

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004年4月8日 (08.04.2004)

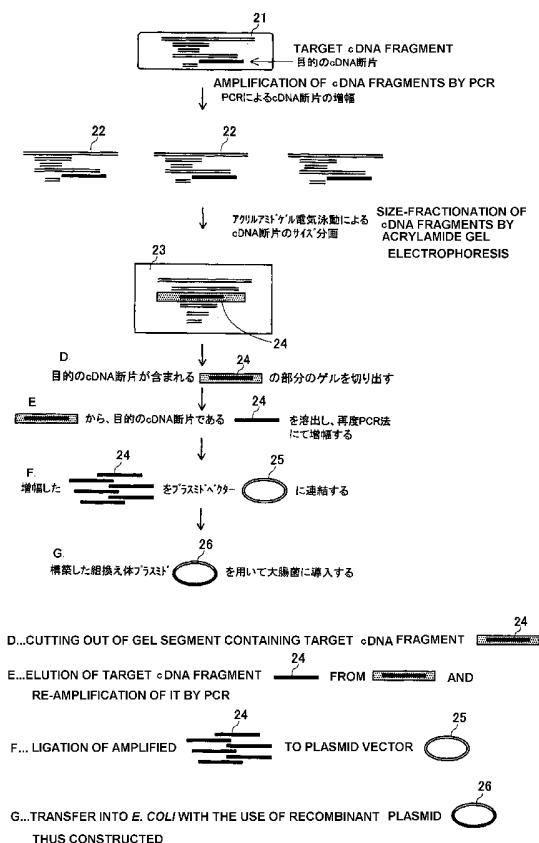
PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/029292 A1

- (51) 国際特許分類7: C12Q 1/68, C12N 15/09 (SUZUKI,Katsuhisa) [JP/JP]; 〒292-0043 千葉県 木更津市 東太田3-1-14- II -101 Chiba (JP).
 - (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/012214
 - (22) 国際出願日: 2003年9月25日 (25.09.2003)
 - (25) 国際出願の言語: 日本語
 - (26) 国際公開の言語: 日本語
 - (30) 優先権データ: 特願2002-280660 2002年9月26日 (26.09.2002) JP
 - (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): アイシン精機株式会社 (AISIN SEIKI KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒448-8650 愛知県 刈谷市 朝日町2丁目1番地 Aichi (JP).
 - (72) 発明者; および
 - (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 鈴木 勝久
 - (74) 代理人: 奥田 誠, 外(OKUDA,Makoto et al.); 〒460-0003 愛知県 名古屋市中区 錦二丁目2番22号名古屋センタービル別館2階 Aichi (JP).
 - (81) 指定国(国内): US.
 - (84) 指定国(広域): ヨーロッパ特許(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF RECOVERING DNA

(54) 発明の名称: DNA回収法



(57) Abstract: It is intended to provide a method of recovering DNA whereby a target cDNA fragment can be more surely recovered from a cDNA fragment mixture having various types of cDNA fragments. Namely, a method of recovering DNA which comprises the first PCR step wherein a mixture of cDNA fragments each having a first adaptor sequence on one end and a second adaptor sequence on the other end is subjected to PCR by using a first primer having a sequence complementary to the first adaptor sequence together with a labeling and a second primer having a sequence complementary to the second adaptor sequence; the electrophoresis step wherein the cDNA fragments having been amplified in the first PCR step are electrophoresed on a gel; and the recovery step wherein a gel segment containing the target cDNA fragment is cut out from the gel based on the results of the electrophoresis to thereby recover the cDNA fragment.

(57) 要約: 様々な種類のcDNA断片が混在するcDNA断片の群から目的とするcDNA断片をより確実に回収することができるDNA回収法を提供することを目的とする。DNA回収法は、一端に第1アダプター配列を有し他端に第2アダプター配列を有するcDNA断片の群について、第1アダプター配列に相補的な配列を有すると共に標識物質を有する第1プライマーと、第2アダプター配列に相補的な配列を有する第2プライマーとを用いて、PCR反応を行う第1PCR工程を備える。また、第1PCR工程で増幅されたcDNA断片の群についてゲル電気泳動を行う電気泳動工程と、電気泳動の結果に基づいて、ゲルから目的のcDNA断片を含むゲルを切り出し、当該cDNA断片を回収する回収工程とを備える。

WO 2004/029292 A1

明 細 書

DNA回収法

5 技術分野

本発明は、目的とする DNA 断片を回収する方法に関し、特に、様々な種類の cDNA 断片が混在する cDNA 断片の群から目的とする cDNA 断片を回収する DNA 回収法に関するものである。

10 背景技術

従来より、様々な cDNA 断片が混在する cDNA 断片の群から、目的とする cDNA 断片を回収する DNA 回収法が、いくつか知られている。

例えば、平板ゲルを利用して、cDNA 断片の群から目的とする cDNA 断片を回収する方法がある（例えば、非特許文献 1 参照。）。即ち、cDNA 断片の群について、例えばアクリルアミドゲル電気泳動を行う。その後、アクリルアミドゲル中の cDNA 断片をエチジウムブロミドで染色し、UV トランスイルミネータによりアクリルアミドゲルを照らして cDNA 断片を検出する。そして、分画された cDNA 断片の群から目的の cDNA 断片を含むアクリルアミドゲルを切り出し、そのゲルから当該 cDNA 断片を回収する。

また、例えば、キャピラリー電気泳動を利用して、cDNA 断片の群から目的とする cDNA 断片を回収する方法もある（例えば、特許文献 1～3 参照。）。即ち、予め蛍光標識した cDNA 断片の群をキャピラリーカラムに供試し電気泳動を行う。そして、検出されたピークに基づいて、目的の cDNA 断片が泳動されて来る時間を推測する。次に、再びキャピラリーカラムで電気泳動を行い、その推定時間をもとに目的の cDNA 断片を回収する。

【非特許文献 1】

A new method for sequencing DNA.

Proc.Natl.Acad.Sci. 1977,74:560-564

【特許文献 1】

特開 2000-88803 号公報

【特許文献 2】

特開平 7-181164 号公報

【特許文献 3】

5 特開平 6-138037 号公報

しかしながら、前者の方法では、目的とする cDNA 断片が少量しか存在しない場合、ゲル電気泳動後、cDNA 断片を染色しても、UV トランスイルミネータ下でそれを検出することができないため、目的とする cDNA 断片を回収できないという問題がある。

10 一方、後者の方では、蛍光標識した cDNA 断片を使用しているので、目的とする cDNA 断片が少量であっても、これを検出することは可能である。しかしながら、この方法では、cDNA 断片を目視しながら回収することができないため、目的の cDNA 断片がキャピラリーカラムの先端部分に現れる時間を予想して回収する。そのため、回収した cDNA 断片には、目的とする cDNA 断片に加え、目的物とほぼ同じくらいの長さの cDNA 断片が混在する可能性がある。また、サイズ分画能が平板ゲルを使用した場合と比較すると良くないため、回収した cDNA 断片の中に目的物以外のものが混在したり、また、目的とする cDNA 断片の回収率の低下を招くこともある。

20 本発明はかかる現状に鑑みてなされたものであって、様々な種類の cDNA 断片が混在する cDNA 断片の群から目的とする cDNA 断片をより確実に回収することができる DNA 回収法を提供することを目的とする。

発明の開示

25 前記目的を達成するための解決手段は、一端に第 1 アダプター配列を有し他端に第 2 アダプター配列を有する cDNA 断片の群について、上記第 1 アダプター配列に相補的な配列を有すると共に標識物質を有する第 1 プライマーと、上記第 2 アダプター配列に相補的な配列を有する第 2 プライマーとを用いて、PCR 反応を行う第 1 PCR 工程と、上記第 1 PCR 工程

で増幅された cDNA 断片の群についてゲル電気泳動を行う電気泳動工程と、上記電気泳動工程の結果に基づいて、ゲルから目的の cDNA 断片を含むゲルを切り出し、当該 cDNA 断片を回収する回収工程と、を備えることを特徴とする DNA 回収法である。

- 5 本発明のDNA回収法は、両端にアダプター配列を有するcDNA断片の群から、目的とするcDNA断片を回収する方法である。まず、cDNA断片の一端にある第1アダプター配列に相補的な配列を有すると共に標識物質を有する第1プライマーと、cDNA断片の他端にある第2アダプター配列に相補的な配列を有する第2プライマーとを用いて、PCR反応を行う。そして、
- 10 増幅されたcDNA断片の群（PCR産物）をゲル電気泳動する。その後、その電気泳動の結果に基づいて、ゲルから目的のcDNA断片を含むゲルを切り出し、そこからcDNA断片を回収する。

このような方法によれば、予めゲル電気泳動前にcDNA断片の群についてPCR反応を行うので、cDNA断片の群を多量に増幅することができる。従って、目的とするcDNA断片が低濃度であっても、それを大幅に増幅することができ、ゲル電気泳動においてそれを検出することができる。

15

また、このPCR反応では、標識物質を有するプライマーを用いているので、PCR産物も標識物質を有することになる。従って、PCR反応を行っても依然として目的とするcDNA断片が比較的少ない場合であっても、電気泳動においてこの標識物質を認識することで、目的とするcDNA断片のゲル中の位置を容易に検出することができる。

20

さらに、cDNA断片の群をゲル電気泳動によって分画するため、例えばキャピラリーカラムによる電気泳動に比べ、サイズ分解能を向上させ、目的とするcDNA断片のみをより特異的に回収することができる。

- 25 ここで、サンプルとする様々なcDNA断片からなるcDNA断片の群については、一端に第1アダプター配列を有し他端に第2アダプター配列を有するものであれば、いかなるものであってもよい。即ち、cDNA断片の由来は問われず、動植物細胞から抽出したmRNAから作製したものであっても、ウイルスや微生物から抽出したmRNAから作製したものであってもよい。

また、cDNA断片の群は、抽出に用いた細胞で発現されたほとんどすべての遺伝子が含まれる群であっても、その発現された遺伝子の一部だけが含まれる群であってもよい。また、cDNA断片は、全長cDNAの両端にアダプター配列が付いたものでも、全長cDNAの一部分をなす断片の両端にアダプター配列が付いたものでもよい。また、第1アダプター配列及び第2アダプター配列は、それぞれいかなる塩基配列からなるものであっても構わないが、PCRの効率等を考慮して設計されたものであるのが好ましい。即ち、これらのアダプター配列がそれぞれ15塩基前後であると、安定したPCR反応を行うことができ、効率よくcDNA断片を増幅することができる。

第1プライマーは、第1アダプター配列に相補的な配列を有し、かつ、標識物質を有するものであれば、いかなるものであってもよい。ここでいう相補的な配列とは、第1アダプター配列に対し100%相補的な配列に限られず、PCR反応においてcDNA断片を増幅されることができる程度に実質的に相補的な配列も含まれる。また、第1プライマーは、第1アダプター配列に相補的な配列のみからなるものに限られず、第1アダプター配列に相補的な配列に、さらに他の配列が繋がったものであってもよい。第1プライマーは、第1アダプター配列全体に対応するものに限られず、第1アダプター配列の一部に対応するものでもよい。

また、標識物質は、ゲル電気泳動において検出感度が高いものであれば、いずれのものを使用することもできる。例えば、6-カルボキシフルオレッセイン（以下、FAMと称す。）、4,7,2',4',5',7'-ヘキサクロロ-6-カルボキシフルオレッセイン（以下、HEXと称す。）、NED（アプライドバイオシステムズジャパン社）、6-カルボキシ-X-ローダミン（以下、Roxと称す。）等の蛍光物質などを使用することができる。これらの標識物質は、例えば、プライマーDNAの末端（例えば5'末端）に結合させればよい。

第2プライマーは、第2アダプター配列に相補的な配列を有するものであれば、いかなるものであってもよい。ここでいう相補的な配列も、第2アダプター配列に対し100%相補的な配列に限られず、PCR反応に

においてcDNA断片を増幅させることができる程度に実質的に相補的な配列も含まれる。また、第2プライマーについても、第2アダプター配列に相補的な配列のみからなるものに限られず、第2アダプター配列に相補的な配列に、さらに他の配列が繋がったものであってもよい。また、第2プライマーについても、第2アダプター配列全体に対応するものに限られず、第2アダプター配列の一部に対応するものでもよい。さらに、上述の第1プライマーだけでなく、この第2プライマーにも、上述の標識物質が結合されていても構わない。

次に、その他一般にPCR反応で用いられる種々の試薬について説明する。

10 DNAポリメラーゼは、PCR反応においてDNA鎖を変性させる際の高温に短時間加熱されても永久的には不活性化されず、しかも、高温における活性を有するものが好適である。例えば、サーモコッカス・リトラリス (*Thermococcus litoralis*)、バチルス・ステアロサーモフィルス (*Bacillus stearothermophilus*)、メタノサーマス・フェルビドゥス

15 (*Methanothermus fervidus*)、サーマス・アクアティクス (*Thermus aquaticus*)、T.フラブス (*T. flavus*)、T.ラクテウス (*T. lacteus*)、T.ルベンス (*T. rubens*)、T.ルバー (*T. ruber*) などの高熱菌由来のDNAポリメラーゼや、デスルフロコッカス・モビリス (*Desulfurococcus mobilis*)、メタノバクテリウム・サーモオートトロフィルクム (*Methanobacterium thermoautotrophilicum*)、スルホロブス・ソルファタリクス (*Sulfolobus solfataricus*)、S.アシドカルダリウス (*S. acidocaldarius*)、サーモプラズマ・アシドフィルム (*Thermoplasma acidophilum*)、ピロコッカス・コダカラエンシス (*Pyrococcus kodakaraensis* KOD1株) などの高熱性古細菌由来のDNAポリメラーゼなどが挙げられる。これらのうち、入手容易

25 性等の理由から、サーマス・アクアティクス (*Thermus aquaticus*) 由来のDNAポリメラーゼ (Taq DNAポリメラーゼ)、サーモコッカス・リトラリス (*Thermococcus litoralis*) 由来のDNAポリメラーゼ、あるいは、ピロコッカス・コダカラエンシス (*Pyrococcus kodakaraensis* KOD1株) 由来のDNAポリメラーゼを利用するのが好ましい。

さらに、PCR反応液には、DNAポリメラーゼによる核酸増幅前の活性を阻害するために、DNAポリメラーゼに特異的な抗体を混合してもよい。この抗体には、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、組換え法により製造された抗体、化学的または組換え法により製造された抗体フラグメント（例えば、Fabフラグメント）が挙げられる。これらのうち、モノクローナル抗体を用いるのが特に好ましい。例えば、Taq DNAポリメラーゼに対する公知のモノクローナル抗体は、約20℃～40℃においてTaq DNAポリメラーゼの酵素活性を阻害することができると共に、PCRの熱的サイクルにおける高温によって不活性化される。

10 また、PCR反応は、一般に、4種類のdNTP、即ち、dATP、dCTP、dGTP及びdTTPの存在化において行う。

さらに、PCR反応は、一般に、適当な緩衝剤を含む反応液中で行われる。効率よく核酸を増幅させるためである。緩衝液は、使用するDNAポリメラーゼ等により、反応の最適条件を得るため適宜変更することができる。例えば、pHを適当に調整したトリス系の緩衝液に、塩化カリウムや塩化マグネシウムを加えた緩衝液を利用することができる。

15 また、PCR反応液には、5%～10%のDMSOと1%～2%のベタインを添加してもよい。鋳型DNAとなるcDNA断片が二字構造を有する場合に産物が増幅されにくいという問題を、最小限に留める効果を有するものである。

20 電気泳動工程では、アクリルアミドゲル電気泳動やアガロースゲル電気泳動など、公知の平板ゲル電気泳動などにより、cDNA断片（PCR産物）を電気泳動し、cDNA断片を分画する。電気泳動には、公知の電気泳動装置を利用すればよい。

25 回収工程は、電気泳動工程の結果に基づいて、ゲルから目的とするcDNA断片を含むゲルを切り出し、そのDNA断片を回収する工程であれば、いかなる方法を利用することもできる。

即ち、例えば、後述する実施例に示すように、標識物質を検出することができるDNAシーケンサーにcDNA断片を供試して電気泳動工程を行

い、その解析結果から、回収するcDNA断片を決定する。次に、再度同一サンプルを電気泳動して、目的とするcDNA断片が検出されたときに、その部分のゲルを切り出し、そこからcDNA断片を回収する方法が挙げられる。

- 5 また、ゲル電気泳動後、標識物質を検出することができるスキャナー上にゲルを載置し、その解析結果から回収するcDNA断片を決定する。そして、その部分のゲルを切り出し、そこからcDNA断片を回収する方法が挙げられる。

ところで、両端にアダプター配列を有するcDNA断片の群は、例えば、
10 次のようにして作製することができる。

即ち、細胞から抽出したmRNAから、その5'末端にタグ物質を付加されたcDNA断片を合成する工程と、得られたcDNA断片を第1制限酵素によって切断する工程と、上記タグ物質に高親和性を有する高親和性物質を結合させることにより、タグ物質を有するcDNA断片を回収する工程と、
15 回収されたcDNA断片に、上記第1制限酵素の酵素切断部位の配列に相補的な配列を有する第1アダプター配列を結合させる工程と、上記第1アダプター配列を結合させたcDNA断片を第2制限酵素によって切断する工程と、上記高親和性物質を結合させて、上記タグ物質を有するcDNA断片を除去し、上記タグ物質を有しないcDNA断片を回収する工程と、
20 上記タグ物質を有しないcDNA断片に、上記第2制限酵素の酵素切断部位の配列に相補的な配列を有する第2アダプター配列を結合させる工程と、を備える方法によって、両端にアダプター配列を有するcDNA断片の群を作製することができる。

さらに、このようなcDNA断片の群について、上記第1アダプター配列
25 に相補的な配列を有しかつその3'末端に任意の2塩基配列であるNNを有するプライマーと、上記第2アダプターの配列に相補的な配列を有しかつその3'末端に任意の2塩基配列であるNNを有するプライマーとを用いて、PCR反応を行う工程により、上記のcDNA断片の群を小規模なcDNA断片の群に分類することもできる。

このような方法によってcDNA断片の群を作製すれば、発現されたほとんど全ての遺伝子、即ち、公知の遺伝子も未知の遺伝子も同様に、その群の中に含まれるようにすることが可能である。従って、遺伝子解析等において有効に活用することができる。また、解析が容易となるように、

- 5 cDNA断片の群を複数の小規模な群に分類することができる。

なお、タグ物質とタグ物質に高親和性を有する高親和性物質とは、互いに高親和性をもって特異的に結合することが可能な結合対を構成する物質を示す。タグ物質と高親和性物質の組合せとしては、例えば、ビオチンとストレプトアビジン、ビオチンとアビジン、FITCとFITC抗体、DIG
10 とアンタイDIG、プロテインAとマウスIgG、ラテックス粒子等が挙げられる。また、各組合せにおいて、いずれをタグ物質として使用しても、いずれを高親和性物質として使用してもよい。

また、制限酵素とは、一般的に、制限エンドヌクレアーゼとも称される酵素であり、特定の配列において二本鎖DNAを加水分解し切断する酵素
15 である。上記の方法においては、適切な断片を得るために2種類の制限酵素（第1制限酵素及び第2制限酵素）を組み合わせて使用する。使用する制限酵素は、cDNA断片を識別可能な長さを有する断片に切断することが可能なものが好ましい。また、合成されたcDNA断片のより多くを、好ましくは、ほとんど全てを切断するような酵素が好ましい。また、制
20 限酵素は、4塩基認識酵素を使用しても6塩基認識酵素を使用してもよいが、特に、上記の理由から、4塩基認識酵素の使用が好ましい。

また、アダプター配列は、PCR増幅の際に用いるプライマーを結合させるために用いるものであるが、使用する制限酵素に応じて設計される。即ち、第1制限酵素の酵素切断部位に結合させるための第1アダプター
25 配列は、第1制限酵素の酵素切断部位に相補的な配列を有し、また、第2制限酵素の酵素切断部位に結合させるための第2アダプター配列は、第2制限酵素の酵素切断部位に相補的な配列を有する。

また、プライマーセットは、cDNA断片をPCRにより増幅するために使用する1組のプライマーからなる。ここで使用される「任意の2塩基配列

であるNN」は、A、T、G、Cから任意に選択される配列である。ここで、各任意の配列を2塩基としたのは、当該方法の簡便性と解析精度を考慮した結果である。つまり、各任意の配列を2塩基とすることにより、最大256種類のプライマーセットが得られるため、cDNA断片の群を複数
5 の群に分類することができる。なお、この任意の2塩基配列NNを、一方のプライマーまたは両方のプライマーについて3塩基以上とすることも可能である。それによってプライマーの種類が増え、プライマーセットを最大1024個や最大4096個とすることができる。

さらに、上記のいずれかに記載のDNA回収法であって、前記回収工程で
10 回収したcDNA断片について、前記第1アダプター配列に相補的な配列を有する第3プライマーと、前記第2アダプター配列に相補的な配列を有する第4プライマーとを用いて、再度PCR反応を行う第2PCR工程を備えることを特徴とするDNA回収法とすると良い。

本発明では、回収工程で回収したcDNA断片について、再度PCR反応を行
15 う第2PCR工程を備える。このため、回収したcDNA断片が少量しかなくても、それを大幅に増幅させることができる。

なお、このPCR工程で使用する第3プライマーは、第1アダプター配列に相補的な配列を有するものであればよく、例えば、上記の第1プライマーを利用しても良いが、このPCR工程では標識物質は特に要しない。同
20 様に、第4プライマーは、第2アダプター配列に相補的な配列を有するものであればよく、例えば、上記の第2プライマーを利用しても良い。

さらに、上記のDNA回収法であって、前記第2PCR工程において、RecAタンパク質及びこのRecAタンパク質を改変したタンパク質であってこのRecAタンパク質と類似する機能を有するRecA改変タンパク質の少なくとも
25 もいずれかを含む相同的組換えタンパク質を反応液に混合して、PCRを行うことを特徴とするDNA回収法とすると良い。

本発明によれば、第2PCR工程において、RecAタンパク質等の相同組み換えタンパク質を反応液に混合してPCRを行い、回収したcDNA断片を増幅させる。

このようにPCRを行えば、cDNA断片の収量を減少させることなく、副産物（非特異的なPCR産物）の増幅を低く抑えることができる。即ち、上記の相同組み換えタンパク質が存在することにより、プライマーがcDNA断片の非特異的な領域に結合してプライマー伸長反応を起こすことが抑制されるため、非特異的なPCR産物の増幅を抑制することができる。

また、本発明では、上記のように特異性が高いため、アニーリング温度等、プライマー伸長反応の温度条件を変えても、回収したcDNA断片を特異的に増幅させることができる。即ち、従来のPCR方法では、アニーリング温度等、プライマー伸長反応の温度を低く設定すると、回収したcDNA断片だけでなく、副産物も多量に増幅されることとなるが、本発明によれば、回収したcDNA断片をより特異的に増幅させることが可能となる。

これらの結果、目的とするcDNA断片をさらに確実に回収することができる。

ここで、上記の相同組み換えタンパク質は、RecAタンパク質、及び、RecAタンパク質を改変したものであって RecAタンパク質と類似する機能を有するRecA改変タンパク質、の少なくともいずれかを含むものであれば、いかなるものを用いてもよい。RecA改変タンパク質としては、例えば、RecAタンパク質をコードする遺伝子から、部位特異的変位誘発等により作出された遺伝子の産物であって、1または数個のアミノ酸が欠損、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、RecAタンパク質と類似する機能を有するものが挙げられる。また、RecAタンパク質のタンパク質断片であって、タンパク質と類似する機能を有するもの（RecAフラグメント）などであってよい。

また、RecAタンパク質等は、上述したDNAポリメラーゼと同様に、PCR反応においてDNA鎖を変性させる際の高温に短時間加熱されても永久的には不活性化されず、しかも、高温における活性を有するものが好適である。例えば、入手容易性等の理由から、大腸菌（*E. coli*）由来のRecAタンパク質を利用するのが好ましい。

なお、上記の相同組み換えタンパク質は、プライマー20 pmolあたり、

1 ng～1 0 0 0 ngの範囲で混合するのが好ましい。このような範囲でPCRを行えば、より効率よく特異的に、cDNA断片を増幅することができるからである。

さらに、上記のいずれかに記載のDNA回収法であって、前記回収工程後、
5 または、前記第2 PCR工程を有する場合にはこの第2 PCR工程後、前記cDNA断片をプラスミドベクターに連結し、組換え体プラスミドを形成する連結工程と、上記組換え体プラスミドを大腸菌に導入する導入工程と、を備えることを特徴とするDNA回収法とすると良い。

本発明のDNA回収法は、第2 PCR工程を有しない場合には回収工程後、
10 または、第2 PCR工程を有する場合には第2 PCR工程後、目的のcDNA断片をプラスミドベクターに連結し、組換え体プラスミドを形成する連結工程を備える。そしてさらに、この組換え体プラスミドを大腸菌に導入する導入工程を備える。

このように、回収したcDNA断片をプラスミドベクターに連結し、大腸
15 菌に導入しておけば、cDNA断片の構造解析をする場合などに有効である。即ち、形質転換したその大腸菌を培養し、それからcDNA断片を有するプラスミドDNAを抽出すれば、これを例えば塩基配列の決定等の構造解析に用いることができる。

20 図面の簡単な説明

第1図は、実施例1に関し、目的とするcDNA断片を回収するためのサンプルとなるcDNA断片群の作成方法についての概要を示す説明図である。

第2図は、実施例1に関し、目的とするcDNA断片を回収するためのサンプルとなるcDNA断片群の作成方法についての詳細を示す説明図である。

25 第3図は、実施例1に関し、Aは第1アダプター配列を示す説明図であり、Bは第2アダプター配列を示す説明図である。

第4図は、実施例1に関し、256種類のcDNA断片群に分類するためのプライマーセットの配列を示す説明図である。

第5図は、実施例1に関し、cDNA断片の群から目的とするcDNA断片を

回収する方法を示す説明図である。

第6図は、実施例3に関し、RT-PCRで増幅したcDNA断片の群を電気泳動した結果を示す、図面に変わる写真である。

5 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の実施例を、図を参照しつつ説明する。

(実施例1)

本実施例においては、まず、特定の細胞において発現された遺伝子を以下のように分類する。まず、抽出したmRNAからcDNA群を合成する。そして、得られたcDNA群を適切な2つの制限酵素によって切断し、また、
10 両端にアダプター配列を結合して、識別可能なだけの長さを有しかつ両端にアダプター配列を有するcDNA断片の群を作成する。その後、得られたcDNA断片の群を、複数種類のプライマーセットを用いて複数の群に分類する。

この分類の手法を第1図を参照しつつ説明する。発現されたmRNAからなる群1から公知の手法によりcDNAの群2を合成する。これを適切な2つの制限酵素によって切断してcDNA断片の群3を得る。そして、このcDNA断片の両末端の各2塩基、全4塩基の配列に応じて、即ち、4塩基がA、T、G、Cのいずれであるかにより、cDNA断片の群3を分類する。例えば、
20 5'末端の塩基(第1図中に黒塗りで示す。)を区別することで、群3を4種類の群4に分類することができる。そして、次の2番目の塩基(第1図中に黒塗りで示す。)を区別することで、群4をそれぞれ4種類の群5に分類することができる。さらに、3'末端の2番目の塩基(第1図中に黒塗りで示す。)を区別することで、群5をそれぞれ4種類の群6に分類
25 することができる。またさらに、3'末端の塩基(第1図中に黒塗りで示す。)を区別することで、群6をそれぞれ4種類の群7に分類することができる。

次に、抽出したmRNAの群1から複数のcDNA断片の群7を調製する手法について、第2図を参照しつつ具体的に説明する。第2図における各ア

ルフアベットは塩基配列を構成する塩基を示すが、N、M、W、X、Y及びZは任意の塩基を示し、XとY及びWとZは、互いに相補的に結合する。

まず、試験対象となる特定の細胞から公知の手法によりmRNA 1 1を抽出する。本実施例では、酵母から、Fast Track 2.0 kit (Invitrogen社製)を用いて、総mRNA 1 1を20 μ g抽出した。

次に、抽出されたmRNA 1 1の3'末端側のポリAテイルに相補的なオリゴdTプライマーをビオチン(タグ物質) 1 3で標識化する。そして、これをプライマーとして用いてcDNA 1 2を合成する。具体的には、抽出した20 μ gのmRNA 1 1を、0.8 μ l中で100 pmoleの5'-ビオチン化オリゴdTプライマー(BRL社製)と混合し、65 $^{\circ}$ Cで5分間インキュベートした。続いて、それを水冷した後、逆転写バッファー20.0 μ l中で、最終濃度5 mMのMgCl₂と0.5 mMのdNTPミックス(BRL社製)と10 mMのDTT(BRL社製)を42 $^{\circ}$ Cで60分間インキュベートした。続いて、二本鎖合成バッファー150.0 μ l中で最終濃度0.27 mMのdNTPミックス(BRL社製)と1.33 mMのDTT(BRL社製)と20.0ユニットの*E. coli*リガーゼ(BRL社製)と40.0ユニットの*E. coli* DNAポリメラーゼ(BRL社製)と2.0ユニットのRNase H(BRL社製)を16 $^{\circ}$ Cで120分間インキュベートし、続いて、70 $^{\circ}$ Cで15分間インキュベートし反応を止めた。

次に、合成されたcDNA 1 2を第1制限酵素を用いて切断する。具体的には、100 μ l中で最終濃度20ユニットの制限酵素Msp I(宝酒造社製)と10 μ gのcDNA 1 2とを、37 $^{\circ}$ Cで360分間反応させた。なお、Msp Iは、4塩基認識制限酵素である。その後、エタノールを用いてcDNA断片を公知の手法により精製した。

次に、ストレプトアビジン(高親和性物質) 1 4を用いてビオチン 1 3を捕捉し、切断されたcDNA断片の3'末端側のみを回収する。具体的には、反応液に磁気ビーズに固定したストレプトアビジン 1 4(ダイナル社製)に対して、ビオチン 1 3を結合し、産物を得た。

次に、回収されたcDNA断片の5'末端側に、第1制限酵素の認識切断

部位に相補的な配列を有する第1アダプター配列15を結合させる。本実施例で使用した第1アダプター配列15について、第3A図に示す。具体的には、15 μ lのT4 DNAリガーゼバッファー中でCG突出末端(即ち、制限酵素Msp Iの切断断片部位の相補的配列である)を有する5.0 μ g
5 の第1アダプター(BRL社製)と、10ユニットのT4 DNAリガーゼ(NEB社製)を用いてライゲーションを行った。

次に、このcDNA断片を第2制限酵素を用いて切断する。具体的には、200 μ l中で最終濃度50ユニットの制限酵素Mse I(NEB社製)とcDNA断片とを、37°Cで360分間反応させた。なお、このMse Iも、4塩基
10 認識制限酵素である。その後、エタノールを用いてcDNA断片を公知の手法により精製した。

次に、ストレプトアビジン14を用いてビオチン13を捕捉し、切断されたcDNA断片の3'末端側を除去し、切断されたcDNA断片の5'末端側を回収する。

そして、回収されたcDNA断片の3'末端側に、第2制限酵素の認識切断部位に相補的な配列を有する第2アダプター配列16を接合させる。本実施例で使用した第2アダプター配列16について、第3B図に示す。具体的には、10 μ lのT4 DNAリガーゼバッファー中でTA突出末端(即ち、制限酵素Mse Iの切断断片部位の相補的配列である)を有する10 pmole
20 の第2アダプター配列(BRL社製)と、10ユニットのT4 DNAリガーゼ(NEB社製)を用いてライゲーションを行った。

以上の処理によって、両末端に既知配列を含むcDNA断片17の群が構築される。

次に、このcDNA断片17の群について、プライマーセットを用いてPCR
25 反応を行う。このプライマーセットには、第4A図に示すように、第1アダプター配列に相補的な配列と、増幅させる方向にさらに2塩基の配列(第4図中にNNで示す。)を有するプライマーと、第4B図に示すように、第2アダプター配列に相補的な配列と、増幅させる方向にさらに2塩基の配列を有するプライマー(第4図中にNNで示す。)とを使用する。

それぞれのプライマーの増幅される方向に付与した2塩基は、A、T、G、Cの4種類の塩基からなる全ての組合せによって設計されるので、最大256種類のプライマーセットが考えられる。従って、これらのプライマーセットを用いて、cDNA断片17の群についてPCRを行うことにより、複数種類のcDNA断片18の群に分類すると共に、PCR増幅を行うことが可能である。なお、PCRは、公知の手法により行えばよい。

以上のようにして得た複数種類のcDNA断片18の群は、それぞれ本実施例において、目的とするcDNA断片を回収するためのサンプルとして利用することができる。

10 次に、上述のようにして作成した小規模なcDNA断片の群の1つをサンプルとし、以下に示す手法により、目的とするcDNA断片を回収する。この手法については、第5図を参照しつつ説明する。

15 なお、本実施例でサンプルとした小規模なcDNA断片の群は、オリゴヌクレオチド1からなるプライマーと、オリゴヌクレオチド2からなるプライマーを用いて、分類したものである。

オリゴヌクレオチド1：

5' -aagtctgatacgacccggac-3'

オリゴヌクレオチド2：

5' -acgactgtagtccaagtaata-3'

20 まず、第1PCR工程において、作成したcDNA断片の群21について、第1アダプター配列15に相補的な配列を有し、かつ、標識物質が結合された第1プライマーと、第2アダプター配列16に相補的な配列を有する第2プライマーとを用いて、PCR反応により増幅させる。

25 具体的には、第1アダプター配列15に相補的な配列を有する上記オリゴヌクレオチド1に、蛍光物質である近赤外蛍光色素IRD-800が結合された第1プライマーと、第2アダプター配列16に相補的な配列を有する上記オリゴヌクレオチド2からなる第2プライマーとを用いて、PCR反応を行った。第1、第2プライマーは、それぞれ公知の手法により合成すればよい。

また、PCR反応は、パーキンエルマー社製の GeneAmp 2400 を用いて行った。PCR条件は、Stepdown PCR (Biotechniques, 1996, 20: 478-485 を参照されたい。) により行った。使用した酵素 (DNAポリメラーゼ) は、東洋紡社製の KOD Dash 酵素である。このDNAポリメラーゼは、ピロコッカス・コダカラエンシス (Pyrococcus kodakaraensis KOD1株) に由来するものである。反応液の組成は、添付のマニュアルに従った。

次に、電気泳動工程において、増幅したcDNA断片の群 2 2 (PCR産物) についてゲル電気泳動を行う。

具体的には、増幅したcDNA断片の群 2 2 を、蛍光色素の読み取れるDNAシーケンサー (LI-COR社製LIC-4200L(S)-1) に供試し、サイズ分画のためにアクリルアミドゲル電気泳動を行った。アクリルアミドゲル 2 3 の組成は、上記DNAシーケンサーに付属のマニュアルに従った。

次に、回収工程において、電気泳動工程の結果に基づいて、ゲルから目的のcDNA断片 2 4 を含むゲルを切り出し、当該cDNA断片 2 4 を回収する。

具体的には、アクリルアミドゲル電気泳動の解析結果から、抽出するcDNA断片 2 4 を決定した。なお、このcDNA断片 2 4 は、既知の遺伝子である A 遺伝子由来のものであり、長さは 2 0 2 bp (両アダプター配列を含む。) である。そして、再度同一サンプルをアクリルアミドゲル電気泳動し、目的とするcDNA断片 2 4 が解析画面上に出現するとすぐに電気泳動を終了して、検出器のレーザーが当たる部分のゲルを切り出した。

そして、切り出したアクリルアミドゲルを、緩衝液中において 6 5 °C で一晩反応させ、アクリルアミドゲルからcDNA断片 2 4 を回収した。なお、このcDNA断片 2 4 の回収には、Omega Bio-tek社製のキット (E.Z.N.A.Poly-Gel DNA extraction kit) を使用した。

次に、第 2 PCR工程において、回収したcDNA断片 2 4 について、第 1 アダプター配列 1 5 に相補的な配列を有する第 3 プライマーと、第 2 アダプター配列 1 6 に相補的な配列を有する第 4 プライマーとを用いて、再度PCR反応を行う。

具体的には、フォワード側には、第 1 アダプター配列に相補的な配列を有すると共に制限酵素Not I 部位の配列を有する第 3 プライマーを、リバーズ側には、第 2 アダプター配列に相補的な配列を有すると共に制限酵素Spe I 部位の配列を有する第 4 プライマーを用いて、PCR反応を行った。第 3 プライマーは、オリゴヌクレオチド 3 からなり、第 4 プライマーは、オリゴヌクレオチド 4 からなる。

オリゴヌクレオチド 3 :

5' -tagcggcgcgaagtctgatacggaccggac-3'

オリゴヌクレオチド 4 :

10 5' -gaactagtaacgactgtagtccaagtaata-3'

また、このPCR工程においても、PCR反応は、パーキンエルマー社製の GeneAmp 2400 を使い、Stepdown PCR (Biotechniques, 1996, 20 : 478-485 を参照されたい。) の条件により行った。使用した酵素 (DNAポリメラーゼ) は、東洋紡社製の KOD Dash 酵素である。反応液の組成は、添付のマニュアルに従った。

次に、連結工程において、第 2 PCR工程で増幅したcDNA断片 2 4 の産物をプラスミドベクター 2 5 に連結し、組換え体プラスミド 2 6 を形成する。

具体的には、増幅したcDNA断片 2 4 の産物を制限酵素Not I とSpe I で処理した上で、プラスミドベクター (pbluescriptII) 2 5 に連結し、組換え体プラスミド 2 6 を形成した。この連結は、宝酒造社製のライゲーションキットver.2 を使用し、その添付マニュアルに従って行った。

その後、導入工程において、組換え体プラスミド 2 6 を大腸菌に導入する。

25 具体的には、コンピテントセルとして E.coli DH5 α を使用し、公知の手法により、組換え体プラスミド 2 6 を大腸菌に導入した。

以上のようにすれば、cDNA断片の群 2 1 から目的とするcDNA断片 2 4 をより確実に回収することができる。

次に、他の既知の遺伝子 (B 遺伝子、C 遺伝子及び D 遺伝子) 由来の

cDNA断片についても、それぞれ上記の手法により回収した。

各cDNA断片の回収にあたり、サンプルには、上記A遺伝子を回収したcDNA断片の群とは、それぞれ異なるcDNAの群を前述の方法により作成した。

- 5 また、サンプルとしたcDNA断片の群が異なることに伴い、第1プライマー～第4プライマーも、その塩基配列が若干異なるものを使用した。

具体的には、B遺伝子由来のcDNA断片の回収には、第1プライマーとしてオリゴヌクレオチド5を、第2プライマーとしてオリゴヌクレオチド6を、第3プライマーとしてオリゴヌクレオチド7を、第4プライマーとしてオリゴヌクレオチド8を使用した。

また、C遺伝子由来のcDNA断片の回収には、第1プライマーとしてオリゴヌクレオチド9を、第2プライマーとしてオリゴヌクレオチド10を、第3プライマーとしてオリゴヌクレオチド11を、第4プライマーとしてオリゴヌクレオチド12を使用した。

- 15 また、D遺伝子由来のcDNA断片の回収には、第1プライマーとしてオリゴヌクレオチド13を、第2プライマーとしてオリゴヌクレオチド14を、第3プライマーとしてオリゴヌクレオチド15を、第4プライマーとしてオリゴヌクレオチド16を使用した。

オリゴヌクレオチド5：

- 20 5'-aagtctgatacgaccegggtt-3'

オリゴヌクレオチド6：

5'-acgactgtagtccaagtaagt-3'

オリゴヌクレオチド7：

5'-tagcggcgcgaagtctgatacgaccegggtt-3'

- 25 オリゴヌクレオチド8：

5'-gaactagtaacgactgtagtccaagtaagt-3'

オリゴヌクレオチド9：

5'-aagtctgatacgaccegggtc-3'

オリゴヌクレオチド10：

5' -acgactgtagtccaagtaagg-3'

オリゴヌクレオチド 1 1 :

5' -tagcggccgcaagtctgatacgacccggtc-3'

オリゴヌクレオチド 1 2 :

5 5' -gaactagtaacgactgtagtccaagtaagg-3'

オリゴヌクレオチド 1 3 :

5' -aagtctgatacgacccggta-3'

オリゴヌクレオチド 1 4 :

5' -acgactgtagtccaagtaacg-3'

10 オリゴヌクレオチド 1 5 :

5' -tagcggccgcaagtctgatacgacccggta-3'

オリゴヌクレオチド 1 6 :

5' -gaactagtaacgactgtagtccaagtaacg-3'

次に、形質転換した大腸菌から、公知の手法により組換え体プラスミドを抽出した。このプラスミドの抽出は、複数個のコロニーについて行った。そして、抽出したそれぞれの組換え体プラスミドについて、組み込まれたcDNA断片の塩基配列を決定した。このような遺伝子解析を、遺伝子A～遺伝子D由来の各cDNA断片について同様に行った。その結果を表1に示す。なお、かっこ内の数値は、各cDNA断片の長さ（両アダプター配列を含む。）を表す。

【表 1】

	回収率 (%)
A 遺伝子 (202bp)	6 7
B 遺伝子 (314bp)	5 7
C 遺伝子 (130bp)	1 0 0
D 遺伝子 (209bp)	1 0 0

表1から明らかなように、A 遺伝子由来のcDNA断片の回収においては、
25 遺伝子解析を行った組換え体プラスミドのうち、約67%が目的とする
cDNA断片を含むものであった。また、B 遺伝子由来のcDNA断片の回収に

においては、遺伝子解析を行った組換え体プラスミドのうち、約57%が目的とするcDNA断片を含むものであった。また、C遺伝子由来のcDNA断片の回収においては、遺伝子解析を行った組換え体プラスミドのうち、100%が目的とするcDNA断片を含むものであった。同様に、D遺伝子由来のcDNA断片の回収においては、遺伝子解析を行った組換え体プラスミドのうち、100%が目的とするcDNA断片を含むものであった。

この結果から、本実施例の方法に従ってcDNA断片の群から目的とするcDNA断片を回収すれば、より確実に目的のcDNA断片を回収することができることが判る。

10 以上で説明したように、本実施例のDNA回収法によれば、選択したcDNA断片の群について予めPCR反応を行うので、そのcDNA断片の群を多量に増幅することができる。従って、目的とするcDNA断片が低濃度であっても、それを大幅に増幅することができ、ゲル電気泳動においてそれを検出することができる。

15 また、このPCR反応では、標識物質を有するプライマーを用いているので、PCR産物も標識物質を含むことになる。従って、目的とするcDNA断片が少なかったとしても、電気泳動においてこの標識物質を認識することで、目的とするcDNA断片のゲル中の位置を容易に検出することができる。

さらに、cDNA断片の群をゲル電気泳動によって分画するため、例えば20 キャピラリーカラムによる電気泳動に比べ、サイズ分解能を向上させ、目的とするcDNA断片のみをより特異的に回収することができる。

また、第1アダプター配列及び第2アダプター配列は、それぞれ15塩基前後としてあるので、安定したPCR反応を行い、効率よくcDNA断片を増幅することができる。

25 また、標識物質として、蛍光物質である近赤外蛍光色素IRD-800を使用しているので、ゲル電気泳動においてcDNA断片の検出感度を向上させることできる。

また、本実施例では、回収工程で回収したcDNA断片について、再度PCR反応を行う第2PCR工程を備える。このため、回収したcDNA断片が少量し

かなくても、それを大幅に増幅させることができる。

さらに、本実施例では、第 2 PCR工程後、cDNA断片をプラスミドベクターに連結し、組換え体プラスミドを形成する連結工程と、さらに、この組換え体プラスミドを大腸菌に導入する導入工程とを備える。このため、

5 cDNA断片の構造解析をする場合などに有効である。即ち、形質転換したその大腸菌を培養し、それからcDNA断片を有するプラスミドDNAを抽出すれば、これを容易に構造解析（例えば、塩基配列の決定）に用いることができる。

（実施例 2）

10 次いで、第 2 の実施例について説明する。なお、上記実施例 1 と同様な部分の説明は、省略または簡略化する。

上記の方法を用いて目的とするcDNA断片を回収しても、回収率のやや低いサンプルもあった（表 1 参照）。これは、目的のcDNA断片の量そのものが少ないためである。従って、目的のcDNA断片が存在する所のゲルの

15 みを正確に切り出すことができれば、他のcDNA断片の混入は少なくなり、目的のcDNA断片の回収率も向上するはずである。そこで、目的のcDNA断片の回収率の向上させるため、以下の方法を用いて実験を行った。

上記実施例 1 と同様にして第 1 PCR工程までの作業を行った。

そして、電気泳動工程において、上記実施例 1 と同様にアクリルアミドゲル電気泳動を行った。その後は、再度同一サンプルを電気泳動するのではなく、最初に電気泳動を行ったゲルについて、濾紙を使用してゲルをゲル板から剥がした。続いて、濾紙にくっついたゲルを蛍光色素の検出できるスキャナー上に載置し、ゲル全体をイメージ化した。そうすることにより、より低濃度のcDNA断片についても、そのcDNA断片を含むゲル

25 のみを正確に回収することができた。

回収工程後は、上記実施例 1 と同様にして、第 2 PCR工程と連結工程と導入工程を行った。

また、上記実施例 1 と同様に、形質転換した大腸菌から、公知の手法により組換え体プラスミドを抽出し、挿入されたcDNA断片の塩基配列を

決定した。このような遺伝子解析を、遺伝子 E 由来の cDNA 断片について同様にを行った。

5 なお、E 遺伝子由来の cDNA 断片の回収にあたり、サンプルには、上記 A～D 遺伝子を回収した cDNA 断片の群とは異なる cDNA の群を前述の方法により作成した。

また、サンプルとした cDNA 断片の群が異なることに伴い、第 1 プライマー～第 4 プライマーも、その塩基配列が若干異なるものを使用した。具体的には、第 1 プライマーとしてオリゴヌクレオチド 17 を、第 2 プライマーとしてオリゴヌクレオチド 18 を、第 3 プライマーとしてオリ
10 ゴヌクレオチド 19 を、第 4 プライマーとしてオリゴヌクレオチド 20 を使用した。

オリゴヌクレオチド 17 :

5' -aagtctgatacgaccggtta-3'

オリゴヌクレオチド 18 :

15 5' -acgaactgtagtccaagtaacg-3'

オリゴヌクレオチド 19 :

5' -tagcggccgcaagtctgatacgaccggtta-3'

オリゴヌクレオチド 20 :

5' -gaactagtaacgactgtagtccaagtaacg-3'

20 その結果、比較例として、実施例 1 と同様にして E 遺伝子由来の cDNA 断片を回収した場合には、遺伝子解析を行った組換え体プラスミドのうち、約 80% が目的とする cDNA 断片を含むものであった。これに対し、本実施例の方法により E 遺伝子由来の cDNA 断片を回収した場合には、遺
25 伝子解析を行った組換え体プラスミドのうち、約 100% が目的とする cDNA 断片を含むものであった。

この結果から、本実施例の方法に従って cDNA 断片の群から目的とする cDNA 断片を回収すれば、上記実施例 1 の方法に比べ、さらに確実に目的の cDNA 断片を回収することができることが判る。

また、その他、上記実施例 1 と同様な部分については、同様な効果を

奏する。

(実施例 3)

次いで、第 3 の実施例について説明する。なお、上記各実施例のいずれかと同様な部分の説明は、省略または簡略化する。

5 実施例 1 及び実施例 2 では、既知の遺伝子由来の cDNA 断片を回収して解析したが、本実施例では、未知の遺伝子由来の cDNA 断片を回収して解析する。未知の遺伝子由来の cDNA 断片を解析する場合、回収した cDNA 断片が目的のものであるか否かを判断するために、2 つの方法が考えられる。

10 即ち、1 つは、cDNA 断片の群をマーカーと共にゲル電気泳動した場合に目的とする cDNA 断片の長さと同様のマーカーの長さがあるなど、目的の cDNA 断片の長さが正確に判る場合には、回収して解析した cDNA 断片の長さから、それが目的の cDNA 断片か否かを判断する。

具体的には、上記各実施例 1, 2 と同様にして第 1 PCR 工程までの作業
15 を行った。その後、増幅された cDNA 断片の群について、アクリルアミドゲル電気泳動を行った。そして、分画された cDNA 断片のうち、200 bp の長さのマーカーにちょうど一致する 200 bp の長さ (両アダプター配列を含む。) の cDNA 断片に着目し、これを回収の目的とする cDNA 断片とした。その後、上記実施例 1 と同様にして、目的の cDNA 断片を回収した。

20 回収工程後は、第 2 PCR 工程を行った。本実施例では、PCR 反応液にさらに *E. coli* の RecA タンパク質をプライマー 20 pmol あたり、500 ng の割合で混合した。

その後は、上記実施例 1, 2 と同様に、連結工程と導入工程を行った。

25 なお、第 1 PCR 工程に用いた第 1 プライマーはオリゴヌクレオチド 21 からなり、第 2 プライマーはオリゴヌクレオチド 22 からなる。また、第 2 PCR 工程に用いた第 3 プライマーはオリゴヌクレオチド 23 からなり、第 4 プライマーはオリゴヌクレオチド 24 からなる。

オリゴヌクレオチド 21 :

5'-aagtctgatacgaccgggtt-3'

オリゴヌクレオチド 22 :

5'-acgactgtagtccaagtaagt-3'

オリゴヌクレオチド 23 :

5'-tagcggcgcgaagtctgatacgacccgggtt-3'

5 オリゴヌクレオチド 24 :

5'-gaactagtaacgactgtagtccaagtaagt-3'

次に、上記各実施例 1, 2 と同様に、形質転換した大腸菌から、公知の手法により組換え体プラスミドを抽出し、挿入された cDNA 断片の塩基配列を決定した。その結果、塩基配列の長さが 200 bp である場合には、
 10 目的の cDNA 断片であると判断し、塩基配列の長さが 200 bp でない場合には、目的の cDNA 断片ではないと判断した。また、比較例として、第 2 PCR 工程で RecA タンパク質を加えず、DNA ポリメラーゼ (KOD Dash) だけで PCR 反応を行い、その他の工程は上記と同様にした場合も、目的の cDNA 断片の回収率を調査した。

15 また、別の比較例として、第 2 PCR 工程で RecA タンパク質の代わりに *E. coli* の SSB タンパク質 (single strand DNA binding protein) を加えて PCR 反応を行い、その他の工程は上記と同様にした場合も、目的の cDNA 断片の回収率を調査した。

これらの結果を表 2 に示す。

20

【表 2】

	200bp断片の回収率
KOD Dash	8.30%
KOD Dash+SSB	<1%
KOD Dash+RecA	33.30%

表 2 から明らかなように、200 bp の cDNA 断片の回収においては、解析を行った組換え体プラスミドのうち、約 33.30% が目的とする cDNA
 25 断片を含むものであった。これに対し、第 2 PCR 工程で RecA タンパク質を加えなかった場合には、この回収率が約 8.30% まで低下した。また、

第2 PCR工程でRecAタンパク質の代わりにSSBタンパク質を加えた場合には、この回収率が1%以下にまで低下した。

この結果から、第2 PCR工程においてRecAタンパク質を加えることにより、目的とするcDNA断片の回収率を大幅に向上させることができることが判る。この理由は、RecAタンパク質を反応液に混合してPCRを行うと、
5 cDNA断片の収量を減少させることなく、副産物（非特異的なPCR産物）の増幅を低く抑えることができるためであると考えられる。

このように、本実施例では、第2 PCR工程において、RecAタンパク質を反応液に混合してPCRを行い、cDNA断片の群を増幅させる。このため、cDNA
10 断片の群の収量を減少させることなく、副産物（非特異的なPCR産物）の増幅を低く抑えることができる。即ち、上記の相同組み換えタンパク質が存在することにより、プライマーがcDNA断片の非特異的な領域に結合してプライマー伸長反応を起こすことが抑制されるため、非特異的なPCR産物の増幅を抑制することができる。

また、上記のように特異性が高いため、アニーリング温度等、プライマー伸長反応の温度条件を変えても、cDNA断片の群を特異的に増幅させることができる。即ち、従来のPCR方法では、アニーリング温度等、プライマー伸長反応の温度を低く設定すると、cDNA断片の群だけでなく、副産物も多量に増幅されることとなるが、本実施例によれば、cDNA断片の
20 群をより特異的に増幅させることが可能となる。

これらの結果、より確実に目的のcDNA断片を回収することができる。

さらに、本実施例では、RecAタンパク質を、プライマー20 pmolあたり、1 ng~1000 ngの範囲で混合しているため、より効率よく特異的に、cDNA断片を増幅することができる。

次に、未知の遺伝子由来のcDNA断片を回収して解析するもう一つの方法について説明する。cDNA断片の群をゲル電気泳動しても、目的とするcDNA断片の長さが正確には判らない場合には、回収して解析したcDNA断片の塩基配列に基づいて適当な一組のプライマーを作製し、RT-PCRにより解析したcDNA断片が目的のものであるか否かを判断する。

具体的には、上記各実施例 1, 2 と同様にして第 1 PCR 工程までの作業を行った。その後、増幅された cDNA 断片の群について、アクリルアミドゲル電気泳動を行った。そして、分画された cDNA 断片のうち、約 230 bp の長さ（両アダプター配列を含む。）の cDNA 断片に着目し、これを回収の目的とする cDNA 断片とした。その後、上記実施例 1 と同様にして、目的の cDNA 断片を回収した。

回収工程後は、第 2 PCR 工程を行った。

その後は、上記実施例 1, 2 と同様に、連結工程と導入工程を行った。

なお、第 1 PCR 工程に用いた第 1 プライマーはオリゴヌクレオチド 25 からなり、第 2 プライマーはオリゴヌクレオチド 26 からなる。また、第 2 PCR 工程に用いた第 3 プライマーはオリゴヌクレオチド 27 からなり、第 4 プライマーはオリゴヌクレオチド 28 からなる。

オリゴヌクレオチド 25 :

5'-aagtctgatacgacccgggt-3'

15 オリゴヌクレオチド 26 :

5'-acgactgtagtccaagtaagt-3'

オリゴヌクレオチド 27 :

5'-tagcgccgcaagtctgatacgacccgggt-3'

オリゴヌクレオチド 28 :

20 5'-gaactagtaacgactgtagtccaagtaagt-3'

次に、上記各実施例 1, 2 と同様に、形質転換した大腸菌から、公知の手法により組換え体プラスミドを抽出し、挿入された cDNA 断片の塩基配列を決定した。そして、回収率の高かった cDNA 断片の塩基配列に基づいて一組のプライマーを作製した。これらのプライマーは、オリゴヌクレオチド 29 とオリゴヌクレオチド 30 からなる。

オリゴヌクレオチド 29 :

5'-ccagcaacctacaacaaca-3'

オリゴヌクレオチド 30 :

5'-caactggtgcatcgcttcat-3'

次に、これらのプライマーを用いて、サンプルとした元のcDNA断片の群についてPCR反応を行った。また、比較例として、同一のサンプルについて、RecAタンパク質を加えず、DNAポリメラーゼ (KOD Dash) だけでPCR反応を行った。また、別の比較例として、同一のサンプルについて、RecA
5 タンパク質の代わりにSSBタンパク質を加えてPCR反応を行った。続いて、これらの反応物についてゲル電気泳動を行った。その結果を第6図に示す。

第6図から明らかなように、RT-PCRによる抽出断片の確認においても、PCR条件により良好な結果が得られる場合と、そうでない場合に分かれた。
10 即ち、レーン2に示すように、RecAタンパク質をPCR反応液に添加すると、目的のcDNA断片が特異的に増幅された。これに対し、レーン1に示すように、KOD Dash (DNAポリメラーゼ) のみでPCR反応を行った場合には、レーン全体がスミア状になり、目的のDNA断片のみを増幅させることができなかつた。また、レーン3に示すように、RecAタンパク質の代わりに
15 SSBタンパク質を添加した場合には、スミア状になることは改善されたが、エキストラバンドが見られた。このことは目的物以外のDNA断片の増幅が考えられる。

この結果から、RT-PCRによる目的とするcDNA断片の確認においても、RecAタンパク質を加えることにより、目的とするcDNA断片だけを特異的
20 に増幅させることができることが判る。また、回収したcDNA断片の確認にも効果がある。

以上において、本発明の実施の形態を実施例に即して説明したが、本発明は上記各実施例に限定されるものではなく、その要旨を逸脱しない範囲で、適宜変更して適用できることは言うまでもない。

25

産業上の利用可能性

以上の説明から明らかなように本発明によれば、様々な種類の cDNA断片が混在する cDNA断片の群から目的とする cDNA断片をより確実に回収することができる DNA回収法を提供することができる。

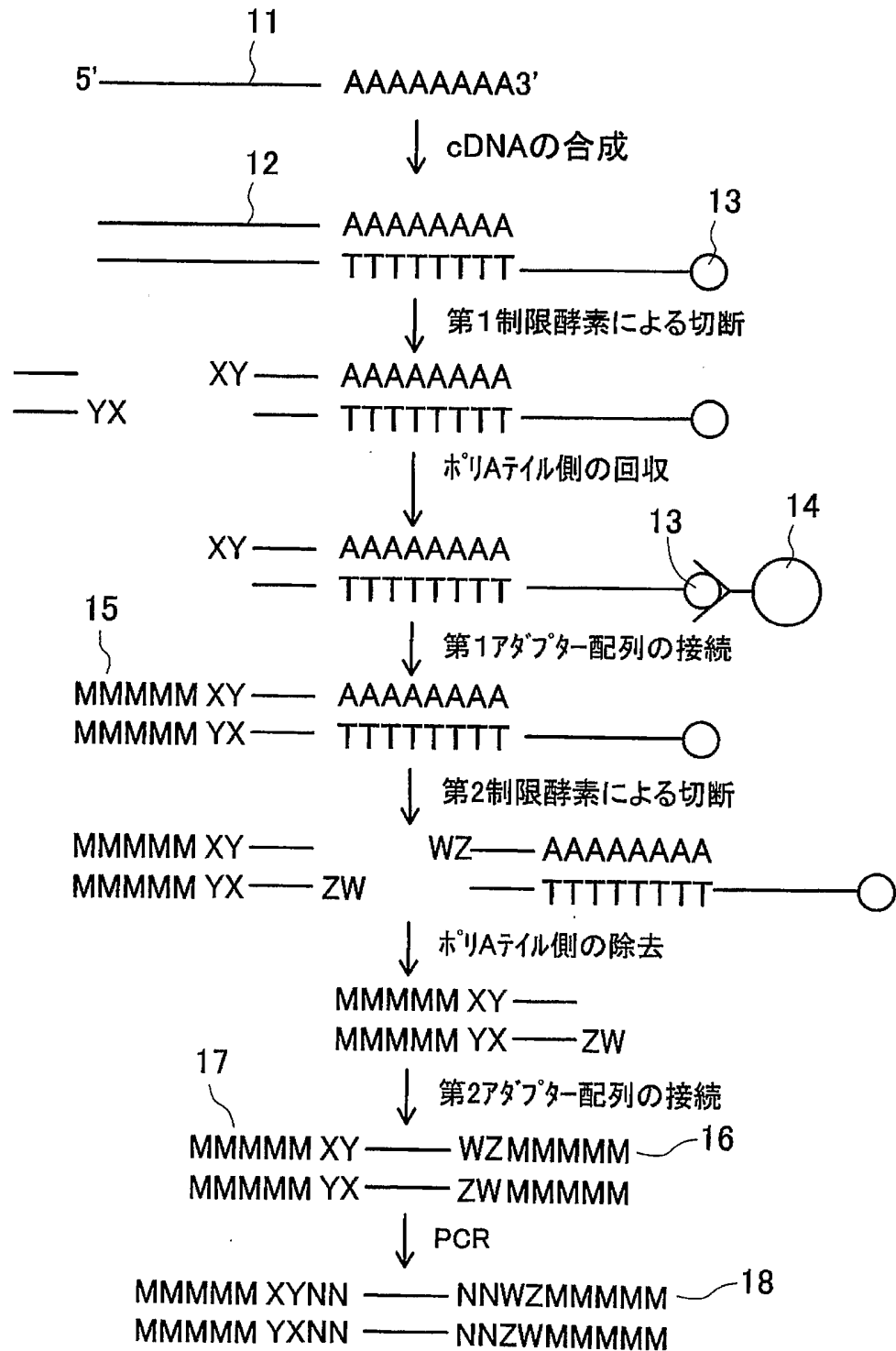
30

請求の範囲

1. 一端に第1アダプター配列を有し他端に第2アダプター配列を有するcDNA断片の群について、上記第1アダプター配列に相補的な配列を
5 有すると共に標識物質を有する第1プライマーと、上記第2アダプター配列に相補的な配列を有する第2プライマーとを用いて、PCR反応を行う第1PCR工程と、
上記第1PCR工程で増幅されたcDNA断片の群についてゲル電気泳動を行う電気泳動工程と、
- 10 上記電気泳動工程の結果に基づいて、ゲルから目的のcDNA断片を含むゲルを切り出し、当該cDNA断片を回収する回収工程と、
を備えることを特徴とするDNA回収法。
2. 請求項1に記載のDNA回収法であって、
前記回収工程で回収したcDNA断片について、前記第1アダプター配列
15 に相補的な配列を有する第3プライマーと、前記第2アダプター配列に相補的な配列を有する第4プライマーとを用いて、再度PCR反応を行う第2PCR工程を備える
ことを特徴とするDNA回収法。
3. 請求項2に記載のDNA回収法であって、
20 前記第2PCR工程において、RecAタンパク質及びこのRecAタンパク質を改変したタンパク質であってこのRecAタンパク質と類似する機能を有するRecA改変タンパク質の少なくともいずれかを含む相同的組換えタンパク質を反応液に混合して、PCRを行う
ことを特徴とするDNA回収法。
- 25 4. 請求項1～請求項3のいずれか一項に記載のDNA回収法であって、
前記回収工程後、または、前記第2PCR工程を有する場合には第2PCR工程後、前記cDNA断片をプラスミドベクターに連結し、組換え体プラスミドを形成する連結工程と、
上記組換え体プラスミドを大腸菌に導入する導入工程と、

を備えることを特徴とするDNA回収法。

第2図



第3A図 5'-CGGGTCGTATCAGACTTGCACA-3'
 3'- CCAGCATAGTCTGAACGTGT-5'

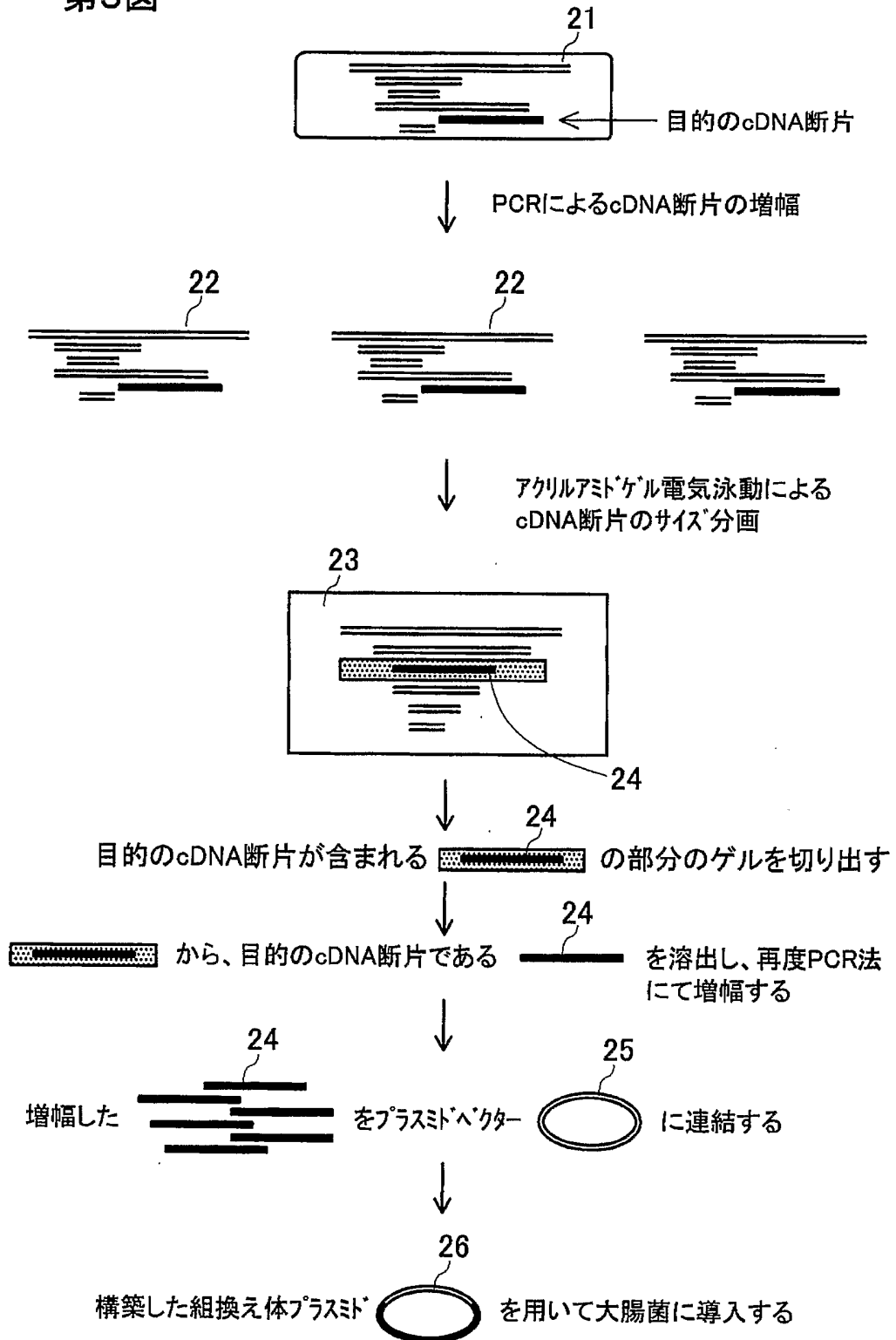
第3B図 5'-TACTTGGACTACAGTCGTGACA-3'
 3'- GAACCTGATGTCAGCACTGT-5'

第4A図 5'-AAGTCTGATACGACCCGGNN-3'

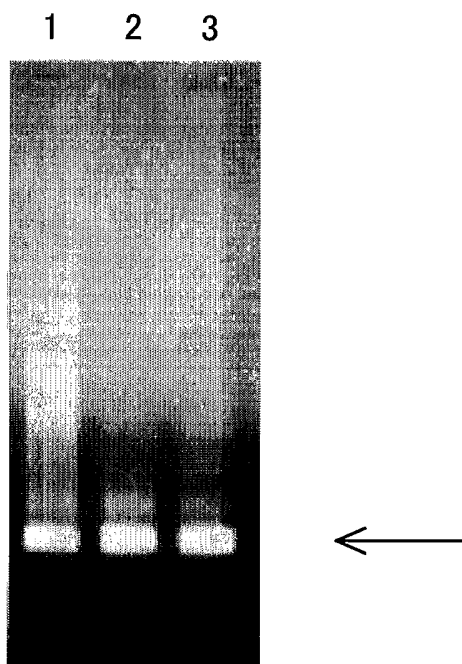
第4B図 5'-ACGACTGTAGTCCAAGTAANN-3'

4/5

第5図



第6図



レーン1:KOD Dashを使用したPCR産物
レーン2:KOD Dash+RecAを使用したPCR産物
レーン3:KOD Dash+SSBを使用したPCR産物

SEQUENCE LISTING

<110> AISIN SEIKI KABUSHIKI KAISHA
<120> method for recovering DNA
<130> A S O 3 0 1 - P C T
<160> 30
<210> 1
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> synthesize oligonucleotide by referring to first adapter sequence
<400> 1
aagtctgata cgaccggac 20
<210> 2
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> synthesize oligonucleotide by referring to second adapter sequence
<400> 2
acgactgtag tccaagtaata 21
<210> 3
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> synthesize oligonucleotide by referring to first adapter sequence and recognized sequence of
restriction enzyme Not I
<400> 3
tagcggccgc aagtctgata cgaccggac 30
<210> 4
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> synthesize oligonucleotide by referring to second adapter sequence and recognized sequence of
restriction enzyme Spe I
<400> 4
gaactagtaa cgactgtagt ccaagtaata 30
<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> synthesize oligonucleotide by referring to first adapter sequence
<400> 5
aagtctgata cgaccggatt 20
<210> 6
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> synthesize oligonucleotide by referring to second adapter sequence
<400> 6
acgactgtag tccaagtaagt 21
<210> 7
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> synthesize oligonucleotide by referring to first adapter sequence and recognized sequence of
restriction enzyme Not I
<400> 7
tagcggccgc aagtctgata cgaccggatt 30
<210> 8
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> synthesize oligonucleotide by referring to second adapter sequence and recognized sequence of
restriction enzyme Spe I
<400> 8
gaactagtaa cgactgtagt ccaagtaagt 30

<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> synthesize oligonucleotide by referring to first adapter sequence
<400> 9
aagtctgata cgaccggtc 20
<210> 10
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> synthesize oligonucleotide by referring to second adapter sequence
<400> 10
acgactgtag tccaagtaagg 21
<210> 11
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> synthesize oligonucleotide by referring to first adapter sequence and recognized sequence of
restriction enzyme Not I
<400> 11
tagcggccgc aagtctgata cgaccggtc 30
<210> 12
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> synthesize oligonucleotide by referring to second adapter sequence and recognized sequence of
restriction enzyme Spe I
<400> 12
gaactagtaa cgactgtagt ccaagtaagg 30
<210> 13
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> synthesize oligonucleotide by referring to first adapter sequence
<400> 13
aagtctgata cgaccggta 20
<210> 14
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> synthesize oligonucleotide by referring to second adapter sequence
<400> 14
acgactgtag tccaagtaacg 21
<210> 15
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> synthesize oligonucleotide by referring to first adapter sequence and recognized sequence of
restriction enzyme Not I
<400> 15
tagcggccgc aagtctgata cgaccggta 30
<210> 16
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> synthesize oligonucleotide by referring to second adapter sequence and recognized sequence of
restriction enzyme Spe I
<400> 16
gaactagtaa cgactgtagt ccaagtaacg 30
<210> 17
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> synthesize oligonucleotide by referring to first adapter sequence

<400> 17
aagtctgata cgaccggta 20
<210> 18
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> synthesize oligonucleotide by referring to second adapter sequence
<400> 18
acgactgtag tccaagtaacg 21
<210> 19
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> synthesize oligonucleotide by referring to first adapter sequence and recognized sequence of
restriction enzyme Not I
<400> 19
tagcggccgc aagtctgata cgaccggta 30
<210> 20
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> synthesize oligonucleotide by referring to second adapter sequence and recognized sequence of
restriction enzyme Spe I
<400> 20
gaactagtaa cgactgtagt ccaagtaacg 30
<210> 21
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> synthesize oligonucleotide by referring to first adapter sequence
<400> 21
aagtctgata cgaccggtt 20
<210> 22
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> synthesize oligonucleotide by referring to second adapter sequence
<400> 22
acgactgtag tccaagtaagt 21
<210> 23
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> synthesize oligonucleotide by referring to first adapter sequence and recognized sequence of
restriction enzyme Not I
<400> 23
tagcggccgc aagtctgata cgaccggtt 30
<210> 24
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> synthesize oligonucleotide by referring to second adapter sequence and recognized sequence of
restriction enzyme Spe I
<400> 24
gaactagtaa cgactgtagt ccaagtaagt 30
<210> 25
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> synthesize oligonucleotide by referring to first adapter sequence
<400> 25
aagtctgata cgaccgggt 20
<210> 26
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthesize oligonucleotide by referring to second adapter sequence
<400> 26
acgactgtag tccaagtaagt 21
<210> 27
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> synthesize oligonucleotide by referring to first adapter sequence and recognized sequence of
restriction enzyme Not I
<400> 27
tagcggccgc aagtctgata cgaccgggt 30
<210> 28
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> synthesize oligonucleotide by referring to second adapter sequence and recognized sequence of
restriction enzyme Spe I
<400> 28
gaactagtaa cgactgtagt ccaagtaagt 30
<210> 29
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> synthesize oligonucleotide by referring to sequence of about 230bp of recovered cDNA fragment
<400> 29
ccagcaacct acaacaaca 19
<210> 30
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> synthesize oligonucleotide by referring to sequence of about 230bp of recovered cDNA fragment
<400> 30
caactggtgc atgccttca t 21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/12214

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C12Q1/68, C12N15/09

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ C12Q1/68, C12N15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), JSTPlus (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 870842 A2 (JAPAN SCI. & TECHNOLOGY CORP.), 14 October, 1998 (14.10.98), & US 6090556 A & JP 10-337200 A	1-4
Y	Schlayer HJ. et al., Amplification of unknown DNA sequences by sequence-independent nested polymerase chain reaction using a standardized adaptor without specific primers., J.Virol. Methods.(1992), Vol.38, No.3, pages 333 to 341	1-4
$\frac{Y}{A}$	JP 09-220099 A (Kabushiki Kaisha Aishin Kosumosu Kenkyusho), 26 August, 1997 (26.08.97), (Family: none)	$\frac{3}{1, 2, 4}$

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
---	--

Date of the actual completion of the international search 07 November, 2003 (07.11.03)	Date of mailing of the international search report 25 November, 2003 (25.11.03)
---	--

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/12214

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<p>$\frac{Y}{A}$</p>	<p>JP 10-234398 A (Kabushiki Kaisha Aishin Kosumosu Kenkyusho), 08 September, 1998 (08.09.98), (Family: none)</p>	<p>$\frac{3}{1, 2, 4}$</p>

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁷ C12Q1/68, C12N15/09		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁷ C12Q1/68, C12N15/09		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), JSTPlus (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	EP 870842 A2 (JAPAN SCI & TECHNOLOGY CORP) 1998. 10. 14 & US 6090556 A & JP 10-337200 A	1-4
Y	Schlayer HJ, et. al., Amplification of unknown DNA sequences by sequence-independent nested polymerase chain reaction using a standardized adaptor without specific primers., J Virol Methods. (1992), Vol. 38, No. 3, p. 333-341	1-4
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	07. 11. 03	国際調査報告の発送日
		25.11.03
国際調査機関の名称及びあて先	特許庁審査官 (権限のある職員)	4N 9839
日本国特許庁 (ISA/JP)	鈴木 美葉子	印
郵便番号 100-8915		
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	電話番号 03-3581-1101	内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>Y</u> A	JP 09-220099 A(株式会社アイシン・コスモス研究所)1997.08.26 (ファミリーなし)	<u>3</u> 1、2、4
<u>Y</u> A	JP 10-234398 A(株式会社アイシン・コスモス研究所) 1998.09.08 (ファミリーなし)	<u>3</u> 1、2、4