

マウスモノクローナル抗体の cDNA 配列決定

このプロトコルは SMARTer5'/3'RACE キットを使うために、Meyer et al.(2019) PLoS ONE を改良してある。

参考文献

A simplified workflow for monoclonal antibody sequencing
Lena Meyer, Tomás López, Rafaela Espinosa, Carlos F. Arias, Christopher Vollmers, Rebecca M. DuBois (2019) PLoS ONE
<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0218717>

必要なもの

マウスハイブリドーマ

ラットなどのハイブリドーマでやる場合は、プライマーの配列が変わると思われる

ハイブリドーマ培地

凍結から起こすときは RPM1640+10%FBS。

増幅が確認できたら、無血清培地でよい。いきなり無血清培地で溶解すると死んだ。

Nucleospin RNA (Takara)

SMARTer 5'/3' RACE キット (Takara)

プライマーは SMARTer キット付属のものに加えて以下の6本を準備

逆転写用プライマー

Kappa_RT TTGTCGTTCACTGCCATCAATC

Lamda_RT GGGGTACCATCTACCTTCCAG

IGG_HC_RT AGCTGGGAAGGTGTGCACAC

PCR 用プライマー

infusion でクローニングするために

リンカー配列(5'-GATTACGCCAAGCTT-3'。下線) が付加してある。

Kappa_PCR, GATTACGCCAAGCTT ACATTGATGTCTTTGGGGTAGAAG

Lamda_PCR, GATTACGCCAAGCTT ATCGTACACACCAGTGTGGC

IGG_HC_PCR, GATTACGCCAAGCTT GGGATCCAGAGTTCCAGGTC

手順

細胞の回収

1. ハイブリドーマを T175 の入れ物 (培地 50ml) で培養する。
2. 良い感じに増えたら遠心して培地を捨てる。
注意：ハイブリドーマは増えすぎるといきなり死滅するから注意。
3. 培地を完全に捨てるためにもう一度軽く遠心して残った培地を P1000 か P200 のピペットで完全に捨てる。
4. 細胞は-80°Cで凍結保存しておく。

RNA の精製

Nucleospin RNA キットを使って RNA を精製する。マニュアルに書いてある通りやれば良いので省略。

cDNA の合成

SMARTer キットを用いて行うが、確実に IgG 遺伝子をとるために逆転写用のプライマーは自分で準備した (上記)。

3種の逆転写用プライマーを用いて逆転写反応を行う。

重鎖は共通だが、軽鎖は kappa か Lamda か不明なので、3種類の逆転写プライマーを用いる。

1. RNA を混ぜる。逆転写プライマー3種類について準備

10 ul	RNA+DDW(<small>Total RNA を 1ug 程度入れたがこんなにいらなと思う</small>)
1 ul	12 uM 逆転写プライマー(どれか一つ)
<hr/>	
11 ul	Total

2. 2を72度 3分処理

3. SMARTer II A オリゴヌクレオチドを 1ul ずつ加える

4. バッファーミックスを作る (3回分)。

15 ul	5x First-Strand Buffer
1.9 ul	DTT (100mM)
1.3 ul	dNTP
2 ul	RNase inhibitor
8 ul	SMARTScribe 逆転写酵素

5. 3のチューブに8ul ずつ4を加える。

6. 42度で90分

7. 逆転写産物に Tricine-EDTA を 90ul 入れて希釈する。

PCR

キットに付属の酵素でPCRしてもよいが、使い慣れている KOD FX neo でやった。エラーを減らすためにサイクル数は15程度に抑える。

プライマーは UPM primer (キットに付属) とリンカー付 PCR 用プライマー。

KOD FX neo の 2x バッファー	25ul
x10 ユニバーサルプライマーミックス	5ul
それぞれの cDNA のプライマー(50uM)	1ul
template	1ul
DDW	17ul

KOD FX neo

1ul

HC のバンドと kappa または Lamda の 800bp 程度のバンドが得られる。H2 の場合は kappa chain の増幅が見られた。

in-fusion によるベクターへの挿入とシーケンス

SMARTer 5'/3' RACE キットのマニュアルに書いてあるとおりにやればよいので省略。