

Code No. 6136

研究用

TaKaRa

cDNA Library Construction Kit

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	3
● 保 存	4
● cDNA 合成反应前的准备	4
● 实验操作	5
A) 1st Strand cDNA 的合成	5
B) 2nd Strand cDNA 的合成及末端平滑化	6
C) Adaptor Ligation	7
D) 限制酶 <i>Not</i> I 酶切反应	7
E) 使用 Spin Column 除去短链 cDNA	7
F) Vector Ligation	8
G) 质粒转化	9
● 实验例	10
● Troubleshooting	10
● 补充说明	10
1.Primer 以及 Adaptor 的碱基序列	10
2.pAP3neo 载体图谱	11
3.注意事项	11
● Library 的使用方法	11
1.Library 的扩增	11
2.Screening (Colony Hybridization) 用 Membrane 的制备	12
● 参考文献	12
● 关联产品	13

● 制品说明

利用真核生物的各种组织或细胞中的 PolyA⁺ RNA 合成 cDNA，然后进行基因克隆，这在分子生物学实验中被广泛应用。这一技术的使用，使基因的结构解析及目的蛋白的表达等变得更为方便。

一般合成 cDNA 以及构建 cDNA Library 的方法为：① 合成与目的 PolyA⁺ RNA 相互补的双链 cDNA；② 将双链 cDNA 与细菌或病毒来源的载体进行重组；③ 将重组体导入细菌或真核细胞内进行扩增，构建 cDNA Library。构建成的 cDNA Library 可以用于 cDNA 的解析，或者进一步进行体外转录或体外翻译等。本试剂盒是以动植物由来的 PolyA⁺ RNA 为模板合成双链 cDNA 后，将双链 cDNA 与 Plasmid Vector 进行重组，构建质粒 cDNA Library 的试剂盒。试剂盒中使用的载体 pAP3neo 含有 SV40 启动子，可以在哺乳动物细胞内进行表达（见“补充说明”）。

本试剂盒原理采用了 Gubler-Hoffman 法（Linker Primer 法），是一种可以控制克隆基因方向性的 Directional Cloning 法，其原理见图 1，具体说明如下：

- 1) 利用反转录酶 PrimeScript RTase 和 Oligo (dT) 18 Anchor Primer^{1, 3-5)} 合成 1st Strand cDNA。1st Strand cDNA 合成时使用 5-methyl dCTP。
- 2) *E.coli* RNase H⁶⁾ 使 mRNA-1st Strand cDNA 杂合体中的 RNA 形成 Nick，再使 *E.coli* DNA Polymerase 和 *E.coli* DNA Ligase 将 RNA 链置换成 DNA 链，合成 2nd Strand cDNA。
- 3) 使用 T4 DNA Polymerase 将双链 cDNA 末端平滑化。^{1, 7)}
- 4) 与 Adaptor 连接后，使用 *Not* I 进行酶切。
- 5) 使用 Spin Column 除去短链 cDNA。
- 6) 与 Vector pAP3neo⁸⁾ 进行连接 (Directional Cloning)。
- 7) 利用电刺激转化法导入大肠杆菌。
- 8) 确认克隆效率及插入片段大小等。

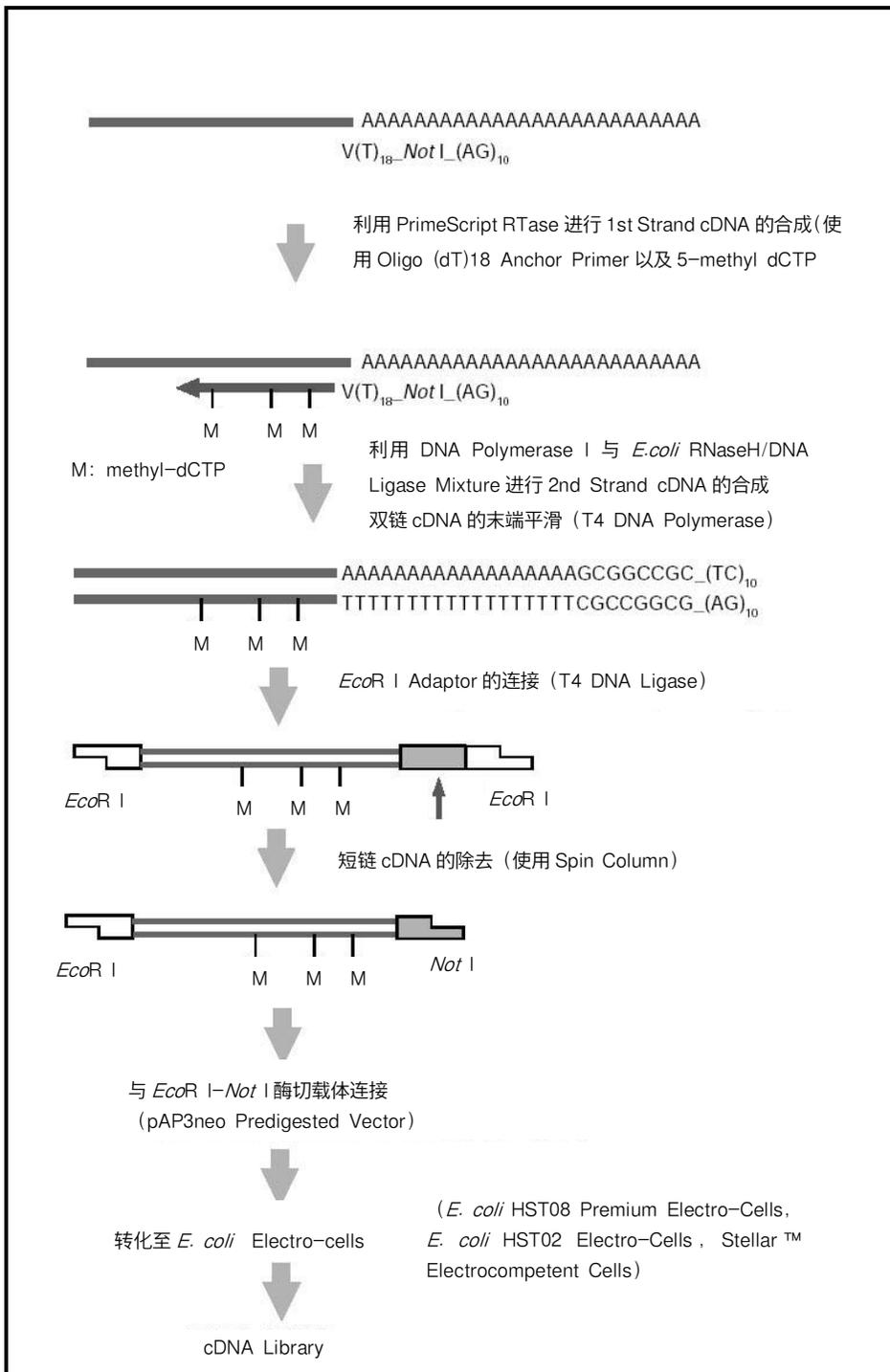


图 1. cDNA Library 合成原理图

● 制品内容 (5 次量)

1. PrimeScript RTase (200 U/ μ l)	5 μ l
2. RNase Inhibitor (40 U/ μ l)	5 μ l
3. Oligo(dT) ₁₈ Anchor Primer (1 μ g / μ l) *1	10 μ l
4. 5×1st Strand Synthesis Buffer*2	20 μ l
5. 1st Strand dNTP Mixture	6 μ l
6. <i>E.coli</i> RNase H/ <i>E.coli</i> DNA Ligase Mixture	10 μ l
7. <i>E.coli</i> DNA Polymerase I (20 U/ μ l)	10 μ l
8. 2nd Strand dNTP Mixture	23 μ l
9. 5×2nd Strand Synthesis Buffer*2	150 μ l
10. T4 DNA Polymerase (1 U/ μ l)	20 μ l
11. 10×T4 DNA Ligase Buffer	20 μ l
12. T4 DNA Ligase (350 U/ μ l)	20 μ l
13. <i>Eco</i> R I- <i>Sma</i> I Adaptor (0.4 μ g/ μ l)	18 μ l
14. <i>Not</i> I Supplement	135 μ l
15. <i>Not</i> I (50 U/ μ l)	15 μ l
16. tRNA (10 μ g/ μ l)	5 μ l
17. Dr. GenTLE Precipitation Carrier (4°C保存) *3	60 μ l
18. 3 M Sodium Acetate (pH5.2) (4°C保存)	1 ml
19. pAP3neo Predigested Vector (100 ng/ μ l) *4	5 μ l
20. RNase-free H ₂ O	640 μ l
21. Control RNA (1 μ g/ μ l) *5	5 μ l
22. T7 Promoter Primer (5 pmol/ μ l) *6	20 μ l
23. T3 Promoter Primer (for pAP3neo) (5 pmol/ μ l) *6	20 μ l
24. Spin Column (CHROMA SPIN™-1000 + DEPC-H ₂ O Columns *7) (4°C保存)	5 支

*1 Oligo(dT)₁₈ Anchor Primer 中含有 *Not* I Site 及 *Xho* I Site (见补充说明)。如果不用 *Not* I 而用 *Xho* I 进行酶切时, 也可以制备 *Eco*R I-*Xho* I 双链 cDNA 片段构建 cDNA 文库, 利用这些 Site 的载体 (不可去磷酸化) 也可用来构建 cDNA 文库。另外, 本试剂盒中不含有 *Xho* I 酶, 需要时请另外购买。详细情况请参考补充说明。此外, Adaptor Ligation 后使用 *Xho* I 酶切时, 参照“补充说明”。

*2 与 PrimeScript Double Strand cDNA Synthesis Kit[Code No. 6111A]中所含有的组份不同。

*3 同 Dr. GenTLE Precipitation Carrier (Code No. 9094)。

*4 经 *Eco*R I、*Not* I 酶切处理。

*5 本试剂盒中的 Control RNA 是以 pSPTet3 质粒(质粒中的 SP6 启动子下游插入长约 1.4 kb 的 pBR322 来源的 DNA 片段, 该 DNA 片段上含有抗四环素基因)为模板, 由 SP6 RNA 聚合酶经体外转录而得到的, Control RNA (约 1.4 kb) 的 3' 端具有 30 个 A 碱基的 PolyA 尾。以这种 RNA 为模板合成的双链 cDNA 插入到适当的质粒载体中后, 如果插入的 cDNA 确实为全长, 那这种质粒便可获得四环素抗性。

*6 可用于 Insert Check 及 DNA 测序。序列信息可参照“补充说明”。

*7 Clontech Laboratories 公司产品。(带下盖)

(注) 本制品不含对电转化法十分重要的大肠杆菌。使用本制品时, 需用大肠杆菌的感受态细胞转化甲基化 DNA。可采用 *E. coli* HST08 Premium Electro-Cells (Code No. 9028)、Clontech 的 Stellar™ Electrocompetent Cells (Clontech Code 636765)

本试剂盒以外需要准备的试剂、器材

【试剂】

电转化的感受态细胞:

E. coli HST08 Premium Electro-Cells (Code No. 9028)

Stellar™ Electrocompetent Cells (Code No. 636765) 等

苯酚/氯仿/异戊醇 (25: 24: 1; V/V/V)

氯仿/异戊醇 (24: 1; V/V)

乙醇

TE Buffer (10 mM Tris-HCl/1 mM EDTA, pH8.0)

DNA Marker

1% Agarose Gel (含有 0.1 μg/ml 溴乙锭)

LB 培养基

LB/Amp (100 μg/ml) Plate

【器材】

微量离心机 (Microtube 用、14 ml FALCON Tube (2059) 用)

恒温水浴槽 (设定以下温度; 根据温度, 也可以使用 PCR 仪):

8°C、12°C、16°C、37°C、42°C、65°C、70°C

MicroPipet

MicroTube

微量移液枪枪头

FALCON tube (BD Code No. 352059)

电击转化装置

电泳装置

● 保 存:

Dr. GenTLE Precipitation Carrier	4°C保存。
3 M Sodium Acetate (pH5.2)	4°C保存。
Spin Column	4°C保存。
其他组份	-20°C保存。

● cDNA 合成反应前的准备

【实验器材的灭菌】

市售的一次性灭菌塑料容器通常无 RNase 污染, 可以直接使用。微量离心管以及吸液枪头等需要经过高温高压灭菌后方可使用。需经干热灭菌的器材 (如玻璃器具等) 必须在 160°C 干热灭菌 2 小时以上, 不能干热灭菌的器材 (如塑料制品等) 须用 0.1% 的 DEPC 溶液在 37°C 处理 12 小时以上后, 再经高温高压灭菌后使用 (防止 RNA 被 DEPC 羧甲基化)。

做 RNA 实验时的器材必须和一般实验器材严格分开。此外, 通过人手混入 RNase 的机率较大, 所以进行 RNA 实验操作时, 应使用一次性橡胶手套等。

【溶液试剂的制备】

用于 cDNA 合成反应时的溶液试剂应尽可能使用 0.1% DEPC 进行处理, 并经高温高压灭菌后使用。有些试剂不能进行高温高压灭菌时, 应使用灭菌器具、水等配制溶液后, 再进行过滤除菌处理。使用的溶液试剂和灭菌水都要求 RNA 实验专用。

【RNA Sample 的制备】

应制备高纯度的 RNA Sample。RNA Sample 中如果混入多糖、蛋白质等有可能阻碍 cDNA 的合成反应。同时还必须防止基因组 DNA 的混入，基因组 DNA 也可能成为反转录酶的模板。此外，动植物组织、细胞材料等应尽量保证新鲜，新鲜组织、细胞如不立即提取 RNA 时请于-80℃或于液氮中保存。

1. 总 RNA 的制备

除了利用 CsCl 密度梯度离心法或者硫氰酸胍苯酚氯仿法 (AGPC 法) 等一般方法之外，也可利用市场销售的一些试剂盒提取纯化总 RNA。

RNAiso Plus (Code No. 9108/9109)

NucleoSpin[®] RNA (Code No. 740955.10/.50./250)

2. PolyA⁺ RNA 的纯化

通常采用 Oligo (dT) Cellulose 或 Poly (U) Sepharose 的亲和层析法等将 PolyA⁺ RNA 从总 RNA 中分离出来。

3. PolyA⁺ RNA 的纯度检测

为了得到理想的 cDNA 合成效率，制备高纯度的、完整的 PolyA⁺ RNA 非常关键。建议在 cDNA 合成反应前检测 RNA 的纯度。

① Agarose 凝胶电泳的检测 (总 RNA)

取 1~2 μg 总 RNA 进行热变性 (65℃, 10 分钟)，然后进行 Agarose 凝胶电泳。对真核细胞而言，如果得到的总 RNA 较为完整时，电泳结果会显示二条清晰的 Ribosomal RNA 电泳条带 (28S 和 18S RNA)，其量的比例约为 2: 1。如果 28S 及 18S RNA 的电泳条带较为模糊时，说明 RNA 已被分解，请不要使用。

另外，如果在 28S 的电泳条带上方还发现有电泳带时，说明提取的总 RNA 中混入了基因组 DNA，此时请使用 RNase-free DNase I 进行处理后再进行 cDNA 的合成反应。

② 吸光度的测定 (总 RNA 或 PolyA⁺ RNA)

测定制备的 RNA Sample 的 A₂₆₀ 及 A₂₈₀ 的吸光度。如果 A₂₆₀/A₂₈₀ 的比值在 1.8~2.1 之间时，说明制备的 RNA 较纯，低于 1.7 时的 RNA Sample 请不要使用。

● 实验操作

A) 1st Strand cDNA 的合成

1. 在微量离心管中配制下列反应液

试剂	使用量
[3] Oligo(dT) ₁₈ Anchor Primer*	2.0 μl
[5] 1st Strand dNTP Mixture	1.2 μl
RNA (polyA ⁺ RNA)	5.0 μg
[20] RNase-free H ₂ O	up to 10 μl

2. 65℃加热 5 分钟后，冰中急冷。

3. 配制以下反应液，全量 20 μl。

试剂	使用量
上述 RNA/Primer mixture	10.0 μl
[4] 5×1st Strand Synthesis Buffer	4.0 μl
[2] RNase Inhibitor	1.0 μl
[1] PrimeScript RTase	1.0 μl
[20] RNase-free H ₂ O	4.0 μl

4. 用移液枪轻轻混匀后, 42°C反应 1 小时。

5. 反应结束后置于冰中冷却 2 分钟。

*:本 Primer 中含有 *Not* I Site 及 *Xho* I Site。

B) 2nd Strand cDNA 的合成及末端平滑化

1. 在 A 的 1st Strand cDNA 合成液 (20 μ l) 中按下列顺序加入反应试剂, 进行 2nd Strand cDNA 的合成反应 (反应液全量为 146 μ l)。

试剂	使用量
[9] 5 \times 2nd Strand Synthesis Buffer	30 μ l
[8] 2nd Strand dNTP Mixture	4.5 μ l
[20] RNase-free H ₂ O	87.5 μ l
[6] <i>E.coli</i> RNase H / <i>E.coli</i> DNA Ligase	2 μ l
[7] <i>E.coli</i> DNA Polymerase I	2 μ l

2. 用移液枪轻轻混匀后 16°C反应 2 小时。

3. 70°C加热 10 分钟后, 室温放置 5 分钟。

4. 加入 4 μ l 的 [10] T4 DNA Polymerase 后, 轻轻混匀。

5. 37°C反应 10 分钟。

6. 向 2nd Strand cDNA 合成反应液 (150 μ l) 中加入等量 (150 μ l) 的苯酚/氯仿/异戊醇 (25: 24: 1) 溶液。Vortex 搅拌 5~10 秒钟。

7. 室温下 15,000 rpm 离心 5 分钟, 液体分为二层。小心取出水相 (上层) 移至另一个新的微量离心管中 (注意切勿取出中间层)。

8. 向水相中加入等量 (150 μ l) 的氯仿/异戊醇 (24: 1) 溶液, Vortex 搅拌 5~10 秒钟。

9. 在室温下 15,000 rpm 离心 5 分钟, 液体分为二层。小心取出水相 (上层) 移至另一个新的微量离心管中。

10. 加入 1/10 量 (15 μ l) 的 [18] 3 M Sodium Acetate (pH5.2)、4 μ l 的 [17] Dr. GenTLE Precipitation Carrier、2~2.5 倍量的 100%乙醇。

11. 均匀混合后立即进行 15,000 rpm、30 分钟的离心 (室温下)。

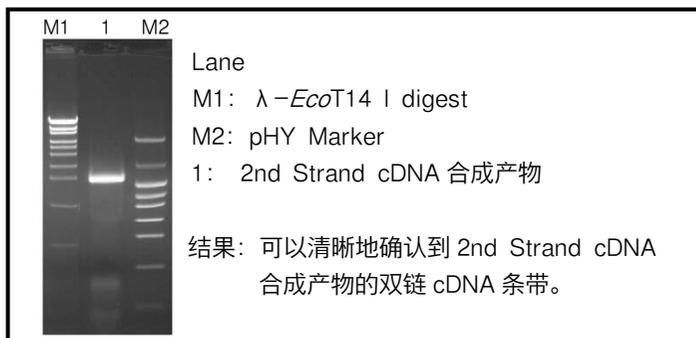
12. 除去上清后用 70%的乙醇清洗。

13. 干燥沉淀后, 用 12.5 μ l 的 [20] RNase-free H₂O 溶解沉淀。

* 使用的 PolyA⁺ RNA 不纯、或已被分解时, cDNA 的合成性能较差。请取出一部分 2nd Strand cDNA 的合成反应液进行电泳, 确认 cDNA 的合成效果, 此时的正常电泳结果应出现 Smear 条带。如果确认没有合成 cDNA 条带、或电泳条带出现低分子化时, 说明合成的 cDNA 质量较差, 请使用高纯度的 PolyA⁺ RNA 重新合成 cDNA。

【Control 反应例】

按照上述实验操作方法，以 Control RNA (约 1.4 kb) 5 μ g 为模板，使用 Oligo (dT)₁₈ Anchor Primer 合成 2nd Strand cDNA。用苯酚/氯仿抽提反应液，用乙醇沉淀纯化后，取出少量进行电泳检测。



C) Adaptor Ligation

1. 向上述双链 cDNA 溶液 12.5 μ l 中加入下列试剂，全量 20 μ l。

试剂	使用量
[11] 10 \times T4 DNA Ligase Buffer	2 μ l
[13] EcoR I-Sma I Adaptor	3.5 μ l
[12] T4 DNA Ligase	2 μ l

2. 轻轻混匀后，8 $^{\circ}$ C 过夜反应 (16 小时以上)。
3. 70 $^{\circ}$ C 保温 30 分钟后，室温放置 5 分钟。

D) 限制酶 Not I 酶切反应

1. 向 Adaptor Ligation 溶液 20 μ l 中加入下列试剂，全量 50 μ l。

试剂	使用量
[14] Not I Supplement	27 μ l
[15] Not I	3 μ l

2. 轻轻混匀后，37 $^{\circ}$ C 反应 3 小时。

E) 使用 Spin Column 除去短链 cDNA

以下的 Column 处理可以除去 400 bp 以下的短链 cDNA。

1. Spin Column 的准备*1

- ① 反复上下颠倒悬浊 Column 内的 Gel。
- ② 先取下上盖后，慢慢取下下盖，Column 上下盖不要丢弃。
- ③ 让 Column 内的 Buffer 自然流出 (大约需要 10 分钟)。
- ④ 安装下盖，向 Column 中加入 1 ml 的 TE Buffer 后再盖上上盖，反复上下颠倒悬浊 Gel。
- ⑤ 重复上述操作②~④。
- ⑥ 取下 Column 的上下盖，让 Column 内的 Buffer 自然流出。
- ⑦ 将去盖的 1.5 ml Microtube 放置于 FALCON Tube 中，然后将 Spin Column 插入 FALCON Tube 中，将 Column 的下端安装于 FALCON Tube 中的 1.5 ml Microtube 内*2。
- ⑧ 700 $\times g$ 离心 5 分钟。

- ⑨ 丢弃 FALCON Tube 中的 1.5 ml Microtube, 向 FALCON Tube 中放入新的去盖的 1.5 ml Microtube, 再将 Spin Column 的下端安装于 FALCON Tube 中的 1.5 ml Microtube 内。
- *1 Spin Column 的准备请在 *Not I* 酶切过程中进行, 但请注意防止 Gel 表面干燥。
- *2 向 FALCON Tube 中用力插入 Spin Column 时, Column 中有时会有气泡进入。此时请按照上述的①~⑥操作重新进行。

2. 短链 cDNA 的除去

- ① 向 *Not I* 酶切溶液 (50 μ l) 中加入下列试剂, 充分混合。

试剂	使用量
TE Buffer	40 μ l
[16] tRNA	1 μ l

- ② 将上述①的溶液向操作 1 中准备好的 Spin Column 中添加。请注意要添加在 Column 中的 Gel 表面的中央位置, 每次添加约 10 μ l, 分数次慢慢添加。
- ③ 700 $\times g$ 离心 5 分钟。
- ④ Column 洗脱液约 100 μ l*转移至新的 1.5 ml Microtube 中, 加入等量 (100 μ l) 的苯酚/氯仿/异戊醇 (25: 24: 1) 溶液, 剧烈振荡混匀 5~10 秒。
- ⑤ 室温下 15,000 rpm 离心 5 分钟, 液体分为二层, 小心取出水相 (上层) 转移至另一个新的微量离心管中 (注意切勿取出中间层)。
- ⑥ 加入等量 (100 μ l) 的氯仿/异戊醇 (24: 1) 溶液, 剧烈振荡混匀 5~10 秒。
- ⑦ 室温下 15,000 rpm 离心 5 分钟, 液体分为二层, 小心取出水相 (上层) 转移至另一个新的微量离心管中。
- ⑧ 加入 1/10 量 (10 μ l) 的 3 M Sodium Acetate (pH5.2)、4 μ l 的 Dr. GenTLE Precipitation Carrier, 2~2.5 倍量的 100%乙醇, 充分混匀。
- ⑨ 室温下 15,000 rpm 离心 30 分钟, 除去上清, 再用 70%乙醇清洗沉淀。
- ⑩ 干燥沉淀后用 15 μ l 的 RNase-free H₂O 溶解沉淀。
- * 洗脱液不满 100 μ l 时, 请用 TE Buffer 补至 100 μ l。

F) Vector Ligation

1. 配制下列 Ligation 反应液。

试剂	使用量
Purified cDNA	15 μ l
[11] 10 \times T4 DNA Ligase Buffer	2 μ l
[19] pAP3neo Predigested Vector	1 μ l
[12] T4 DNA Ligase	2 μ l

2. 轻轻混合后 12°C 过夜反应。
3. 向 Ligation 反应液中加入 80 μ l 的 TE Buffer, 加入等量 (100 μ l) 的苯酚/氯仿/异戊醇 (25: 24: 1) 溶液, 剧烈振荡混匀 5~10 秒。
4. 室温下 15,000 rpm 离心 5 分钟, 液体分为二层, 小心取出水相 (上层) 转移至另一个新的微量离心管中 (注意切勿取出中间层)。
5. 加入等量 (100 μ l) 的氯仿/异戊醇 (24: 1) 溶液, 剧烈振荡混匀 5~10 秒。
6. 室温下 15,000 rpm 离心 5 分钟, 液体分为二层, 小心取出水相 (上层) 转移至另一个新的微量离心管中 (注意切勿取出中间层)。

7. 向上清中加入 1/10 量 (10 μ l) 的[18] 3 M Sodium Acetate (pH5.2)、4 μ l 的[17] Dr. GenTLE Precipitation Carrier, 2~2.5 倍量的 100%乙醇, 充分混合。
8. 室温 15,000 rpm 离心 30 分钟, 除去上清。
9. 用 70%乙醇清洗沉淀。
10. 干燥沉淀后, 用 20 μ l 的 TE Buffer 溶解沉淀。
11. -20°C 保存。

G) 质粒转化

1. 将 -70°C 保存的 Stellar™ Electrocompetent Cells 于冰上融解。
2. 将 Ligation 溶液取出一部分 (0.5~1.0 μ l) 加入大肠杆菌 (40 μ l), 轻轻混匀。
3. 将 2 的菌液迅速转移至冰上预冷的 0.1 cm 冲击槽中, 施加电压脉冲进行电击转化。

【电转化法实施例*1】

连接液: 0.5~1.0 μ l

宿主大肠杆菌: Stellar™ Electrocompetent Cells

电转仪: Gene Pulser II (BIORAD 公司)

冲击条件: 1.5 kV, 200 Ω , 25 Mf

(脉冲条件请参照电器使用说明书。)

4. 向冲击槽内快速加入冰上预冷的 SOC (960 μ l)。
5. 全量取出回收后, 转移至培养用 Tube 中 (FALCON Tube 等), 37°C 振荡培养 1 小时。
6. 取部分 5 的培养液 (1 μ l 或 10 μ l) 涂布于 LB/Amp 琼脂平板培养基上培养, 剩余的培养液请于 4°C 保存。*2
7. 37°C 过夜培养。
8. 计算菌落数, 求取 cDNA Primary-Library 效率。
9. 使用[22] T7 Promoter Primer 及[23] T3 Promoter Primer (for pAP3neo) 进行 Colony PCR 反应*3, 确认本 Library 的 Insert 分布情况。使用 PCR 法难以检定时, 可用限制酶切确认 Insert 的分布情况。

*1 由于 cDNA Insert 已被甲基化, 所以转化时, 应使用像 *E. coli*/HST08 Premium Electro-Cells (Code No. 9028)、Stellar™ Electrocompetent Cells (Clontech Code 636765) 那样的切断甲基化 DNA 基因缺失的大肠杆菌宿主。此外, 进行电刺激法转化时, 大肠杆菌 50 μ l 中, 请加入少于 4 μ l 的 Ligation 溶液。

*2 4°C 可以保存一晚, 不建议 4°C 长时间保存。

*3 Colony PCR 实验例 (10 μ l 反应体系)

◆PCR 反应液配制如下:

试剂	使用量
TaKaRa LA Taq HS (0.5 U/ μ l)	0.1 μ l
各 Primer (各 2.5 pmol)	0.5 μ l

本试剂盒含 40 次反应量。用量不足时请参照“补充说明”中的碱基序列自行制备。

◆PCR 反应条件如下:

95°C , 1 min

94°C , 30 sec

55°C , 30 sec

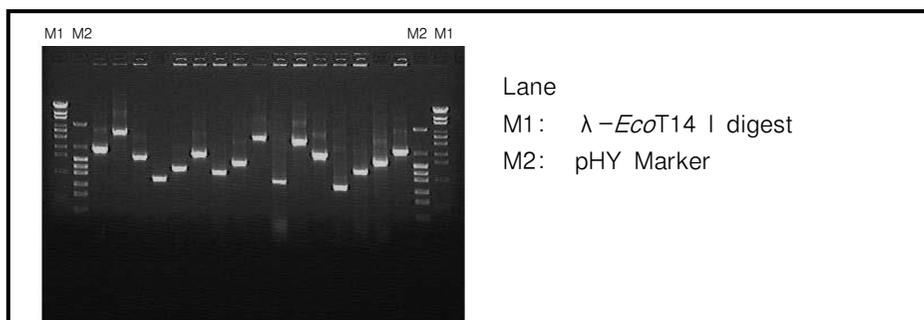
72°C , 3 min

72°C , 10 min

} 30 Cycles

● 实验例

按照“实验操作”方法，以 Chicken 来源的 PolyA⁺ RNA 5 μg 为模板，构建 cDNA 文库，在得到的 Colony 中任意挑选了 16 个克隆，使用试剂盒中的 T7、T3 Promoter Primer 进行 PCR 扩增，检测 Insert DNA 的片段长度。1% Agarose Gel 电泳结果图如下。



● Troubleshooting

如果实验没有得到正确结果时，请仔细阅读说明书，并请重点确认以下内容：

1. Control RNA 的使用
本试剂盒中含有 Control RNA (pSPTet3 PolyA⁺ RNA)，请使用 Control RNA 确认 1st Strand 及 2nd Strand cDNA 的合成是否正确。
2. PolyA⁺ RNA 的纯度检测
PolyA⁺ RNA 的纯度对提高 cDNA 的合成效率很重要，纯度不好的 RNA Sample 将直接影响 cDNA 的合成量、以及 Insert 长度等，因此请在 cDNA 的合成反应前测定 OD₂₆₀、OD₂₈₀ (A₂₆₀/A₂₈₀ 的值在 1.8~2.1 时较好)。同时还可以使用电泳法确认 RNA 的纯度。
3. RNase 的污染
应严格防止 RNA 样品的 RNase 污染。实验用器具、试剂等应严格进行干热灭菌、高温高压灭菌等处理，实验操作时注意戴手套等。
4. 电刺激法转化
电刺激法转化时，Ligation 溶液过多会导致转化效率的下降。请研讨适宜的电击转化条件，以得到高转化效率。

● 补充说明

1. Primer 以及 Adaptor 的碱基序列

◆ Oligo (dT)₁₈ Anchor Primer

5' -(GA)₁₀ CTCGAGCGGCCG(T)₁₈ V-3' (V=A or C or G)

本 Anchor Primer 上除了拥有 *Not* I 酶切位点外还具有 *Xho* I 酶切位点。除使用本试剂盒中的 pAP3neo 载体外，也可使用其他载体。

◆ *Eco*R I-*Sma* I Adaptor

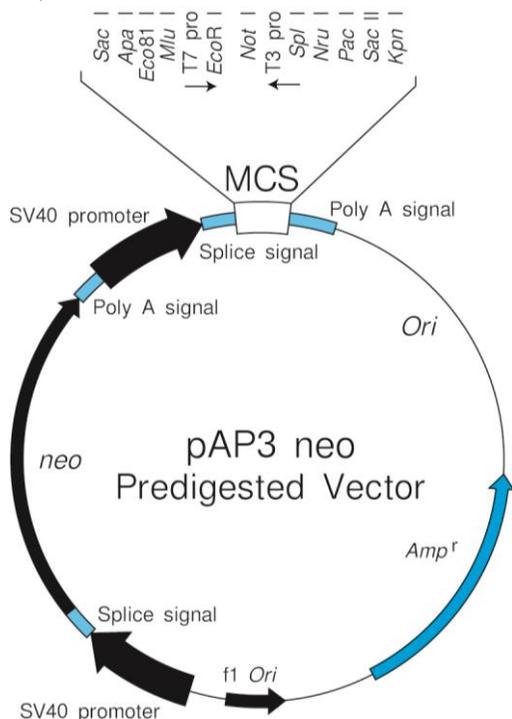
5' -OH-AATTCCCGGG-3'
GGGCCCP-5'

◆ T7 Promoter Primer

5' - TAATACGACTCACTATAGGG -3'

- ◆ T3 Promoter Primer (pAP3neo 用)
5' -ATTAACCCTCACTAAAGGGCG-3'
pAP3neo 载体的专用序列。

2. pAP3neo 载体图谱



*本试剂盒包含的 pAP3neo Predigested Vector 可被 *EcoR* I 及 *Not* I 酶切。*EcoR* I 所切序列一侧存在磷酸基团, *Not* I 所序列一侧经脱磷酸处理后不存在磷酸基团。
*本载体的 *EcoR* I 位点的上游还具有 T7 启动子, 可用于体外转录反应。

GenBank Accession No. AB 003468

3. 注意事项

Adaptor Ligation 反应后如果不用 *Not* I 酶切而用 *Xho* I 进行酶切时, 请在 Adaptor Ligation 反应后进行乙醇沉淀回收 cDNA, 然后再使用限制酶 *Xho* I (Code No. 1094AH) 以及附带的 H Buffer 进行酶切反应。取 50 μl 反应体系, 37°C 反应 3 小时。

● Library 的使用方法

【Library 的扩增】

1. cDNA 与质粒的 Ligation 溶液 (Plasmid Library) 电击转化至大肠杆菌 HST08 Premium 中, 确认其转化效率 (电击转化法请参照 G) 质粒转化部分)。
2. 第 2 天, 在 Φ15 cm LB/Amp (100 μg/ml Amp) 平板培养基上按每个平板约产生 5 万个以下的克隆进行涂布, 37°C 过夜培养。
3. 向平板中生成的菌落加入 2 ml LB/Amp (100 μg/ml Amp) 液体培养基^{*1}, 用 Micropipet 洗脱菌落并进行回收。
4. 重复操作上述步骤 3。
5. 得到的菌液制作成 20% 的甘油溶液后, -80°C 保存^{*2}。
6. 确认文库效率后, 可进行 Screening 或 Plasmid 制备等。

*1 添加的液体培养基若被平板吸收, 可适当增加添加量。

*2 长时间保存有可能降低文库效率, 使用前请重新确认。

【Screening (Colony Hybridization) 用 Membrane 的制备】

1. cDNA 与质粒的 Ligation 溶液 (Plasmid Library) 电击转化至大肠杆菌 HST08 Premium 中, 确认其转化效率 (电击转化法请参照 G) 质粒转化部分)。
2. 第 2 天, 在 $\Phi 15$ cm LB/Amp (100 μ g/ml Amp) 平板培养基上按每个平板约产生 5 万个以下的克隆进行涂布, 37°C 培养 6~8 小时, 菌落生长以不相互粘着为好。
3. 在生长菌落的平板上慢慢铺放尼龙膜, 然后在尼龙膜背面用针刺做好定位标记。
4. 将尼龙膜的菌落面朝上, 铺放入另一新的 LB/Amp (100 μ g/ml Amp) 平板培养基上培养数小时, 以确保菌落生长。(Master Plate 再培养数小时后 4°C 保存。)
5. 在适当的容器内放入 2 张滤纸*, 用 0.5 N NaOH 浸润, 将尼龙膜上的菌落面朝上平铺于滤纸上, 再用 0.5 N NaOH 浸润尼龙膜 30 秒钟以上 (碱处理)。
6. 按照上述 5 的方法, 使用新的 2 张滤纸*, 用 1 M Tris-HCl (pH7.6) 处理 30 秒钟以上。
7. 再按照上述 5 的方法, 使用新的 2 张滤纸*, 用 1 M Tris-HCl (pH7.6) /1.5 M NaCl 处理 30 秒钟以上。
8. 将尼龙膜浸入新的 1 M Tris-HCl (pH7.6) /1.5 M NaCl 溶液中, 戴上手套, 慢慢洗去尼龙膜上的菌体残渣。
9. 再将尼龙膜浸入新的 1 M Tris-HCl (pH7.6) /1.5 M NaCl 中洗净。
10. 将尼龙膜夹在滤纸内, 80°C 处理 2 小时, 使 DNA 固定于尼龙膜上。(也可使用 UV 交联剂)
11. 将尼龙膜夹在滤纸内防止灰尘污染, 室温保存。
12. 按照上述操作制备的尼龙膜可用于 Colony Hybridization 等分离目的克隆。关于预杂交、探针制备、杂交、洗涤、曝光及检测可按常规试验操作方法和试剂制备方法进行。

*: 向尼龙膜表面的菌落上直接加入溶液, 会使菌落流失, 不能检测到良好的信号。因此, 不要向尼龙膜表面直接加入溶液。此外, 滤纸和尼龙膜中间注意不要混入气泡。

● 参考文献

- 1) Gubler, U. and Hoffman, B. J. *Gene* . (1983) **25**: 263.
- 2) Wokdmar-Filipowicz, A. *et al* . *Proc Natl Acad Sci USA* . (1984) **81**: 2295.
- 3) Howells, R. D., *et al* . *Proc Natl Acad Sci USA*. (1984) **81**: 7651.
- 4) Schneider, C., *et al* . *Nature* . (1984) **311**: 675.
- 5) Leis, P., *et al* . *Proc Natl Acad Sci USA* . (1973) **70**: 466.
- 6) Okayama, H. and Berg, P. *Mol Cell Biol* . (1982) **2**: 161.
- 7) Kobori, M., Ikeda, Y., Nara, H., Kato, M., Kumegawa, M., Nojima, H., and Kawashima, H. *Genes To Cells*. (1998) **3**: 459-475.

● 关联产品

PrimeScript™ Reverse Transcriptase (Code No. 2680A/B/C)
Recombinant RNase Inhibitor (Code No. 2313A/B)
DNA Polymerase I (*E. coli*) (Code No. 2130A/B)
T4 DNA Polymerase (Code No. 2040A/B)
T4 DNA Ligase (Code No. 2011A/B)
T4 Polynucleotide Kinase (Code No. 2021S/A/B)
pHY Marker (Code No. 3404A/B)
RNAiso Plus (Code No. 9108/9109)
NucleoSpin® RNA (Code No. 740955.10/.50/.250)
Oligotex™-dT30 <Super> (Code No. W9021A/B)
Oligotex™-dT30 <Super> mRNA Purification Kit (From Total RNA) (Code No. 9086)
Dr. GenTLE® Precipitation Carrier (Code No. 9094)
E. coli HST08 Premium Electro-Cells (Code No. 9028)
E. coli HST02 Electro-Cells (Code No. 9026)
Stellar™ Electrocompetent Cells (Code No. 636765)
CHROMA SPIN™-1000+DEPC-H₂O Columns (Code No. 636093/636094)

注意

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

未经TAKARA BIO INC.书面许可授权或批准，不得制造、许诺销售、销售、进口Takara产品，或者使用Takara产品所有的相关专利及相关商标。

如果您需要其他用途的许可授权，请联络我们，或访问我们网站www.takara-bio.com。

您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。

所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

本文件由宝日医生物技术（北京）有限公司翻译制作，最新版本文件请参考 TAKARA BIO INC.网站。为正确使用 Takara 产品，您应当掌握本产品的相关知识和使用说明。

技术咨询热线：

0411-87641685, 87641686

4006518761, 4006518769

TAKARA BIO INC.

URL: <http://www.takarabiomed.com.cn>

v201708Da