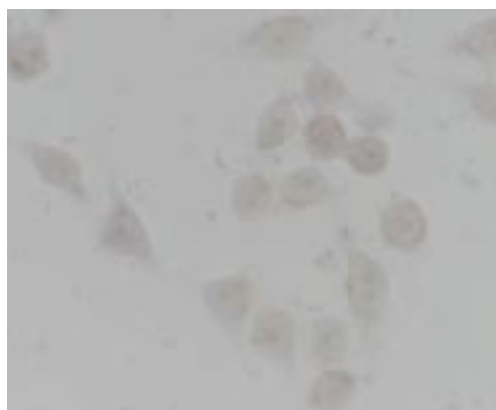
作製したプローブを使用して HeLa 細胞の c-myc mRNA を検出するために、in situ Hybridization を行った。センスプローブでは反応が無いが、アンチセンスプローブでは細胞質で反応が強く見られ、核ではほとんど反応は見られなかった(図9)。

6. まとめ

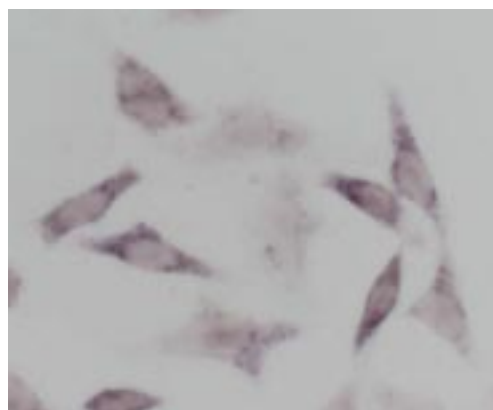
in vivo 法と in vitro 法を比較すると、作製時間では in vivo 法は約 5 日必要だが in vitro 法では約 2 日と非常に短時間で作製できる(表3)。また、組換え実験申請は in vitro 法では必要無く、プローブ作製の簡便性も in vivo 法に比べ in vitro 法では簡単な操作だけで行うことができる。プローブの信頼性に関しても、実用上は問題ないと思われる。また、経済性では in vitro 法ではサブクロニングする必要が無い分安上がりになると思われる。

	in vivo 法 (プラスミドへの 組み込み)	in vitro 法 (プロモーターの 直接付加)
作製時間	約 5 日	約 2 日
組換え実験申請	必要	不要
簡便性	+	+++
信頼性	+++	+++
経済性	++	+++

表3 in vivo 法、in vitro 法の比較



(1) DIG 標識 c-myc Sense RNA probe



(2) DIG 標識 c-myc Antisense RNA probe

図9 In Situ Hybridization

試料：HeLa 細胞、抗体：anti DIG-AP、発色：NBT/BCIP