

LiCl/Urea 法により抽出された total RNA を使った cDNA ライブラリーの作成

豊田 直二（熊本学園大学社会福祉学部）

Preparation of cDNA library with total RNA extracted by the LiCl/Urea method

Naoji Toyota

はじめに

一般に細胞の核内の DNA をゲノム DNA といい、細胞の設計図の暗号が記録されている。その暗号は転写酵素によって mRNA に転写され、転写された暗号はリボソーム上で翻訳され、蛋白質が合成される。しかし mRNA は非常に分解されやすく、取り扱いが難しい。そこで mRNA を鋳型として逆転写酵素を使って DNA に置き換えた物を complimentary DNA (cDNA 相補的 DNA) と言う。cDNA は二重らせん構造で、RNA より丈夫であり取り扱いも容易になる。mRNA の塩基配列も写し取られているので分子生物学などの広い学問分野で一般的に使われている。

上記のように RNA を直接扱うのはとても難しい。その理由は RNA を分解する酵素 (RNase) が身の回りに存在しているからだ。RNase は 100℃ で煮沸したぐらいではビクともしない。RNA の実験前には RNase を取り除く作業が必要になる。RNase はガラス器具、実験台、蒸留水、ヒトの指、汗、唾液などいたる所に存在している。ガラス器具、ピンセット、ハサミ等を 180℃ で 3 時間焼き、蒸留水もジエチルピロカーボネートによる処理を行う。実際の作業中にはディスポーザブル手袋を付けて行う。咳、くしゃみが出るヒトはマスクを着用する。とても気の抜けない作業となる。しかし mRNA を cDNA に置き換えた後はそのような煩わしい操作は不要になる。たとえ DNA 分解酵素 (DNase) があったとしても煮沸すれば取り除くことができる。

ライブラリーは辞書を引くと図書館と出てくる。しかし元々は情報をたくさん集積している物、所という意味だ⁽¹⁾。cDNA ライブラリーは mRNA と蛋白質の情報をたくさん集積しているものということになる。このライブラリーから特定の cDNA を選別 (スクリーニング) することができる。スクリーニングの手法は様々あり、すでに遺伝子組み換え技術では確立した方法となっている。

今回作成した cDNA ライブラリーも上記の RNase 除去操作を行ったが、RNA の抽出には通常と異なる方法を使用した。通常はグアニジン-超遠心法といい、その行程も煩雑で高額な超遠心機とローターを必要とする。現在ではもっと容易に抽出できるキットも多くの

メーカーから販売されている。しかしこれらの方法の欠点はRNAが組織の繊維に引っかかり、収率に差がでることだ。特にニワトリの広背筋では通常の方法でRNAを採取するのは難しい。また小さなニワトリ胚の心臓から効率よくRNAを取り出すにはより良い方法がもとめられた。

そこで塩化リチウム / 尿素 (LiCl/Urea) 法⁽²⁾を使ったところニワトリの広背筋からも胚の心臓からも効率よくRNAを取ることができた。この方法を使ってcDNAライブラリーも作成することができた。

材料と方法

LiCl/Urea 法

孵卵 8-12 日のニワトリ胚の心臓を約 10 コ取り出す。

5-10 倍量の 3M LiCl、6M Urea 溶液にいれ、ホモジナイズする⁽²⁾。

核を取り除くため 6,000 回転 / 分 (rpm) 15 分回転する。核は遠心管の底に沈殿するので取り除き、上澄みを採取する。

RNA は LiCl に結合し、DNA や蛋白質には結合しない。上澄みを 4℃ でオーバーナイト (約 16 時間) 保存し、RNA と LiCl に結合させた。RNase 阻害剤 (inhibitor、タカラバイオ株) を加えた。原著では LiCl/Urea 溶液中では RNase は働かないと書かれているが、RNase inhibitor を 5-10 μ l 加えた方が良い結果を得ている。

約 16 時間後、16,000 rpm、20 分、4℃ で遠心した。遠心管の底に白い沈殿がべっとり付いている。

300 μ l の 10 mM Tris、1m M EDTA (TE)、pH8.0、65℃、5 μ l RNase inhibitor で沈殿を溶かす。

300 μ l のフェノール / クロロフォルムを加え、攪拌する。

12,000 rpm、5 分、4℃ で遠心し、上澄みをとる。

30 μ l の 3 M 酢酸ナトリウムに溶かし、750 μ L のエタノールを加え、ドライアイス上で 10-30 分冷却する。

13,000 rpm、15 分、4℃ で遠心する。

沈殿を 50-100 μ l の TE と RNase inhibitor に溶かし、濃度を測定する。

0.5 ml の吸光度用キュベット (セル) に 2 μ l の上記サンプルをいれ、

吸光度計で 260 nm と 280nm の吸光度 (OD) を測る。

$OD_{260} \times 40 \times 1/2$ (2 μ l sampl) $\times 1/2$ (0.5 ml セル) = RNA μ g/ μ l

OD_{260} / OD_{280} の比が 2-1.5 程度のなる。RNA の純度は良い。

3-5 μ l 程度電気泳動を行い、RNA が分解していないかを調べる。

グアニジン-超遠心法

遠心チューブの底に 5.7M の塩化セシウム (CsCl) を入れる。

心筋を 6 M のグアニジン チオサイアネート、10mM のクエン酸ナトリウムで中ホモジナイズし、十分に攪拌する。

攪拌した溶液を 5.7M の CsCl 上に重層する。

スイングローターで2万7千回転、17時間、20℃で超遠心する。

グアニジン液は取り除き、CsCl 溶液のレベルで遠心チューブをカットする。

RNA は見えないが1-2ml の RNase free の水で溶かす。

この方法は多くのマニュアル本に掲載され、多くの組織から RNA を得ることができる。

Q 社 RNA 抽出キットによる方法はメーカーのマニュアル通りなので省略する。

結果

LiCl/Urea 法、グアニジン-超遠心法および RNA 抽出キットで得られた total RNA を表 1 に示した。臓器 1g に換算してどの程度の total RNA が抽出されるかを比較すると LiCl/Urea 法は 576.1、グアニジンチオサイアネート法は 181.2 および RNA 抽出キットは 374 となった (表 1. 12, 21, 27)。LiCl/Urea 法が最も高効率なことが分かった。3つの方法はどれも特徴があり、LiCl/Urea 法は 0.016-1.2g の少ない臓器から多くの RNA を取るのに適している。Adult 前広背筋と後広背筋もこの方法で RNA を得ることができた (表 1. 10,11)。

グアニジン-超遠心法は 0.4-5g の比較的多い臓器を処理して RNA を得ることが出来る (表 1. 13-20)。出発重量は 1g 程度が最も効率の良いことを示している。しかし欲張って 5 g を処理するとたくさん取れるが、効率はあまりよくない (表 1. 14)。Adult 前広背筋と後広背筋は処理しても RNA が全く取れない時もあった (表 1. 17,18)。

LiCl/Urea 法

	muscle	weight (g)	total RNA (μg)	効率 (total RNA/重量)
1.	8 day cardiac muscle	0.92	99	10760
2.	8 day cardiac muscle	0.8	91	1134
3.	8 day cardiac muscle	0.3	576	1920
4.	8 day cardiac muscle	0.14	235	1679
5.	8 day cardiac muscle	0.13	185	1423
6.	8 day cardiac muscle	0.12	114	950
7.	8 day cardiac muscle	0.02	115	575
8.	8 day cardiac muscle	0.016	45	2813
9.	12 day cardiac muscle	0.32	1,352	4225
10.	Adult 前広背筋	1.2	10	8
11.	Adult 後広背筋	1.1	30	27
12.	平均	1.0	576.1	576.1

グアニジン-超遠心法

	muscle	weight (g)	total RNA (μg)	効率 (total RNA/重量)
13.	8 day cardiac muscle	0.4	130	325
14.	15 day cardiac muscle	5.0	1918	384
15.	Adult breast	4.0	880	220
16.	Adult breast	1.0	1500	1500
17.	Adult 前広背筋	1.0	0	0
18.	Adult 後広背筋	1.0	0	0
19.	Adult 前広背筋	1.1	56	51
20.	Adult 後広背筋	0.6	46	77
21.	平均	1	181.2	181.2

Q 社 RNA 抽出キット

	muscle	weight (g)	total RNA (μ g)	効率 (total RNA/重量)
22.	8 day cardiac muscle	0.24	50	208
23.	8 day cardiac muscle	0.24	90	375
23.	8 day cardiac muscle	0.24	50	208
24.	8 day cardiac muscle	0.24	70	292
25.	8 day cardiac muscle	0.016	5	313
26.	11 day cardiac muscle	0.039	115	2949
27.	平均	1374	374	374

表1. 各 RNA 抽出法における total RNA 収量および効率の比較

total RNA の収量効率は LiCl 法、グアニジン-超遠心法、RNA 抽出キットの順だった。

LiCl/Urea 法とグアニジン-超遠心法には出発重量と RNA 収量に緩い関係があった。
出発重量が多ければ RNA 収量も多い傾向にあった。

RNA 抽出キットでは同じ出発重量から安定した RNA 収量があった (表1. 21-24)。しかし LiCl/Urea 法に比べて出発重量はそれほど違わないのに得られた total RNA は少なかった (表1. 1-9, 22-24)。

LiCl/Urea 法が少量 0.016-1.2 g の筋から 10-1,352 μ g の total RNA が抽出され、効率も最高だった (表1. 1-12, 22-24)。グアニジン-超遠心法も RNase inhibitor を加えるなど工夫すれば、もっと安定すると思われた。RNA 抽出キットは筋には向いていないのかもしれない。線維の多い組織用の RNA 抽出キットも有り、使ってみたが収量はあまり変わらなかった。

図2はニワトリ胚の心臓の RNA の電気泳動像を示している。

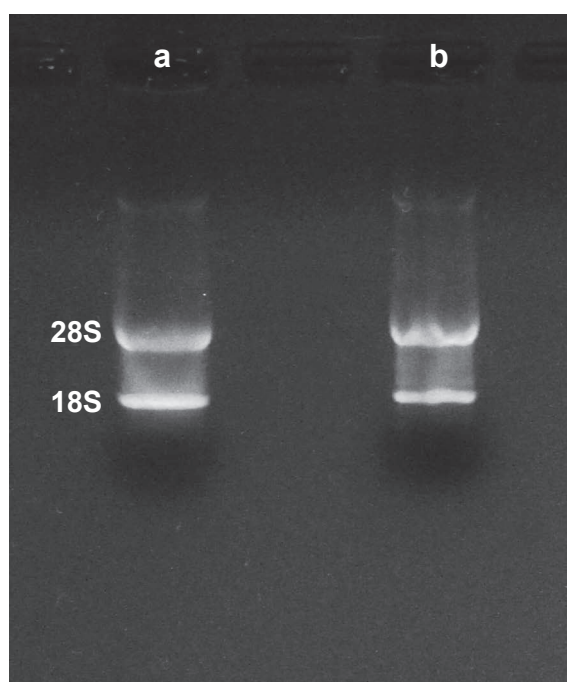


図2. 8日胚の心臓を LiCl/Urea 法で抽出した電気泳動像 a と b 各ラインに 0.8 μ g の RNA を添加し泳動した。1.5%のアガロースゲル、mops 泳動液を使用した。

28S と 18S のリボソーム RNA が確認できる。抽出時の各ステップで RNase inhibitor を加えているが、28S と 18S の間にやや濁った部分があり、若干 RNA の分解が疑われる。しかし 28S と 18S の状態から RNA は良好であり、mRNA も長いものが得られていると思われる。もし RNA が分解されていたら 28S と 18S のバンドが不鮮明になる。或いは多くのバンドが現れる場合もある。この RNA を使ってライブラリーの作成することにした。ライブラリーの作成は専門業者に委託した⁽³⁾。約 2 ヶ月後 cDNA ライブラリーが送られてきた。ライブラリーと言っても、0.5ml のサンプルチューブに入ってしまうほど小さい。費用は約 40 万円だった。この中にどのような蛋白質の cDNA が含まれているか、96 種類について塩基配列を決定し、送られてきた。心筋蛋白質の cDNA が含まれており、確かに心筋のライブラリーであることが分かった (表 2)。

このライブラリーから筋蛋白質、例えばアクチンとトロポニンの cDNA を取り出すには PCR 法が考えられる。

表 2 から

C08 myosin light chain 1 (ミオシン軽鎖)、

D07 troponin I, slow skeletal muscle (遅筋トロポニン I)、

E12 actin, gamma 2, smooth muscle (遅筋アクチン)、

H04 troponin C type 1 (slow) (遅筋トロポニン I)、

H12 troponin C type 1 (slow) (遅筋トロポニン I)、

など筋蛋白質が 5 - 4 種類が確認できた。これらの塩基配列は比較的短く、5' 側の非コーディング領域まで cDNA が延びていて、完全長の cDNA であることが分かった。

clone ID	Database Accession	Definition	E-value	insert	insert size (kb)	sequence	blast result	Comment
A01	ref NP_001289116.1	sarcopin [Gallus gallus]	2.00E-10	FL	0.9	CH8E-1.A01	A01	
A02	ref NP_001026376.1	protein angel homolog 1 precursor [Gallus gallus]	2.00E-107	TC	3.5	CH8E-1.A02	A02	
A03	ref XP_001004376.1	hemoglobin subunit alpha-A [Gallus gallus]	4.00E-97	FL	0.7	CH8E-1.A03	A03	
A04	ref XP_015139960.1	PREDICTED: triadin isoform X4 [Gallus gallus]	1.00E-12	FL?	5.0	CH8E-1.A04	A04	
A05	ref NP_001269232.1	cysteine-rich protein 1 (intestinal) [Gallus gallus]	7.00E-48	FL	0.8	CH8E-1.A05	A05	
A06	ref XP_003641817.1	PREDICTED: heat shock protein beta-7-like [Gallus gallus]	1.00E-113	FL?	0.8	CH8E-1.A06	A06	
A07	ref NP_001264941.1	60S ribosomal protein L38 [Gallus gallus]	3.00E-39	FL	0.4	CH8E-1.A07	A07	
A08	ref XP_015134258.1	PREDICTED: transcription factor 12 isoform X8 [Gallus gallus]	4.00E-122	FL?	4.5	CH8E-1.A08	A08	
A09	ref NP_990213.1	vitamin D-binding protein precursor [Gallus gallus]	1.00E-124	FL	1.9	CH8E-1.A09	A09	
A10	ref NP_001026209.1	protein LBH [Gallus gallus]	3.00E-60	FL	3.0	CH8E-1.A10	A10	
A11	ref NP_001074183.1	CD69 antigen (p60, early T-cell activation antigen) [Gallus gallus]	4.00E-60	FL	3.0	CH8E-1.A11	A11	
A12	ref NP_001005825.1	von Willebrand factor A domain-containing protein 9 [Gallus gallus]	2.00E-121	FL	8.4	CH8E-1.A12	A12	
B01	ref XP_015150167.1	PREDICTED: dnaJ homolog subfamily A member 3, mitochondrial [Gallus gallus]	3.00E-123	TC	2.5	CH8E-1.B01	B01	
B02	ref XM_015288507.1	PREDICTED: Gallus gallus sorbin and SH3 domain containing 1 (SORB1) [Gallus gallus]	0	FL?	6.0	CH8E-1.B02	B02	BLASTN
B03	ref NP_001007830.1	snRNA-activating protein complex subunit 5 [Gallus gallus]	2.00E-46	TC	2.4	CH8E-1.B03	B03	
B04	ref NP_001159798.1	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A [Gallus gallus]	4.00E-117	FL	0.9	CH8E-1.B04	B04	
B05	ref NP_001153187.1	ER lumen protein-retaining receptor 2 [Gallus gallus]	1.00E-115	FL	1.2	CH8E-1.B05	B05	
B06	ref NP_989741.1	SPARC precursor [Gallus gallus]	4.00E-61	FL	1.8	CH8E-1.B06	B06	
B07	ref XP_415850.1	tax1-binding protein 3 [Gallus gallus]	1.00E-83	FL?	2.1	CH8E-1.B07	B07	
B08	ref XP_010723170.1	PREDICTED: A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type 1 motifs 1 [Gallus gallus]	1.00E-81	TC	2.3	CH8E-1.B08	B08	
B09	ref NP_989472.1	60S ribosomal protein L22 [Gallus gallus]	6.00E-87	FL	0.6	CH8E-1.B09	B09	
B10	ref NM_204272.1	Gallus gallus ribosomal protein L39 (RPL39), mRNA	0	FL	0.7	CH8E-1.B10	B10	BLASTN
B11	ref XP_416113.1	PREDICTED: 40S ribosomal protein S16 [Gallus gallus]	4.00E-73	FL?	0.7	CH8E-1.B11	B11	
B12	ref NP_001004379.1	60S ribosomal protein L7a [Gallus gallus]	3.00E-135	FL	1.2	CH8E-1.B12	B12	
C01	ref NP_989472.1	60S ribosomal protein L22 [Gallus gallus]	5.00E-87	FL		CH8E-1.C01	C01	
C02	ref NP_990729.1	translationally-controlled tumor protein homolog [Gallus gallus]	2.00E-123	FL		CH8E-1.C02	C02	
C03	N/A					CH8E-1.C03	C03	
C04	ref NP_001004375.1	hemoglobin subunit alpha-D [Gallus gallus]	2.00E-99	FL		CH8E-1.C04	C04	
C05	ref NP_990779.1	protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2 [Gallus gallus]	3.00E-138	TC		CH8E-1.C05	C05	
C06	ref NP_001007829.1	very-long-chain (3R)-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase [Gallus gallus]	1.00E-130	FL		CH8E-1.C06	C06	
C07	ref NP_001182483.1	serine/arginine-rich splicing factor 3 [Gallus gallus]	2.00E-106	FL		CH8E-1.C07	C07	
C08	ref NP_990490.1	myosin light chain 1, cardiac muscle [Gallus gallus]	6.00E-122	FL		CH8E-1.C08	C08	
C09	ref NP_001004375.1	hemoglobin subunit alpha-D [Gallus gallus]	2.00E-99	FL		CH8E-1.C09	C09	
C10	ref NP_001001858.1	stathmin [Gallus gallus]	8.00E-95	FL		CH8E-1.C10	C10	
C11	ref NP_001026562.2	ATP synthase subunit beta, mitochondrial precursor [Gallus gallus]	4.00E-36	FL		CH8E-1.C11	C11	
C12	ref NP_001292004.1	protein FAM195B [Gallus gallus]	2.00E-60	TC		CH8E-1.C12	C12	
D01	ref XP_001213175.1	PREDICTED: ATP synthase subunit epsilon, mitochondrial [Gallus gallus]	7.00E-25	FL?		CH8E-1.D01	D01	
D02	no hit			?		CH8E-1.D02	D02	
D03	ref XM_003642000.3	PREDICTED: Gallus gallus solute carrier family 41, member 3 (SLC41A3), mRNA	1.00E-147	FL?		CH8E-1.D03	D03	BLASTN
D04	ref NP_990653.1	60S acidic ribosomal protein P1 [Gallus gallus]	6.00E-71	FL		CH8E-1.D04	D04	
D05	ref NP_001026491.1	tripartite motif-containing protein 59 [Gallus gallus]	1.00E-124	FL		CH8E-1.D05	D05	
D06	ref NP_001078908.1	26S proteasome complex subunit DSS1 [Gallus gallus]	1.00E-39	FL		CH8E-1.D06	D06	
D07	ref XP_419242.3	PREDICTED: tropoin 1, slow skeletal muscle [Gallus gallus]	3.00E-124	FL?		CH8E-1.D07	D07	
D08	ref NM_205029.1	Gallus gallus microphthalmia-associated transcription factor (MITF), mRNA	0	TC		CH8E-1.D08	D08	BLASTN
D09	ref NM_204157.2	Gallus gallus eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1 (EEF1A1), mRNA	0	FL		CH8E-1.D09	D09	BLASTN
D10	ref NP_001001858.1	stathmin [Gallus gallus]	8.00E-95	FL		CH8E-1.D10	D10	
D11	ref XM_414197.5	PREDICTED: Gallus gallus zinc finger protein, FOG family member 1 [Gallus gallus]	1.00E-36	FL?		CH8E-1.D11	D11	BLASTN
D12	ref NM_001030836.1	Gallus gallus ribosomal protein S3 (RPS3), mRNA	0	FL		CH8E-1.D12	D12	BLASTN
E01	ref XP_015138726.1	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: elongation factor 1-delta (EF1D), mRNA	6.00E-118	FL?		CH8E-1.E01	E01	
E02	ref NP_989636.1	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Gallus gallus]	2.00E-126	FL		CH8E-1.E02	E02	
E03	ref XP_420022.3	PREDICTED: putative peptidyl-IRNA hydrolase PTRHD1 [Gallus gallus]	8.00E-87	TC		CH8E-1.E03	E03	
E04	ref NP_001264298.1	UPF0693 protein C10orf32 homolog [Gallus gallus]	4.00E-46	TC		CH8E-1.E04	E04	
E05	ref NM_001195785.1	Gallus gallus thymosin beta 15 (LOC100502566), mRNA	2.00E-175	FL		CH8E-1.E05	E05	BLASTN
E06	ref XP_008498329.1	PREDICTED: RNA-binding motif protein, X-linked 2 (Calypte anna) [Gallus gallus]	3.00E-83	FL?		CH8E-1.E06	E06	
E07	ref NM_205518.1	Gallus gallus actin, beta (ACTB), mRNA	0	FL		CH8E-1.E07	E07	BLASTN
E08	ref XP_004938950.2	PREDICTED: pre-mRNA cleavage complex 2 protein Pcf11 isoform 1 [Gallus gallus]	3.00E-31	FL?		CH8E-1.E08	E08	
E09	ref NP_001264592.1	60S ribosomal protein L27a [Gallus gallus]	1.00E-102	FL		CH8E-1.E09	E09	
E10	ref NP_001008451.1	trafficking protein particle complex subunit 3 [Gallus gallus]	5.00E-129	FL		CH8E-1.E10	E10	
E11	ref NP_001264708.1	acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial [Gallus gallus]	5.00E-131	FL		CH8E-1.E11	E11	
E12	ref NM_205172.1	Gallus gallus actin, gamma 2, smooth muscle, enteric (ACTG2), mRNA	0	FL		CH8E-1.E12	E12	BLASTN
F01	ref NP_001232160.1	putative ribosomal protein S18 [Taeniopygia guttata]	5.00E-104	FL		CH8E-1.F01	F01	
F02	ref NP_001264592.1	60S ribosomal protein L27a [Gallus gallus]	8.00E-102	FL		CH8E-1.F02	F02	
F03	ref NP_001264686.1	28S ribosomal protein S9, mitochondrial isoform 1 [Gallus gallus]	7.00E-138	FL		CH8E-1.F03	F03	
F04	ref XP_015138221.1	PREDICTED: 60S ribosomal protein L18a [Gallus gallus]	5.00E-127	FL?		CH8E-1.F04	F04	
F05	ref XM_015278607.1	PREDICTED: Gallus gallus collagen, type IV, alpha 5 (COL4A5), transcript 1 [Gallus gallus]	1.00E-59	TC		CH8E-1.F05	F05	BLASTN
F06	ref NP_001264608.1	60S ribosomal protein L12 [Gallus gallus]	4.00E-114	FL		CH8E-1.F06	F06	
F07	ref XP_015155224.1	PREDICTED: amino-terminal enhancer of split isoform X3 [Gallus gallus]	6.00E-94	FL?		CH8E-1.F07	F07	
F08	ref NM_205258.2	Gallus gallus RAN, member RAS oncogene family (RAN), mRNA	0	FL		CH8E-1.F08	F08	BLASTN
F09	ref XM_015278868.1	PREDICTED: Gallus gallus leucine rich repeat and Ig domain containing protein 1 [Gallus gallus]	2.00E-50	TC		CH8E-1.F09	F09	BLASTN
F10	ref NP_001075176.1	cAMP-regulated phosphoprotein 19 [Gallus gallus]	3.00E-72	FL		CH8E-1.F10	F10	
F11	ref NP_989734.2	mitotic checkpoint serine/threonine-protein kinase BUB1 beta [Gallus gallus]	2.00E-122	FL		CH8E-1.F11	F11	
F12	ref XP_015155795.1	PREDICTED: 40S ribosomal protein S26 [Gallus gallus]	6.00E-75	FL?		CH8E-1.F12	F12	
G01	ref NP_001031597.1	Gallus gallus poly(A) binding protein, cytoplasmic 1 (PABPC1), mRNA	3.00E-51	FL		CH8E-1.G01	G01	BLASTN
G02	ref NM_205122.1	Gallus gallus protein phosphatase 1, catalytic subunit, beta isozyme [Gallus gallus]	0	FL		CH8E-1.G02	G02	BLASTN
G03	ref XP_003641817.1	PREDICTED: heat shock protein beta-7-like [Gallus gallus]	5.00E-114	FL?		CH8E-1.G03	G03	
G04	ref NP_001026100.1	60S ribosomal protein L19 [Gallus gallus]	1.00E-130	FL		CH8E-1.G04	G04	
G05	ref NP_001006321.1	succinate dehydrogenase [ubiquinone] cytochrome b small subunit, mitochondrial [Gallus gallus]	6.00E-105	FL		CH8E-1.G05	G05	
G06	ref NM_205048.1	Gallus gallus cell division cycle 42 (CDC42), mRNA	3.00E-35	FL		CH8E-1.G06	G06	BLASTN
G07	ref NP_001004376.1	hemoglobin subunit alpha-A [Gallus gallus]	4.00E-97	FL		CH8E-1.G07	G07	
G08	ref XP_015157782.1	PREDICTED: collagen alpha-2(I) chain-like [Gallus gallus]	2.00E-58	FL?		CH8E-1.G08	G08	
G09	ref XM_015300308.1	PREDICTED: Gallus gallus proliferation-associated 2G4, 38kDa (PA2G4), mRNA	4.00E-177	TC		CH8E-1.G09	G09	BLASTN
G10	ref NP_006921.2	cytochrome c oxidase subunit III (mitochondrion) [Gallus gallus]	1.00E-61	TC		CH8E-1.G10	G10	
G11	ref NP_001004379.1	60S ribosomal protein L7a [Gallus gallus]	2.00E-132	FL		CH8E-1.G11	G11	
G12	ref NP_001264466.1	microsomal glutathione S-transferase 3 [Gallus gallus]	9.00E-99	FL		CH8E-1.G12	G12	
H01	ref XP_015155112.1	PREDICTED: alanyl-tRNA editing protein Aarsd1-like [Gallus gallus]	3.00E-79	TC		CH8E-1.H01	H01	
H02	ref NP_001239055.1	40S ribosomal protein S8 [Gallus gallus]	6.00E-137	FL		CH8E-1.H02	H02	
H03	no hit			?		CH8E-1.H03	H03	
H04	ref NM_205133.1	Gallus gallus tropoin C type 1 (slow) (TNNC1), mRNA	1.00E-107	FL		CH8E-1.H04	H04	BLASTN
H05	ref XP_015133391.1	PREDICTED: transcription factor Dp-1 isoform X2 [Gallus gallus]	6.00E-86	FL?		CH8E-1.H05	H05	
H06	ref NP_990417.1	ferritin heavy chain [Gallus gallus]	2.00E-106	FL		CH8E-1.H06	H06	
H07	ref XP_415171.4	PREDICTED: aldehyde dehydrogenase, mitochondrial [Gallus gallus]	3.00E-142	TC		CH8E-1.H07	H07	
H08	ref NP_001025721.1	integrin beta 1 binding protein 3 [Gallus gallus]	7.00E-73	FL		CH8E-1.H08	H08	
H09	ref NP_001026470.1	solute carrier family 35 member G2 [Gallus gallus]	4.00E-24	FL		CH8E-1.H09	H09	
H10	ref NP_001006345.1	60S ribosomal protein L7 [Gallus gallus]	6.00E-133	FL		CH8E-1.H10	H10	
H11	ref XP_015129918.1	PREDICTED: 40S ribosomal protein S19 [Gallus gallus]	6.00E-100	FL?		CH8E-1.H11	H11	
H12	ref NM_205133.1	Gallus gallus tropoin C type 1 (slow) (TNNC1), mRNA	3.00E-108	FL		CH8E-1.H12	H12	BLASTN

表2. LiCl/Urea 法で RNA 抽出した 8 日胚心臓の cDNA ライブラリー 96 コの cDNA について塩基配列を決定した。

考察

心筋からの RNA 抽出は LiCl/Urea 法が有効であることが分かった。初めの筋重量と RNA の収量には相関関係がみられた (表 1)。しかし初めの筋重量が多くても RNA が多く取れるとはかぎらなかった (表 1. 1-2, 10-11)。0.3 g 程度の筋重量から効率よく取れるようだ。

グアニジン-超遠心法も出発筋重量と RNA 収量にも相関関係が有った。数 g の筋から mg 単位の RNA が取れた (表 1. 14, 16)。前広背筋と後広背筋は RNA が取れないことがあったが、別の時には前広背筋と後広背筋から RNA が取れることもあった (表 1. 17-20)。RNA 収量 0 の原因は不明。前広背筋と後広背筋はグアニジンチオサイアネー溶液中で繊維状物質が見えていて良く溶けなかったと思われた。また DNA や繊維状物質に引っかかり、遠心チューブの底まで落ちてこなかったのかもしれない。単純な操作に見えてなかなか難しい。遠心チューブの CsCl 層に RNase inhibitor を加えておくの良いのかもしれない。表 1 には最近の 8 例しかないが、実際は数十例存在する。

LiCl/Urea 法とグアニジン-超遠心法を比較すると、LiCl/Urea 法は 1g 未満の筋から RNA を取るのに適しており、グアニジン-超遠心法は数グラムの筋から約 1mg の RNA を取るのに適していると思われる。RNA 抽出キットは上の両法と比較すると安定した収量だったが、出発重量からの RNA 収量が低いことが分かった。筋の RNA 抽出には適していないのかもしれない。

LiCl/Urea 法の操作は簡単に収率良く total RNA が得られる方法と考えられる。mRNA も含まれており cDNA ライブラリーも作成できた。筋蛋白質の cDNA も含まれていた。遅筋のアクチン、トロポニン I と C が含まれており孵卵 8 日胚の心筋は遅筋の筋蛋白質なのかもしれない。親の心筋は速筋の筋蛋白質なので、胚から成長するつれて筋蛋白質は遅筋型から速筋型へ isoform 変換をするのかもしれない。

謝辞、この研究は熊本学園大学の研究助成金を使って行いました。

1. 豊田直二 2018. λ gt11 ライブラリーを使用した心筋 α -アクチニン cDNA の単離、熊本学園大学論集「総合科学」第 23 巻、第 1.2 号、1-10
2. C.Auffray and F. Rougeon 1980. Euro. J. Biochem. 107,303-314.
3. Hokkaido System Science Co., Ltd. 001-0932 Sapporo Japan