

# Clontech PCR-Select™ Subtraction and Screening



PCR サブトラクション  
— 発現差のある遺伝子の濃縮と検出 —

改訂版

Takara

 Clontech

## 発現差のある遺伝子をギュッと濃縮

# Clontech PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit

製品コード 637401

### 新規遺伝子、発現量に差のある遺伝子を単離

Clontech PCR-Select cDNA Subtraction Kitは、クロンテック独自の技術\*によるPCRサブトラクション法を用いて、発現量に差のある遺伝子(2種類のmRNA集団の一方が発現しているが、他方では低下または発現していない遺伝子)を選択的に増幅します。<sup>1~3)</sup>

\*: 米国特許第 5,565,340 号、第 5,759,822

### 希少な転写産物を1,000倍以上に濃縮

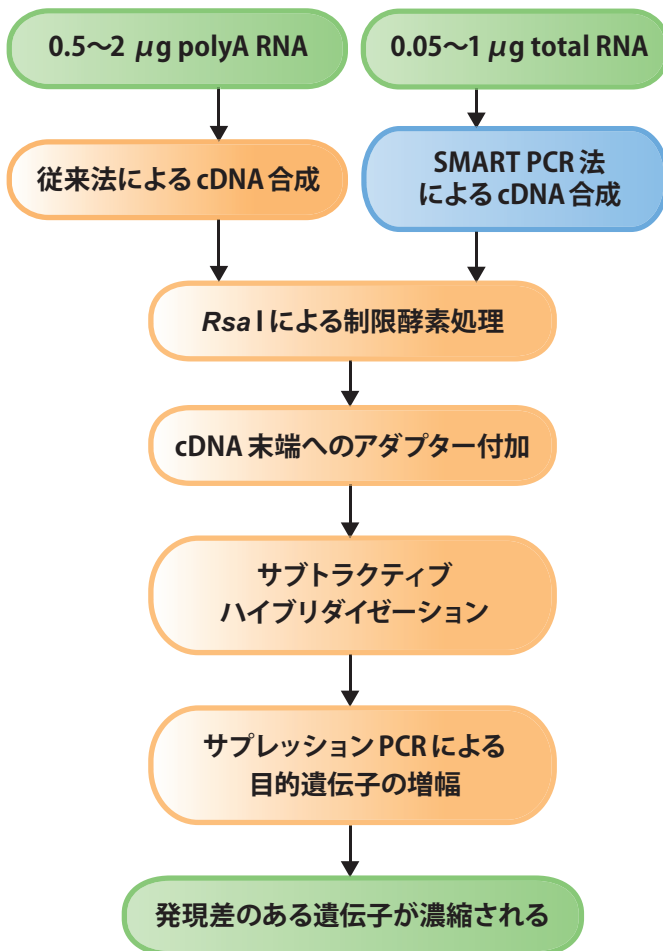
PCR-Select法は、ハイブリダイゼーションおよび、発現量差のある遺伝子を増幅する(サブプレッションPCR)際に、サブトラクションを行います。PCR-Selectでは、転写産物の存在率の補正とサブトラクションを同時に行うため、最終増幅産物中に稀少転写産物が多く濃縮されます。

### 50 ngの total RNAでサブトラクション可能

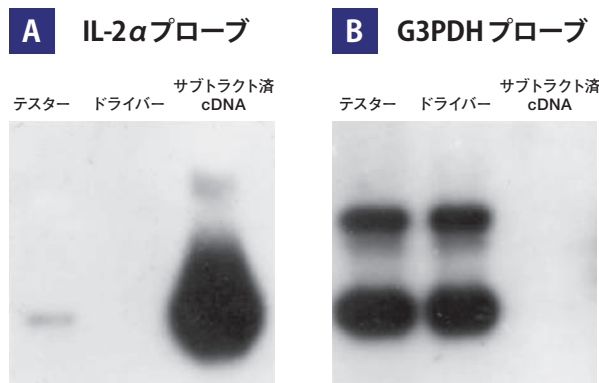
微量サンプルからの高品質cDNA合成を可能とする、SMART PCR cDNA Synthesis Kitを組合わせて用いることで、わずか50 ngの total RNAからサブトラクション実験を行うことができます。取得が困難なRNA試料を用いる場合には特に有用です<sup>4)</sup>。

### 全過程がわずか3~4日で完了

従来の一本鎖と二本鎖のDNAをカラムを用いて分離する方法とは異なり、煩雑な操作や多量のRNAを必要としません。発現差のある遺伝子を濃縮するために、計2回のサブトラクティブハイブリダイゼーションを行うだけなので、実験に必要な時間はわずか3~4日です。



PCR-Select Subtraction Kitの概要



### PHA/PMA処理ヒトJurkat T細胞中の活性化遺伝子の濃縮

サザンブロット解析によって、サブトラクティブcDNA中において大量のハウスキーピング遺伝子が低下していることが示されました。PHA 2 µg/ml および PMA 2 ng/ml と共にヒト Jurkat T 細胞性白血病細胞を72時間培養し、テスター cDNAを調製しました。ドライバ cDNAは未処理の同細胞から調製しました。増幅したテスターおよびドライバ、サブプレッションPCRで増幅したサブトラクティブcDNAを1.5%アガロースゲル(0.3 µg/レーン)で電気泳動しました。泳動後ナイロンメンブレンに転写し、既知の活性化マーカーであるIL-2αプローブ(A)、またはハウスキーピング遺伝子であるG3PDHプローブ(B)でハイブリダイズを行いました。

#### 【参考文献】

- 1) Diatchenko, L., et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93. 6025-6030.
- 2) Gurskaya, N. G., et al. (1996) *Anal. Biochem.* 240. 90-97.
- 3) PCR-Select cDNA Subtraction Kit (October 1995) *Clontechiques X* (4). 2-5.
- 4) Chan, J., et al. (1997) *Clontechiques XII* (1). 25-26.

#### Notice to Purchaser

#### For Clontech™ PCR Select™ cDNA Subtraction

Clontech™ PCR-Select™ cDNA Subtraction products are covered by U.S. Patent Nos. 5,565,340 and 5,759,822, as well as pending foreign patent applications. For-profit and not-for-profit purchasers of PCR-Select products are entitled to use the reagents for research, including identification of molecular markers or differentially expressed genes; however, the following uses expressly are prohibited: (1) performing services for third parties; (2) identifying nucleic acid sequences to be included on nucleic acid arrays, blots or in libraries or other cDNA collections which are then sold to third parties; or (3) constructing databases which are then sold to third parties. Further, reproduction, amplification, modification, reformulation or resale of the reagents provided in the PCR-Select products is not permitted. For information on licensing PCR-Select for these purposes, please contact: Product Manager, PCR Applications, Clontech Laboratories, Inc., 1290 Terra Bella Ave., Mountain View, CA, 94043 or call 800.622.2566 or e-mail licensing@clontech.com.

#### For PCR Products

##### 1. Notice to purchaser: limited license

Use of this product is covered by one or more of the following US patents and corresponding patent claims outside the US: 5,079,352 and 6,127,155. The purchase of this product includes a limited, non-transferable immunity from suit under the foregoing patent claims for using only this amount of product for the purchaser's own internal research. No right under any other patent claim (such as method claims in U.S. Patent Nos. 5,210,015, 5,487,972, 5,994,056 and 6,171,785) and no right to perform commercial services of any kind, including without limitation reporting the results purchaser's activities for a fee or other commercial consideration, is hereby conveyed by the purchase of this product expressly, by implication, or by estoppel. This product is for research use only. Diagnostic uses require a separate license from Roche. Further information on purchasing licenses may be obtained by contacting the Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA.

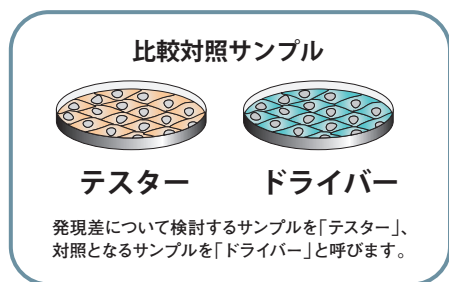
##### 2. Disclaimer of rights

No license is conveyed with the purchase of this product under U.S. Patent Nos. 5,210,015, 5,487,972, 5,804,375, 5,994,056 and 6,171,785, and corresponding patent claims outside the U.S., relating to the 5' nuclease and dsDNA binding dye processes. Further information on purchasing licenses may be obtained by contacting the Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA.

#### For SMART™ Products

SMART™ Technology is covered by U.S. Patent Nos. 5,962,271 and 5,962,272. For-profit and Not-For-Profit purchasers of SMART™ Products are entitled to use the reagents for internal research. However, the following uses are expressly prohibited: (1) performing services for third parties; (2) identifying nucleic acid sequences to be included on nucleic acid arrays, blots, or in libraries or other cDNA collections which are then sold to third parties. Reproduction, modification, reformulation, or resale of the reagents provided in SMART™ Products is not permitted. For information on licensing SMART™ Technology for commercial purposes, please contact a licensing representative by phone at 650.919.7320 or by e-mail at licensing@clontech.com.

# 新規遺伝子の獲得！ 発現差のある遺伝子の単離！ サブトラクション・クローニングには **Clontech PCR-**



## ① cDNA 合成

少量の total RNA から高品質 cDNA を合成  
**SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit**

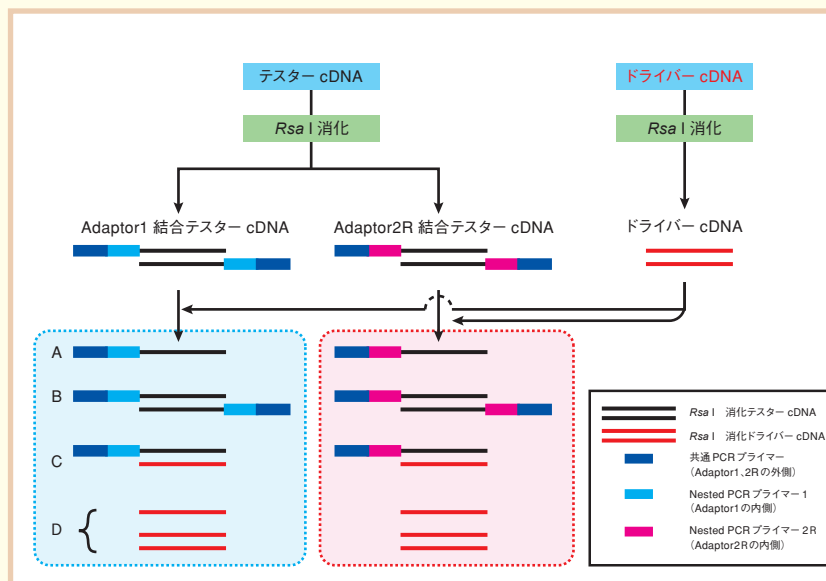
- ng の total RNA から cDNA を合成
- 1本のチューブで反応
- 高効率に完全長 cDNA を取得

SMART cDNA 合成技術は、逆転写酵素 (RT) に本来備わっているターミナルトランスフェラーゼ活性を利用した完全長 cDNA を優先的に濃縮する独自のワンチューブプロトコルです。

## ② 発現差のある遺伝子の濃縮

PCR サブトラクションキット  
**Clontech PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit**  
製品コード 637401

- 1. 制限酵素処理**  
従来法または、SMART法を用いて調製したテスター cDNA およびドライバー cDNA を 4 塩基切断を行なう制限酵素 (*Rsa*I) を用いて、それぞれ個別に平滑末端を持つ短い断片に消化します。
- 2. アダプターのライゲーション**  
テスター cDNA は 2 つのチューブに分けて、それぞれに別の二本鎖 DNA アダプター (Adaptor1, Adaptor2R) をライゲーションします。一方、ドライバー cDNA はアダプターを結合させません。
- 3. 1st ハイブリダイゼーション**  
両方のテスター cDNA に過剰量のドライバー cDNA を加えて、ハイブリダイゼーションを行います。加熱変性してアニールさせると、溶液中には、A, B, C, D の 4 種類の分子種が形成されます。ドライバー cDNA と発現量に差がない配列をもつテスター cDNA は早い段階でハイブリダイズして平衡状態に達します (B, C)。一方、テスター cDNA の方が発現量が多く、差がある cDNA は、ハイブリダイズされず一本鎖のまま存在します (A)。この分子種 A が、発現差のある目的の遺伝子になります。



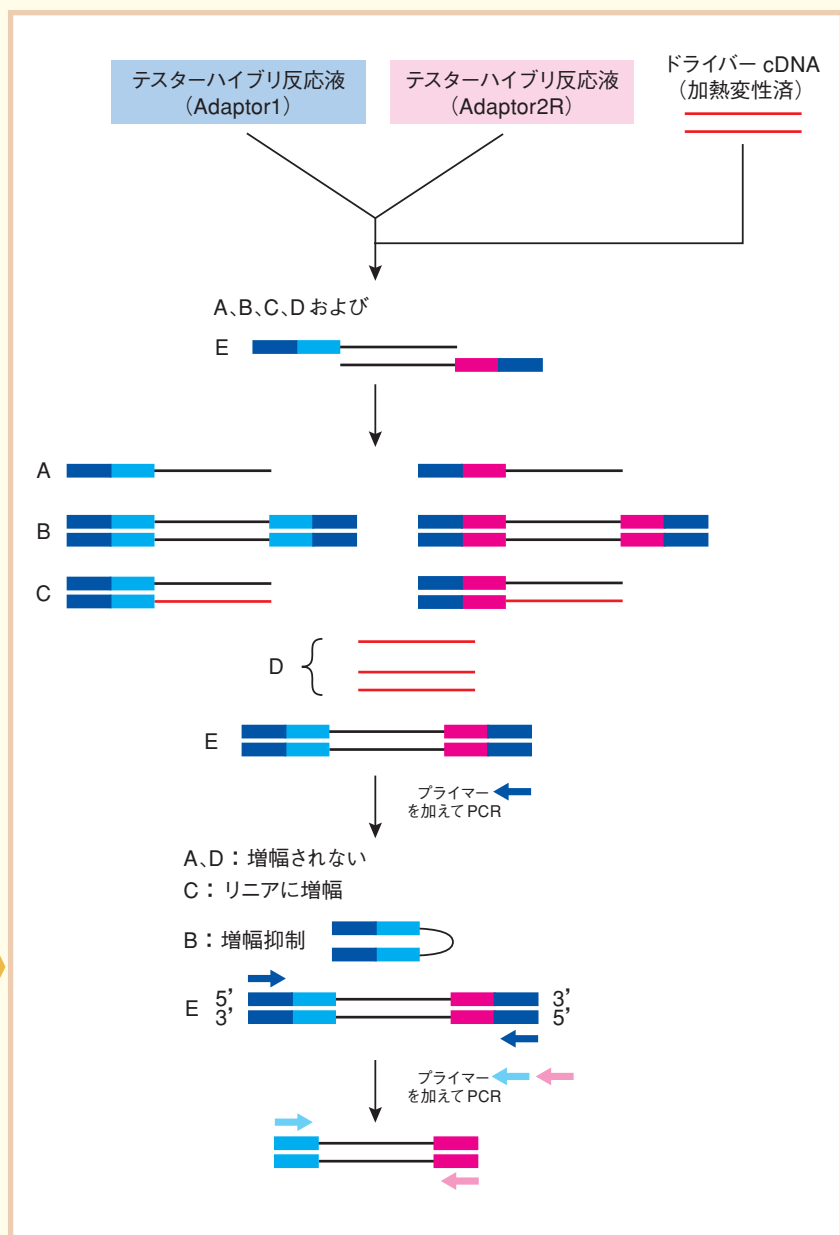
## PCR-Select Subtraction Q&A

**Q1 出発材料としてはどれくらいの量の RNA が必要か?**  
**A1** poly A<sup>+</sup> RNA を用いる場合、500 ng~2 μg の量が必要です。サンプルの量に制限がある場合は SMART 法 (SMART PCR cDNA Synthesis Kit, 製品コード 634902) により cDNA 合成を行う方法が効果的で、わずか 50 ng の total RNA から実験を開始できます。

**Q2 PCR-Select は total RNA でも使えるか?**  
**A2** total RNA は、リボソーム RNA 由来の不要な cDNA が生成されてしまうため、PCR-Select でのサブトラクションには適していません。ただし、SMART PCR cDNA Synthesis Kit を用いれば、少量の total RNA を出発材料として使用することが可能です。

**Q3 比較する 2 つのサンプル間でどれくらいの遺伝子の発現差があればサブトラクトされるのか？ また、サブトラクションを行うためには、目的の遺伝子が比較したい細胞内でどの程度発現している必要があるのか？**  
**A3** 従来法によるサブトラクションキットでは、細胞内に多量に存在する転写産物しかサブトラクトされないという欠点がありました。本キットでは PCR 法に基づくサブトラクションを行うので発現量の少ない希少な転写産物でも、サンプル間で 5 倍以上の発現差があれば効率よく濃縮することができます。

# Select™ をおすすめします!



## 4. 2nd ハイブリダイゼーション

1回目のハイブリ反応溶液を混合して、別に加熱変性したドライバー cDNA を加え、2回目のハイブリダイゼーションを行います。その結果、各テスター試料中の一本鎖 cDNA (A) は相互に結合して、異なる末端 (Adaptor1, Adaptor2R) を持つ新たな分子種 (E) を形成します。

## 5. Fill in the end

一本鎖のまま残っているアダプターの相補鎖を合成し、PCR プライマーの結合サイトを形成します。

## 6. 1st PCR

Adaptor1, Adaptor2R の共通のプライマーを用いて PCR を行います。  
分子種 A, D にはプライマーのアニーリング部位がないため増幅されません。  
分子種 C には片鎖のみアニーリング部位があるため、直線的 (リニア) に増幅されます。  
分子種 B は、一本鎖の両端で結合したフライパン構造を形成し増幅が抑制されます (サプレッション PCR\*)。  
発現差がある塩基配列 (E) のみ、指数関数的に PCR 増幅されます。

## 7. 2nd PCR (Nested)

1st PCR で用いた共通プライマーの内側の配列を用いて、Nested PCR を行います。これにより、バックグラウンドを低下させ、発現差のある cDNA をさらに増幅します。

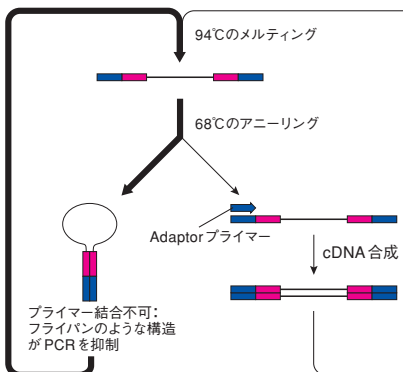
### Q4 PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit をもちいて哺乳類ゲノム DNA のサブトラクションを行うことはできるか?

A4 本製品は cDNA のサブトラクションを効果的に行うよう最適化しており、偽遺伝子や反復配列が多く存在し複雑度が高い哺乳類や高等生物のゲノム DNA のサブトラクションには適していません。簡単なゲノム構造を持つ細菌ゲノムのサブトラクションには PCR-Select Bacterial Genome Subtraction Kit (製品コード 637404) をご用意しています。

### Q5 サブトラクトされた cDNA (PCR 反応後の DNA 産物として得られる) はどのように確認するのか?

A5 サブトラクティブハイブリダイゼーション後に行う PCR 反応産物には、たくさんの cDNA が混合物として含まれています。PCR 産物を直接ベクターにクローニングしたり、アレイを作製してスクリーニングを行ったり、あるいはノザンプロット等で確認します。偽陽性として得られるクローンは PCR-Select Differential Screening Kit (製品コード 637403) を用いると効率的にスクリーニングし排除することができます。

### \* 補足…サプレッション PCR



PCR-Select cDNA アダプターは、サプレッション PCR と呼ばれる方法によって、望ましくない増幅反応が PCR 中に起こらないよう設計されています。  
一本鎖 cDNA の両方の末端に相補的塩基配列が存在する場合、短いプライマーとのアニーリングを行うよりも、プライマーとのアニーリングを妨げるフライパンのような二次構造を形成しやすくなります。従って、PCR では非特異的な増幅が効果的に抑制され、異なったアダプターを両端に持つ cDNA 分子が通常通り特異的に増幅されます。

### ③ 発現差のある遺伝子の絞り込み

#### ディファレンシャルスクリーニングキット

## Clontech PCR-Select™ Differential Screening Kit

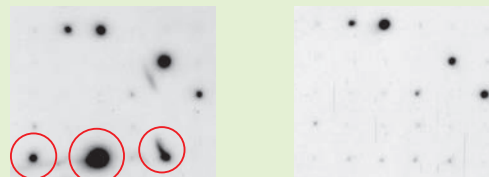
製品コード 637403

サブトラクション済みライブラリー中で、真に発現差のあるcDNAの検出を行います。Clontech PCR-Select™ cDNA Subtraction Kitで発現量に差のある遺伝子をプールした後に本キットを用いれば、その発現差を簡単に確認することが可能です。

PCR-Select Differential Screening Kitではサブトラクション済みライブラリーに対して、テスターおよびドライバー RNA から直接合成したプローブ、フォワードサブトラクション済みcDNAから作製したプローブ、およびリバースサブトラクション済みcDNA(テスターとドライバーを入れ替えてサブトラクションを行ったもの)から作製したプローブを用いてハイブリダイズを行います。発現差のあるクローンはドライバーとはハイブリダイズせずにテスターのみとハイブリダイズしますが、サブトラクション前のプローブでは感度が不足するために、本来の情報を検出できません。一方、サブトラクション済みプローブには発現差のあるcDNAが高度に濃縮されていますが、結果が偽陽性を示すことがあります。本法ではサブトラクション前後の両プローブを使用することで、差次的発現遺伝子の同定を最高の効率で行うことができます。

#### サブトラクション済みcDNAプローブ

フォワードサブトラクション済みプローブ リバースサブトラクション済みプローブ



#### 非サブトラクションcDNAプローブ

テスタープローブ ドライバープローブ



Clontech PCR-Select Differential Screening kitによる稀少な発現差のあるcDNAの検出例

~~SMART PCR cDNA Synthesis Kit (製品コード 634902)~~を用いて、γグロビン産生細胞株およびβグロビン産生細胞株からtotal RNAの予備増幅を行いました。γ株由来cDNAをテスター、β株由来cDNAをドライバーに用いて、PCR-Select cDNAサブトラクションを行いました。リバースサブトラクションは、テスターとドライバーを入れ替えて行いました。続いてサブトラクション済みcDNAをクローン化し、無作為に選んだクローンを各ナイロンメンブレンの同一位置にプロットしました。メンブレンは図中に示したプローブを用いてハイブリダイズしました。

○: 真に発現差のあるcDNA

### ④ 遺伝子配列の取得

#### 96ウェルプレート単位での お得な大規模塩基配列解析 プレート単位塩基配列解析

タカラバイオでは、大規模シーケンス設備と、膨大なデータをリアルタイムで処理するためのスーパー・コンピューター環境を備えており、迅速で高品質の大規模塩基配列解析受託サービスをご提供いたします。

#### ■ 納品物

波形ファイル(SCF, AB1形式)  
塩基配列解析テキストデータ(FASTA MULTI\_FASTA, TRIM\_FASTA形式)  
Quality情報ファイル(解析塩基数・精度情報を示したCSVファイル)  
オプションデータ

#### ■ 価格・納期

サービス項目	価格(税別)	標準納期
大規模塩基配列解析	¥76,800(96ウェルプレート1枚あたり)	1週間~
<グリセロールストック作製>	¥100(1クローンあたり)	
<相同性検索 BLAST>	無償	

\*10プレート(96ウェル)以上の解析の場合の価格・納期についてはお問い合わせください。

## To the Next Stage

#### ■ 完全長の遺伝子の取得

>>

#### ■ 遺伝子発現系の構築

>> Living Colors® Fluorescent Proteins  
>> Adeno-X™ Expression System

#### ■ タンパク質相互作用解析

>> Matchmaker™ Systems  
>> Protein-DNA Binding Assay

#### ■ PCRクローニング

>>

#### ■ 発現制御による遺伝子解析

>> Tet-On® / Tet-Off® Advanced Inducible Gene Expression System  
>> Knockout Single Vector Inducible RNAi System

#### ■ タンパク質精製

>>

製品一覧

製品名	概要	容量	製品コード	価格(税別)	
<b>●PCR-Select Subtraction Kit 製品</b>					
Clontech PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit	発現差のある遺伝子を選択的に増幅するサブトラクションキット	7回	637401	¥191,000	ラ
Clontech PCR-Select™ Bacterial Genome Subtraction Kit	細菌ゲノム配列用のサブトラクションキット	7回	637404	¥191,000	ラ
Clontech PCR-Select™ Differential Screening Kit	サブトラクション済みライブラリーからの発現差遺伝子検出キット	1 Set	637403	¥77,000	
Clontech PCR-Select™ Differential Screening Blocking Solution	Screening Kitに含まれるBlocking Solution	1 ml	637402	¥30,000	
<b>●完全長 cDNA の取得、cDNA ライブラリー作製キット</b>					
SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit	少量の total RNA や poly A <sup>+</sup> RNA からの高品質 cDNA 合成キット。PCR-Select の前段階に使用可能	7回	634902	¥177,000	
Super SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit	わずか 2 ng の total RNA からの高品質の cDNA 合成キット。PCR-Select の前段階に使用可能	7回	635000	¥190,000	

ラ ご購入に際してライセンス確認書が必要となります。

受託サービス

時間と手間のかかる作業を熟練した技術者が皆さまに代わって行います。

PCR-Select サブトラクション受託サービス

発現量の低い遺伝子も効率よく濃縮

Level I と Level II の2つのサービスをご用意

ご要望に対応した多種類のオプションサービス

納期は16~19週間 (Level I の場合)

PCR-Select Subtraction により、テスターとドライバーの2つのサンプル間で発現量の異なる遺伝子を入力する受託サービスです。以下の2つの異なるレベルのサービスからお選びいただけます。サンプル量が少ない場合には、Custom SMART cDNA Synthesis Service もご利用しております。なお、RNA 抽出は追加料金で承ります。

●受託サービス一覧 (税別)

サービス名	内容	価格	納期 <sup>※1</sup>
Clontech PCR-Select Subtraction Custom Service Level I	サブトラクションされたクローンのうち、96ウェルプレート2枚分について Differential Screening、候補クローンのシーケンス、BLAST サーチを行います。	お問い合わせ下さい	16~19週間
Clontech PCR-Select Subtraction Custom Service Level II	サブトラクションされたクローンのうち、96ウェルプレート6枚分について Differential Screening、候補クローンのシーケンス、BLAST サーチを行います。		19~22週間

※1 米国 Clontech へのサンプル輸送期間を含みます。  
 ※2 サンプルが組織の場合、米国検査機関の許可が必要となるため、さらに4~8週間お時間がかかります。サンプルは、RNA の状態でご用意いただくことをお勧め致します。また、サンプルの由来によりましては RNA の状態でも米国への持込が困難な場合があります。

【お届けする結果】

Level I サービスの場合

- ①両方向のサブトラクトされたライブラリーから作製した大腸菌グリセロールストック状態のクローン。(96ウェルプレート10枚分)
- ②各ライブラリーのうちフォワード1枚、リバース1枚の Differential Screening の結果データ。
- ③ Differential Screening の結果、2倍以上の発現差があると思われる候補クローンに関して行ったワンバシークエンスと BLAST サーチのデータ。
- ④ Differential Screening の結果、2倍以上の発現差があると思われる候補クローンの大腸菌グリセロールストックと精製済プラスミド。
- ⑤各ライブラリーの中で発現差のあると思われる候補クローンの割合の概算。
- ⑥バーチャルノーザンプロットのデータ。

Level II サービスの場合

Level I サービスの内容に加えて、サブトラクションライブラリーから作製されたフォワード方向の96ウェルプレート5枚すべての Differential Screening の結果データと Differential Screening を実施した全てのプレート(フォワード5枚、リバース1枚)に関して、2倍以上の発現差があると思われる候補クローンのシングルバシークエンスと BLAST サーチの結果が追加されます。

●オプションサービス (税別)

サービス名	内容	価格	納期 <sup>※1</sup>
Custom SMART cDNA Synthesis Amplifications	微量 total RNA からサブトラクションサービスを可能とするオプションです。	お問い合わせ下さい	+1週間
Mirror Orientation Selection Service	発現差が少ないサンプル間の比較の場合、バックグラウンドを下げる事が可能なオプションです。		+1週間
total RNA Isolation from Cells or Tissue	組織、細胞からの total RNA 抽出オプションです。		+1週間
poly A <sup>+</sup> RNA Purification from Cells or Tissue	組織、細胞からの poly A <sup>+</sup> RNA 抽出オプションです。		+2週間
poly A <sup>+</sup> RNA Purification from total RNA	total RNA から poly A <sup>+</sup> RNA を精製します。		+1週間

・本パンフレットで紹介した製品はすべて研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。  
 ・タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変・商用製品の製造に使用することは禁止されています。  
 ・本パンフレット記載の価格は2007年12月1日現在の希望小売価格です。価格に消費税は含まれておりません。  
 ・本パンフレットの内容の一部または全部を無断で転載あるいは複製することはご遠慮ください。  
 ・本パンフレットに記載されている商品名等は、特に記載はなくても各社の商標、または登録商標です。

販売元

タカラバイオ株式会社



製品ご購入に関するお問合せは

東日本販売課 TEL 03-3271-8553 FAX 03-3271-7282  
 西日本販売課 TEL 077-543-7297 FAX 077-543-7293

受託サービスに関するお問合せは

TEL 077-543-7331 FAX 077-543-7225

製品の技術的なご質問は

TaKaRa テクニカルサポートライン

TEL 077-543-6116 FAX 077-543-1977

タカラバイオホームページ <http://www.takara-bio.co.jp/>

クロンテックホームページ <http://clontech.takara-bio.co.jp/>

取扱店