

# PCR (Polymerase Chain Reaction) を用いたイネ種子一粒の組織からのcDNA library構築

田中國介・杉山義宣

KUNISUKE TANAKA and YOSHINORI SUGIYAMA

## Construction of cDNA library from a single rice grain using PCR (Polymerase Chain Reaction)

**要旨:** 通常、植物のcDNAライブラリー構築には数十～数百グラムの材料を必要とし、器官レベルまでの構築が限界であった。本研究では、PCR法を用いイネ種子一粒を出発材料にして組織、細胞レベルのcDNAライブラリー構築を目指した。

その結果、登熟イネ種子の三分の一相当から得たアリューロン層、デンプン性胚乳に対応するcDNAライブラリーを構築することが出来た。胚乳ライブラリーからは1.3kbpのグルテリンcDNAクローン、0.6kbpの全長プロラミンcDNAクローンの存在を確認した。同様に、アリューロン層cDNAライブラリーからは数種のアリューロン層特異的クローンを得ることができた。これらのことより、この方法を用い組織、細胞レベルでの遺伝子発現機構が厳密に調査可能であることが判った。

### 緒 言

遺伝子の構造やその発現機構を解明するためには、まずその発現部位である器管や組織などの特異的cDNA library (発現library) を構築することが最も基本的なstepの一つとなる。従来法では、cDNA合成に関わる試料の量的な制約から、種子、葉、茎、根などの器官特異的cDNA libraryの構築が通常の限界であった。しかし、それぞれ分化した組織、細胞個有の機能、言い換えれば分化した組織、細胞特異的に発現する遺伝子の構造やその発現機構を解明するには、その組織、細胞に対応する特異的cDNA library構築が必要である。このような組織、細胞levelのcDNA library構築には、得られる材料が微量なため大量の材料を必要とする従来の構築法は適用出来ない。

イネ科種子の胚乳組織では、starchや貯蔵proteinでprolamin、glutelinなどが集積するstarchy胚乳細胞と発芽時に $\alpha$ -amylaseをgibberellinに呼応して分泌し、またphosphorusや金属元素などのmineral、脂質が集積するaleurone細胞とに分化している<sup>1)</sup>。

両細胞へ登熟期において分化する機構を明らかにするために、PCRをcDNAの増幅に応用し、イネ種子一粒から得たAleurone組織からcDNA libraryを構築する手法の詳細を述べる。また、同一の手法を用い、イネ種子一粒から得たstarchy胚乳細胞についてcDNA libraryを構築し、既に解析を終了しているprolamin、glutelin cDNA cloneの存在割合を、従来法により構築した開花後22日目イネ種子cDNA libraryと比較した。その結果、今回構築したcDNA libraryはより胚乳組織での遺伝子発現の様子を正確に反映していることが明らかとなった。また、aleurone層特異的cDNA lib-

raryから任意にpick upした12ケのcloneのうち6ケはaleurone層特異的に発現している遺伝子で、そのcDNAの長さは主に200~400bpであることが、aleurone層 mRNAとstarchy胚乳 mRNAに対するNorthern hybridization analysisの結果より明らかとなった。以上の結果よりPCRを用いるcDNA library構築法は植物における組織・細胞特異的遺伝子発現機構解明に有用であることが示された。

## 材料および方法

### 1. 材料

イネ種子: *Oryza sativa*, L. (cv 日本晴) を京都府立大学実験農場で栽培し開花後19日目に採取し液体窒素に6ヶ月保存したイネ種子を用いた。

### 2. 試薬

Oligotex-dT30, reverse transcriptase (RAV-2), terminal deoxynucleotidyl transferase, Taq DNA polymerase, T4 DNA polymerase, T4 polynucleotide kinase, T4 DNA ligaseは、TAKARAより、低融点 agarose (Seaplaque GTG Agarose) はFMC BioProductsより、poly I・polyC, poly(dA, dT) はPharmacia LKB Biotechnologyより、SELECT 5Lは5Prime → 3Prime, Inc. より購入した。(T), (C) primer, oligonucleotide adaptorはABI 750Aを用いて合成した。

### 3. 器具

PCRは、ZYMOREACTOR (ATTO) で行なった。電気泳動はMupid-2 (Cosmo Bio) を使用した。

### 4. 方法

#### 1) Preparation of total RNA from an aleuron layer

- ①イネ種子一粒を液体窒素で凍っている状態でカミソリにより輪切り、3等分する。その真中の部分をシャーレに入れる。その中にはgrinding buffer (100mM Tris-HCl pH 9.0, 100mM NaCl, 1% SDS) 0.1~1.0mlが入っている。
- ②実体顕微鏡下で稃殻と表皮をピンセットではずし捨てる。次に、aleurone層のみ (0.1~1mg F.W.) を剥がし、上記 grinding buffer 200  $\mu$ l, 2-mercaptoethanol 20  $\mu$ l, phenol/Tris 100  $\mu$ l入りの氷冷してある1.5ml tubeに入れる。
- ③ガラス棒でhomogenizeした後1min vortexし、chloroformを100 $\mu$ l加え30sec vortexし氷上に10min置く。
- ④15,000 $\times$ g, 5min 遠心し上清を新しい1.5ml tubeに移す。界面に白い沈殿がなくなるまで phenol抽出を3回繰り返す。液量を200  $\mu$ lにする。

- ⑤上清200  $\mu$ lに5M NaCl 5  $\mu$ l, EtOH 600  $\mu$ l加え、よく混ぜ、氷上に30min置く。
- ⑥15,000 $\times$ g 15min 遠心し沈殿を回収する。
- ⑦80% EtOHで洗浄し、スピードバックで乾燥する。
- ⑧Oligotex-dT30 用 elution buffer (10mM Tris-HCl pH7.5, 1mM EDTA, 0.1% SDS) 40  $\mu$ lに溶かす。

#### 2) Isolation of poly(A)<sup>+</sup>RNA

- ①Total RNA sampleを65 $^{\circ}$ C 5min incubateした後、素早く氷上に置きRNAのaggregationをほどく。
- ②5M NaCl 5  $\mu$ l, Oligotex-dT30 10  $\mu$ lを加え、37 $^{\circ}$ C 10min incubateする。
- ③15,000 $\times$ g 10min遠心し、上清を捨てる。沈殿にelution buffer 50  $\mu$ l, 5M NaCl 5  $\mu$ l加え、よく懸濁し37 $^{\circ}$ C 5min incubateする。
- ④15,000 $\times$ g 10min遠心分離し上清を除き、沈殿をelution buffer 40  $\mu$ lに懸濁する。
- ⑤65 $^{\circ}$ C 5min incubateした後、15,000 $\times$ g 10min遠心し上清を新しい1.5ml tubeにとる。
- ⑥2, 3, 4, 5の操作を2回繰り返す。
- ⑦Elution bufferでvolumeを100  $\mu$ lにする。Oligotex-dT30を完全に除くためにphenol抽出を2回行なう。
- ⑧上清にpoly I・polyC 1  $\mu$ g, 3M sodium acetate 10  $\mu$ l, EtOH 300  $\mu$ l加え、氷上に30min置く。
- ⑨15,000 $\times$ g 20min遠心し、沈殿を20  $\mu$ lの3M sodium acetateに溶解する。EtOH 60  $\mu$ lを加えよく混合し、ethanol沈殿を行ない、5  $\mu$ lのH<sub>2</sub>Oに溶解する。

#### 3) First strand synthesis

- ①Poly(A)<sup>+</sup>RNAを鋳型とし、50mM Tris-HCl pH 8.3, 50mM KCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 3mM DTT, dNTP mixture (1mM of each dNTP), 40pmoles (T) primer, 20units RNasin, 15units RAV reverse transcriptase, 15  $\mu$ lの反応系で室温5 min, 42 $^{\circ}$ C 1hrの逆転写反応を行なう。(Fig. 1)
- ②Stop solution (100mM NaCl, 40mM EDTA) を16  $\mu$ l加え、反応を停止する。

#### 4) Removal of (T) primer

- ①Single-stranded cDNA (31  $\mu$ l)に10% CTAB 1.88  $\mu$ lを加えよく混ぜ、室温に15 min置く。
- ②15,000 $\times$ g 15min遠心し、上清を除く。
- ③沈殿を14  $\mu$ lの1M NaClに溶解する。H<sub>2</sub>O 25  $\mu$ l, 10%CTAB 1  $\mu$ l加え、室温に15min置く。
- ④15,000 $\times$ g 15min遠心し、上清を除く。
- ⑤沈殿を20  $\mu$ lの1M NaClに溶かす。EtOH 54  $\mu$ l加え、氷上に30min置く。
- ⑥15,000 $\times$ g 20min遠心し、上清を除く。

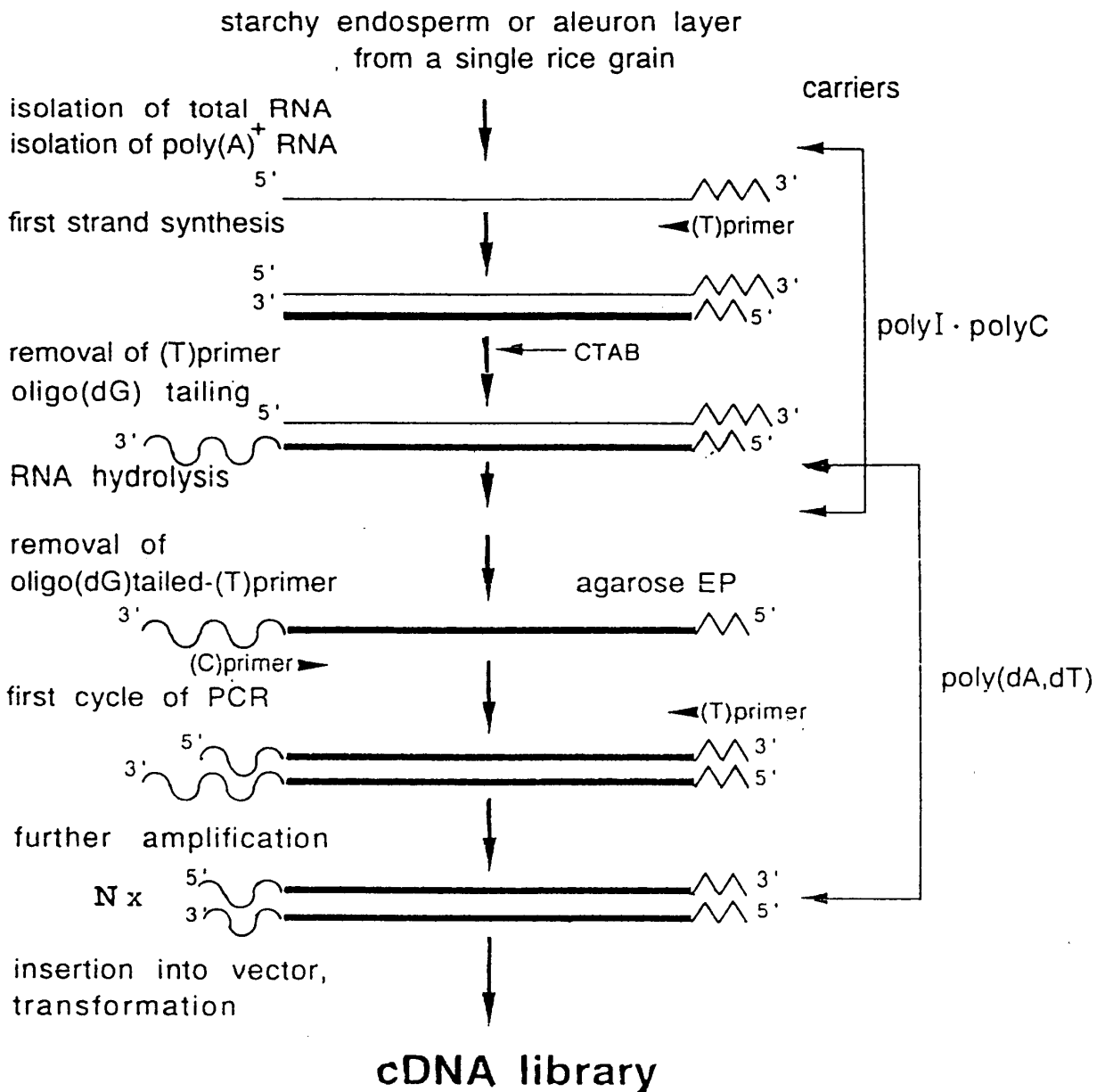


Figure 1.

Scheme of PCR-based cDNA Library Construction

(T) primer: 5'GGGAGGCCCTTTTTTTTTTTTTTTT3'

(C) primer: 5'AAGGAATCCCCCCCCCCCC3'

CTAB: cetyltrimethylammonium bromide

⑦80% EtOHで沈殿を洗浄し、スピードバックで乾燥する。

⑧5  $\mu$ lの H<sub>2</sub>Oに溶解し、-20℃に保存する。

5) Oligo(dG) tailing and RNA hydrolysis

①Single-strand cDNA preparationを、20  $\mu$ lの反応系 (100mM sodium cacodylate pH 7.2, 4mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1mM DTT, 25nM dGTP, 10units terminal deoxynucleotidyl transferase) で 37℃ 30minの oligo(dG) tailing反応を行なう。

②EDTAを 20mM, NaClを100mMになるように加え、反応を停止する。

③CTABを 0.4%になるように加え、cDNAを沈殿として回収する。

④沈殿を 20  $\mu$ lの 1M NaClに溶解し、poly(dA, dT)を 250ng加え、ethanol沈殿でcDNAを回収する。

⑤沈殿を 20  $\mu$ lの RNA hydrolysis solution (50mM NaOH, 2mM EDTA) に溶解し65℃で1hr incubateする。

⑥3M sodium acetate pH 5.2を 3  $\mu$ l加えて、中和し、

EtOH 70  $\mu$ l 加え ethanol沈殿を行なう。

⑦沈殿を 80% EtOH で洗浄、乾燥し、5  $\mu$ l の H<sub>2</sub>O に溶解し、BPB を 1  $\mu$ l 加え、次の操作の sample とする。

6) Removal of oligo (dG) tailed- (T) primer by electrophoresis

①1% の低融点 agarose gel を作製する。

②cDNA の agarose gel への非特異的吸着を避けるために、sample を apply する lane に poly (dA, dT) を 125ng apply し 20min prerun を行なう。

③sample を加え、1 lane あけて分子量 marker を通常の 2 倍量加える。CV (定電圧) 50V で約 1.5hr 電気泳動する。

④marker を加えた lane と試料を加えた lane とに切り離し marker 部分のみを EtBr で染色する。

⑤marker をたよりに 400bp 以下の領域を切り離し、捨てる。

⑥先と反対方向に 1.25hr 電気泳動する。

⑦marker をたよりに 400bp ~ 4kbp の領域を切り出し、1.5ml tube に移す。

⑧3 倍量の TE buffer を加え、65°C 10min incubate し gel を溶かす。

⑨室温に戻し、等量の phenol/Tris を加え vortex を 1min 行ない、氷上に 10min 置く。

⑩15,000  $\times$  g 5min 遠心し、上清を新しい 1.5ml tube に移す。

⑪通常の phenol 抽出を行なう。

⑫ethanol 沈殿で cDNA を回収する。

⑬80% EtOH で洗浄、乾燥し、10  $\mu$ l の H<sub>2</sub>O に溶解する。

7) Amplification by PCR<sup>21,31)</sup>

①Oligo (dG) 付加した一本鎖 cDNA を、10mM Tris-HCl pH 8.3, 50mM KCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01% gelatin, dNTP mixture (0.2mM each of dNTP), 80 pmoles (T) primer, 80 pmoles (C) primer, 2.5units Taq DNA polymerase, 100  $\mu$ l の反応系で、94°C 2min, 60°C 2min, 72°C 4.5min, 25cycles の PCR を行なう。表層は mineral oil で覆う。

②PCR 終了後、水層を 1.5ml tube にとり、phenol 抽出、ethanol 沈殿を行ない増幅された cDNA を回収する。

③洗浄、乾燥し、5  $\mu$ l の H<sub>2</sub>O に溶解する。

④1% の低融点 Agarose gel で電気泳動を行なう。(CV 100V, 30min) (Fig. 2)。

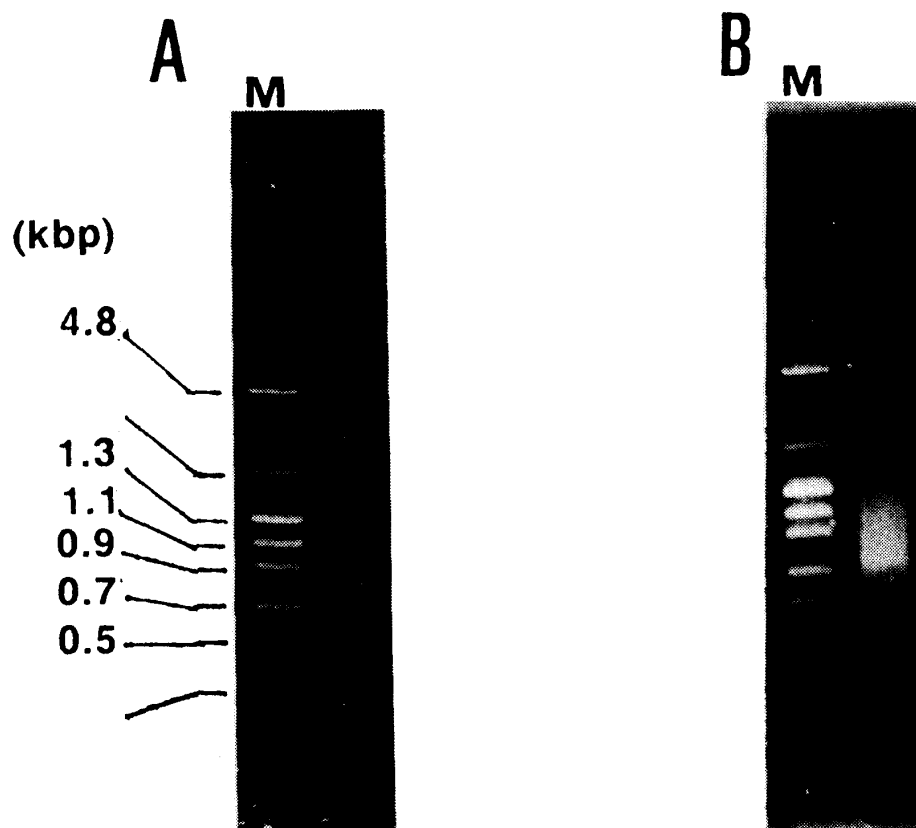


Figure 2.

Agarose gel electrophoreses of the cDNA preparations.

A. A cDNA preparation before size selection after amplification by PCR. 1% agarose was used. lane M. Size marker

B. A cDNA preparation amplified after size selection. Conditions are same as for A.

- ⑤10  $\mu\text{g/ml}$ のEtBr染色液にgelを入れ、10min染色する。
- ⑥cutter knifeで400bp以下の領域を切り離して除く。  
400bp~4kbpの領域をcutter knifeで6等分し、それぞれ1.5ml tubeにとる。
- ⑦65°C 10min incubateしgelを溶解し、それぞれ10  $\mu\text{l}$ をPCRのtemplateとして用い、先と同様の条件でPCRを行なう。
- ⑧水層100  $\mu\text{l}$ を1.5ml tubeにとり phenol/Trisを100  $\mu\text{l}$ 加え、1min vortexし、氷上に10min置く。
- ⑨15,000 $\times$ g 5min遠心し上清を新しい1.5ml tubeにとる。
- ⑩phenol抽出、ethanol沈殿でcDNAを回収する。
- ⑪洗浄、乾燥し、適当量のH<sub>2</sub>Oに溶解し、少量を電気泳動にかけ結果を見る。
- 8) Removal of primers and size selection of PCR products
- ①cDNA soln. をH<sub>2</sub>Oで63  $\mu\text{l}$ にvolume upし、1M NaCl 7  $\mu\text{l}$ , 10%CTAB 2.8  $\mu\text{l}$ 加え、室温に10min置く。
- ②15,000 $\times$ g 10min遠心し、上清を除く。沈殿を14  $\mu\text{l}$ の1M NaClに溶解した後、H<sub>2</sub>O 25  $\mu\text{l}$ , 10%CTAB 1  $\mu\text{l}$ 加え室温に10min置く。
- ③15,000 $\times$ g 10min遠心し、上清を除き、沈殿を20  $\mu\text{l}$ の1M NaClに溶解する。EtOH 60  $\mu\text{l}$ 加え、ethanol沈殿を行なう。
- ④洗浄、乾燥し、25  $\mu\text{l}$ のTE bufferに溶解する。
- ⑤SELECT 5Lによるgelろ過を行ない、250bp以下のcDNA及びoligo (dG) 付加された (T) primerを除く。
- ⑥ethanol沈殿でcDNAを回収する。
- ⑦10  $\mu\text{l}$ のH<sub>2</sub>Oに溶解する。

- 9) Generation of cohesive ends and phosphorylation
- ①約2  $\mu\text{g}$ のcDNAを50mM Tris-HCl pH8.8, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM DTT, 100  $\mu\text{M}$  dATP, 100  $\mu\text{M}$  dGTP, 2 units T4 DNA polymerase, 50  $\mu\text{l}$ の反応系で、37°C 20min incubateし、末端修飾を行なう。
- ②phenol抽出、ethanol沈殿を行ないcDNAを回収し、5  $\mu\text{l}$ のH<sub>2</sub>Oに溶解する。
- ③末端修飾したcDNAを、66mM Tris-HCl pH7.6, 6.6mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM DTT, 0.5mM ATP, 20units T4 polynucleotide kinase, 20  $\mu\text{l}$ の反応系で、37°C 30min incubateし、5'末端のphosphorylationを行なう。
- ④65°C 5min処理し酵素を失活させ、-20°Cに保存する。
- 10) Preparation of vector
- ①Plasmid vector (Bluescript SK+) 20  $\mu\text{g}$ を制限酵素 EcoR I, Xba I で消化し、electro elutionにより回収する。
- ②Oligonucleotide adaptor, 500 pmoles を、50mM Tris-HCl pH7.5, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM DTT, 0.1  $\mu\text{M}$  ATP, 20units T4 polynucleotide kinase, 50  $\mu\text{l}$ の反応系で、37°C 1hrのphosphorylationを行なう。
- ③65°Cの恒温槽に10min入れ酵素を失活させた後、恒温槽のスイッチを切り室温に下がるまで放置し、annealingさせる。
- ④上記vectorとadaptorを、66mM Tris-HCl pH7.6, 6.6mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM DTT, 0.5mM ATP, 1,400units T4 DNA ligase, 100  $\mu\text{l}$ の反応系で、16°C 18hrのligation反応を行なう。
- ⑤Electroelutionでadaptorを付加したvectorを回収し、30  $\mu\text{l}$ のTE bufferに溶解する。(Fig. 3)

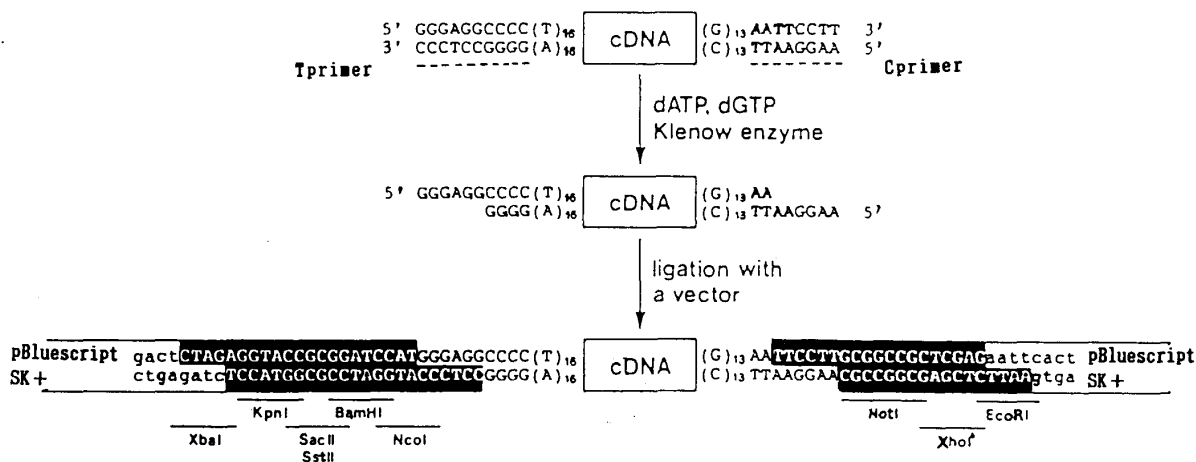


Figure 3.

Scheme of cDNA insertion into the vector. cDNA was treated with Klenow enzyme to produce 6 bases long cohesive ends, and ligated with a compatible vector, prepared by ligation of double stranded adaptor oligonucleotides (shown in black boxes) with XbaI/EcoRI-digested pBluescript SK+ plasmid.

## 11) Ligation and Transformation

- ①まず、test ligationを行う。Vectorに対するcDNAの比率を変え、66mM Tris-HCl pH 7.6, 6.6mM MgCl<sub>2</sub> 10mM DTT, 0.5mM ATP, 350units T4 DNA ligase, 20  $\mu$ lの反応系で、16°C, 18hrのligation反応を行う。
- ②phenol抽出、ethanol沈殿でcDNAを回収し、5  $\mu$ lの水に溶かす。
- ③2  $\mu$ lをelectro transformation<sup>11)</sup>により宿主MV1184を形質転換する。
- ④ $1 \times 10^5$  CFU/ml以上のtiterになるようにscale upし、先と同様にligation 反応と形質転換を行なう。

## 12) Amplification of plasmid library

- ①滅菌したnitrocellulose filterをLB-Amp<sup>r</sup> plateにのせ、完全に湿ったらfilterを裏返し再びplateにのせる。Plateとfilterの間に空気が入らないように注意する。
- ②Plate一枚当たり50,000 colonies/500  $\mu$ lになるように計算し、LB mediumでplasmidを調整する。
- ③spreaderを用いてbacteria suspension 500  $\mu$ l (50,000 colonies) をfilter上に均一にまき、数分間シャーレの蓋を半分ほど開けておき余分な水分を蒸発させる。
- ④Plateをひっくり返して37°Cで8~10時間培養する。Over growはさける。Colonyの直径がおよそ0.1~0.2mmになったところで培養を止める。
- ⑤LB mediumをplate一枚につき4ml加え、spreaderを用いてcolonyをこすりとり bacteria suspensionとする。
- ⑥ピペットマンでbacteria suspensionを回収し、CORNING 50ml tubeに集める。60% glycerolをfinal conc. 15%になるように加えよく混ぜる。
- ⑦一部をとってtiterを測り、残りは2mlずつCORNING 2ml vialに分注し-80°Cに保存する。この状態で少なくとも一年間は全く安全である。

## 結果および考察

イネ種子一粒のaleurone層からでも約1  $\mu$ g程度のtotal RNAが得られる。poly(A)<sup>+</sup>RNAまで精製するとethanol沈殿によるlossが懸念されるので、carrierとしてpolyI・polyCを用いた。一方、poly(A)<sup>+</sup>RNAの精製は少量のsampleを1.5ml tubeを用いて扱えるoligotex-dT30はこの操作にとってうまく機能した。

cDNA合成、primerの除去、oligo(dG) tailing、RNAの加水分解、amplificationは基本的にはA. Belyavsky et al.<sup>3)</sup>の方法に従って行なった。しかしCTABだけでは完全にprimerを除去できず、oligo(dG) tailingされ

た(T) primerが、contaminateすると、PCRにより強く増幅されligation反応でvectorに組み込まれ高いbackgroundを生む原因となった。このことからPCRを行なう前に、agarose gel電気泳動によりprimerを除き、更にPCR後SELECT 5Lを用いたgelろ過を行なった。この結果、agarose gel電気泳動levelで完全に250bp以下のcDNAが検出されない程度にsize selectionすることが可能であった。

イネ種子aleurone層特異的cDNA libraryのAmplificationを行なう前の段階で組換え体100万からなるaleurone層特異的libraryを構築出来た。その平均鎖長は350bpのcDNAが組み込まれていることを確認した。一方、このlibraryによりrandomに12cloneをpick up (AL 1, 2, 3, 6, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16) し、その塩基配列を調べた。その結果、AL1とAL6は長さは異なるが同一のcDNAであった。また、data baseでhomology searchをかけたところ、AL12は glutelin cDNA、AL16はprolamin cDNAであることが判明した以外、同定に結びつくようなdataは得られなかった。

一方、イネ種子からaleurone層、starch性胚乳を分離し、それぞれからRNAを調整し、電気泳動にかけNorthern分析を行なうことにより、AL 1, 6, 11, 13, 14, 15はaleurone層特異的に (Fig. 4) AL 9, 10は両方の組織に発現していることが明らかとなった。AL 2, 3に関しては検出できなかった。このようにPCR法によって構築したcDNA libraryは登熟種子組織特異的に発現し2kbp程度までのfull length cDNA cloningに充分実用可能なことを示すことが出来た。なお、それ以上の長いcDNAのcloningは原理的に従来のGubler-Hoffman法等を用いる方が有利と考えられるが、組織特異的に発現するcDNA配列のprobeを獲得するためには十分であり極めて微量の植物組織 (0.1mg新鮮量) からでもcDNA library構築が可能であることが示されたことは重要である。一方、ここで示したPCR法により構築した胚乳組織 cDNA library 中でのRM7, RG1, RG5の存在割合を調べたところ、それぞれ7%, 3%, 1%であり、これまでに構築したイネ種子cDNA library中に占めるこれらの配列の割合よりも3~5倍高い値を示した (Table 1)。これには2つの理由が考えられる。その一つは、従来のoligo(dT) cellulose columnの代わりにoligotex-dT30を用いた事によりpoly(A)<sup>+</sup>RNAの精製が改善されたこと。もう一つは、これまでに比べ胚乳組織のみを含む組織を材料としたlibraryのために相対的に貯蔵protein遺伝子の発現に基づくmRNAの存在割合が増えたものと考えられる。即ち、従来法により構築したlibraryと比べより胚乳組織の遺伝子発現の様子を正確に反映しているものと考えられる。

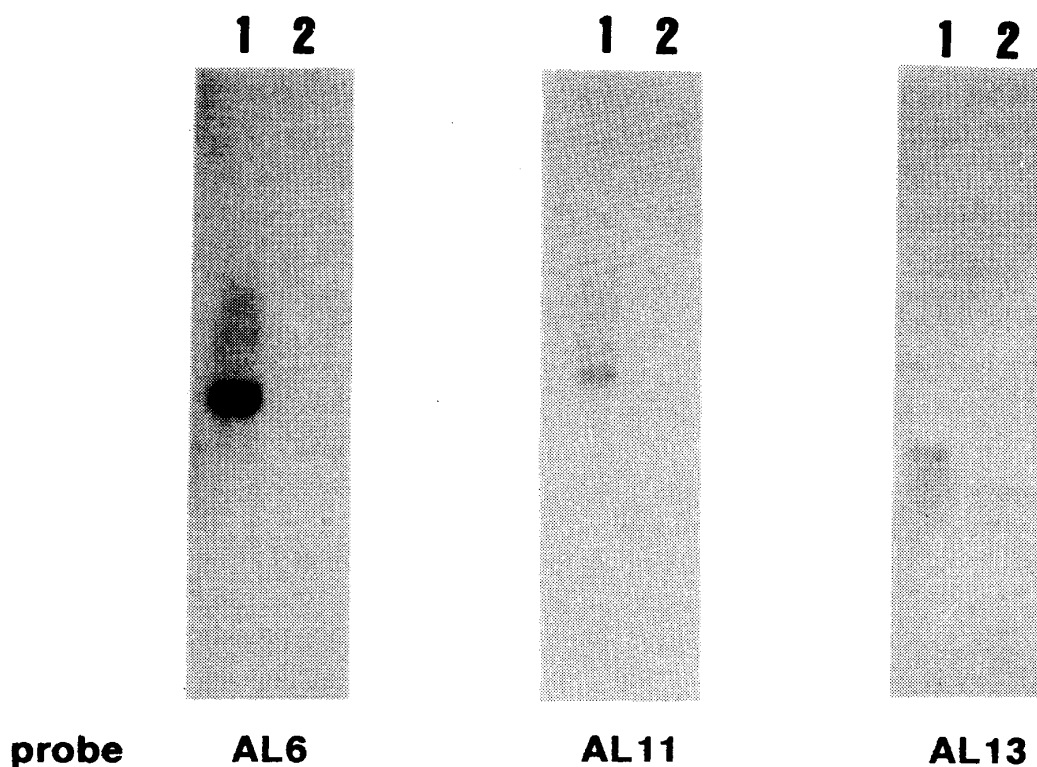


Figure 4.

Northern hybridization analysis to show aleurone tissue specific expression of the cloned cDNA sequences. About  $0.5 \mu\text{g}$  RNA was used for each lane. 1 and 2 represent aleurone layer and starchy endosperm, respectively. cDNA inserts obtained from the aleurone layer specific cDNA library were used as the probes.

**Table 1.****Population of Rice Endosperm cDNA Clones**

	population(%)		
	RM7	RG1	RG5
22DAF rice grain cDNA library	1.8%	0.9%	0.2%
rice endosperm cDNA library from a single grain	7.0%	3.0%	1.0%

RM7, Proramin cDNA; RG1, RG5, glutelin cDNAs

以上、イネ種子一粒を細かく解剖し各組織特異的 library を構築することが可能となった。このことからこの方法を用いてイネ種子形成機構がより詳細に解析出来るものと考えられる。また、この方法は、植物の組織・細胞levelで特異的に発現する遺伝子を同定するための強力な手法であることが実証出来た。

### 謝辞および追記

本研究のため登熟期「日本晴」種子を快く使用させて下さった、京都府立大学付属農場 天野高久助教授に深く感謝いたします。なお、放射性同位元素を使用する実験は全て京都府立大学放射性同位元素共同実験室において行なった。

### 引用文献

- 1) Ogawa M., Tanaka K., Kasai Z. (1979) *Plant Cell Physiol.*, 20, 19-27.
- 2) Saiki R.K., Scharf S.J., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A., Amhien N.A. (1985) *Science*, 230, 1350-1354.
- 3) Sakai R.K., Gelfond D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Elich H.A. (1988) *Science*, 230, 487-491.
- 4) 田中国介, 若浦誠, 増村威宏, 藤井昭治 (1989) 京都府立大学学術報告, 41, 86-92.
- 5) Belyavsky A., Vinogradova T., Rajewsky K. (1989) *Nucleic Acids Research*, 17, 2919-2932.
- 6) Masumura T., Hibino T., Kidzu K., Mitsukawa N., Tanaka K., Fujii S. (1990) *Mol. Gen. Genet.*, 221, 1-7.

### ABBREVIATIONS

bp	base pairs
BPB	bromophenol blue
cDNA	complementary DNA
DAF	days after flowering
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EtBr	ethidium bromide
kbp	kilo base pairs
kDa	kilo dalton
mRNA	messenger RNA
poly(A) <sup>-</sup>	3'-terminal poly adenylyl-containing
SDS	sodium dodecyl sulfate
CTAB	cetyltrimethylammonium bromide

### Summary

We constructed a cDNA library from a single developing rice grain. RNA was obtained from a sheet of manually peeled aleurone layer from one third of a single rice grain. Single stranded cDNAs were amplified using the PCR technique after oligo (dG) tails were introduced on the 3'-ends of the single stranded cDNAs obtained directly from the mRNAs. The resulting cDNAs were ligated into Bluescript SK+ to obtain a cDNA library consisting of about 10<sup>6</sup> individual clones.