

製品コード 6111A

研究用

Takara

**PrimeScript™ Double Strand
cDNA Synthesis Kit**

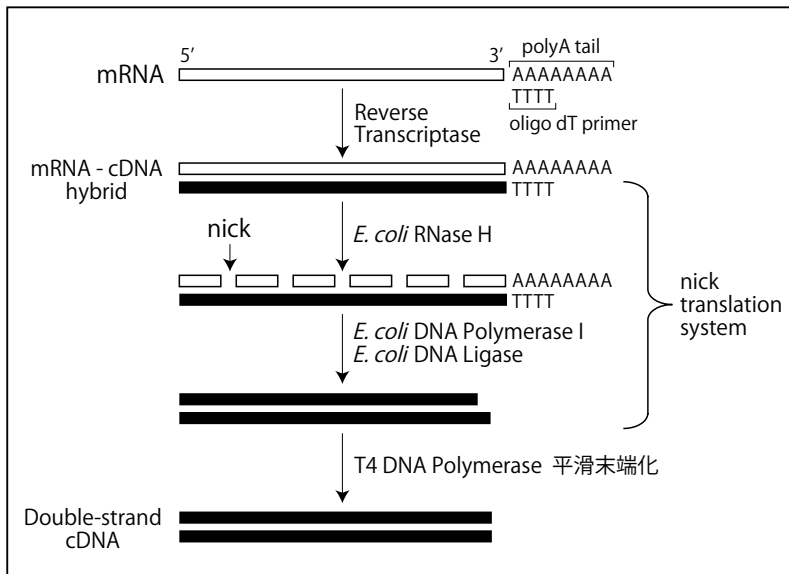
説明書

v201705Da

真核細胞および原核細胞の mRNA から cDNA を合成してクローニングを行う操作は、分子生物学的研究における重要な手法の一つとして頻繁に行われています。

この技術により、遺伝子の構造解析や目的タンパク質の発現操作も容易に行えるようになりました。一般的な cDNA 合成とそのライブラリーの利用法では、目的の mRNA に相補的な二本鎖 cDNA を合成し、バクテリアやウイルス由来のベクターに組み込んでバクテリアあるいは真核細胞に導入し、複製して cDNA を増幅させ、cDNA の解析や *in vitro* transcription、*in vitro* translation 等に用います。

本キットは、主に動植物由来の polyA⁺ RNA より、二本鎖 cDNA を合成するためのキットです。本キットの構築は Gubler-Hoffman の方法¹⁾に基づいています。システムの原理を以下に示します(図1、2 参照)。



- PrimeScript RTase と Oligo (dT)₁₈ Primer¹⁻⁴⁾ あるいは Random Primer^{5,6)} を用いて 1st Strand cDNA を合成する。
- *E. coli* RNase H⁷⁾ で、mRNA-cDNA ハイブリッド中の RNA にニックを入れて、*E. coli* DNA Polymerase I と *E. coli* DNA Ligase のシステムにより、RNA 鎖を DNA 鎖に置き換えていき、2nd Strand DNA を合成する。^{1,8)}
- T4 DNA Polymerase により、末端の平滑化を行う。

図 1. Oligo (dT)₁₈ Primer を用いた 2 本鎖 cDNA 合成反応

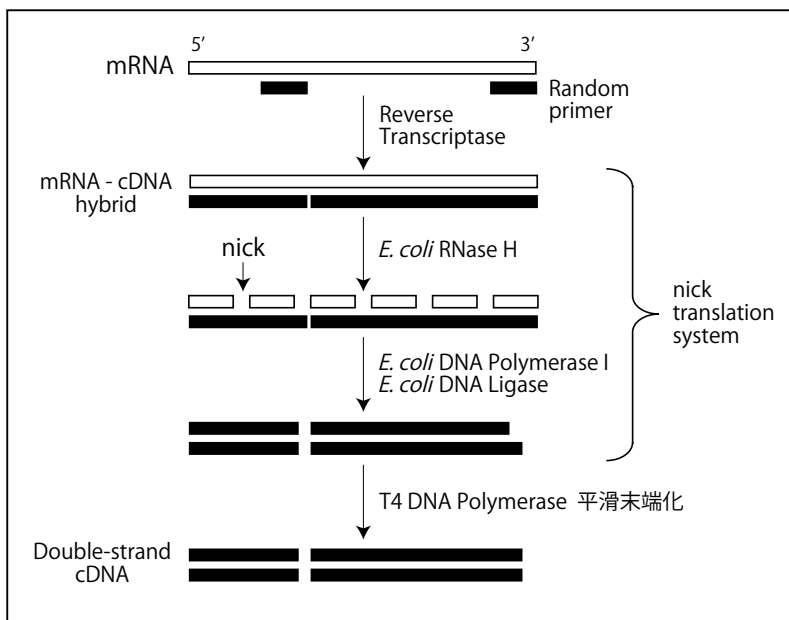


図 2. Random Primer を用いた 2 本鎖 cDNA 合成反応

I. 内容 (10 回分)

1. PrimeScript RTase (200 U/ μ l)	10 μ l
2. RNase Inhibitor (40 U/ μ l)	10 μ l
3. Oligo (dT) ₁₈ Primer (1 μ g/ μ l)	20 μ l
4. Random Primer (9 mer) (0.3 μ g/ μ l)	20 μ l
5. 5 × 1st Strand Synthesis Buffer	40 μ l
6. dNTP Mixture (各 10 mM)	40 μ l
7. <i>E. coli</i> RNase H / <i>E. coli</i> DNA Ligase Mixture	20 μ l
8. <i>E. coli</i> DNA Polymerase I (20 U/ μ l)	20 μ l
9. 5 × 2nd Strand Synthesis Buffer	300 μ l
10. T4 DNA Polymerase (1 U/ μ l)	40 μ l
11. RNase free dH ₂ O	600 μ l × 2
12. Control RNA (1 μ g/ μ l) *	5 μ l

*：本キットに添付されている Control RNA は、SP6 promoter 領域の下流に pBR322 由来のテトラサイクリン耐性遺伝子を含む約 1.4 kb の断片を挿入したプラスミド pSP Tet3 を鋳型にして、SP6 RNA Polymerase を用いて *in vitro* transcription により合成したものです。

この Control RNA は、30 個のアデニン塩基よりなる polyA tail を持つ鎖長約 1.4 kb の polyA⁺ RNA で、この RNA を鋳型に二本鎖 cDNA を合成して、適当なプラスミドに挿入した際この二本鎖 cDNA が full-length のものであれば、このプラスミドはテトラサイクリン耐性になります。

キット以外に必要な試薬、器具類 (主なもの)

<試薬>

- 10% (w/v) SDS
- 0.25 M EDTA (pH8.0)
- フェノール／クロロホルム／イソアミルアルコール (25 : 24 : 1, v/v/v)
- クロロホルム／イソアミルアルコール (24 : 1, v/v)
- 10 M 酢酸アンモニウム
- イソプロパノール
- エタノール
- TE Buffer

<器具>

- 微量遠心機 (マイクロ遠心機)
- 42°C 水浴槽 (または TaKaRa PCR Thermal Cycler など)
- 16°C 水浴槽
- 65°C 水浴槽
- 70°C 水浴槽
- 37°C 水浴槽
- マイクロピペット
- マイクロ遠心チューブ
- ピペットチップ

II. 保存 - 20°C

III. cDNA 合成反応を行う前の準備、注意点

1. 器具類の滅菌法

市販の滅菌ディスポーザブルプラスチック器具類は通常 RNase フリーと考えてよく、そのまま実験に用いてもさしつかえありませんが、マイクロ遠心チューブやマイクロペット用チップなどはオートクレーブ処理を行った後用いてください。ガラス器具、スパーテルなどを用いる場合には、160℃で少なくとも 2 時間以上乾熱滅菌を行ってください。乾熱滅菌できないものは、0.1%ジエチルピロカーボネート (DEPC) 溶液で 37℃、12 時間処理した後、オートクレーブ処理を行ってから (DEPC による RNA のカルボキシメチル化を防ぐ) 用いてください。RNA 実験用の器具類は他と明確に区別しておくことが必要です。また、RNase が混入する最も大きな要因は、素手からの持ち込みなので、RNA を用いた実験を行う際には必ずプラスチック手袋とマスクを着用してください。

2. 試薬類の調製法

試薬類は可能な限り 0.1% DEPC 溶液で処理し、オートクレーブにかけてから使用します。オートクレーブできない試薬が含まれている場合には、あらかじめ滅菌操作を行った器具類、水などを用いて溶液を調製した後、ろ過滅菌の操作を行ってからご使用ください。用いる溶液、滅菌精製水はすべて RNA 実験専用としてお使いください。

3. RNA サンプルの調製

純度の高い RNA を調製する必要があります。多糖やタンパク質などの不純物が RNA に混入していると cDNA 合成反応が阻害される可能性があります。また DNA も逆転写酵素の鋳型となり得ますのでゲノム DNA の混入も防ぐ必要があります。組織や細胞からの RNA 調製は、できるだけ早く行ってください。不可能な時は、使用するまで -80℃もしくは液体窒素中で保存してください。

(1) 全 RNA の調製

塩化セシウム密度勾配遠心法やチオシアン酸グアニジンフェノールクロロホルム法 (AGPC 法)、あるいは市販の RNA 分離精製用の試薬、キットを用います。RNAiso Plus (製品コード 9108/9109) NucleoSpin RNA (製品コード 740955.10/.50/.250) など

(2) polyA⁺ RNA の精製 (真核生物の場合)

polyA⁺ RNA は Oligo (dT) Cellulose あるいは Poly (U) Sepharose を用いて、全 RNA から単離する方法が一般的です。Oligotex-dT30 <Super> (製品コード W9021A/B)、Oligotex-dT30 <Super> mRNA Purification Kit (From Total RNA) (製品コード 9086) を用いると高純度の polyA⁺ RNA を容易に回収できます。

(3) RNA の純度検定

最大限の cDNA 合成活性を得るためには、出来るだけ純度の高いインタクトな polyA⁺ RNA サンプルを得ることが重要です。cDNA 合成反応を行う前には、RNA の純度検定を行うことを推奨します。

1) アガロースゲル電気泳動による検定 (全 RNA)

全 RNA 1 ~ 2 μg を熱変性 (65℃、10 分) し、アガロースゲルを用いて電気泳動します。分解の起こっていない全 RNA では 2 本の ribosomal RNA (真核細胞: 28S と 18S、原核細胞: 23S と 16S) のはっきりとしたバンドがおおよそ 2:1 の割合で見られますが、ribosomal RNA のバンドが拡散している場合は、RNase が混入している可能性がありますので使用しないでください。また、28S または 23S のバンドよりも分子量の大きいバンドがある場合は、ゲノム DNA の混入が考えられますので Recombinant DNase I (RNase-free) (製品コード 2270A/B) による処理を行ってから cDNA 合成反応に用いてください。この検定はアジレント 2100 バイオアナライザを用いるとより正確に行えます。

2) 吸光度による検定 (全 RNA および polyA⁺ RNA)

吸光度を測定し、A₂₆₀/A₂₈₀ の比率が 1.7 以下のサンプルは使用しない方が望ましく、比率が 1.8 ~ 2.1 のサンプルを使用することをお勧めします。なお、吸光度測定の際は、10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA (pH7.5) を使用してください。

IV. プロトコール

IV-1. 1st Strand cDNA 合成反応

1. マイクロチューブ内で以下の反応液を調製し、全量を 10 μ l とする。

試薬	使用量
鋳型 RNA (polyA ⁺ RNA)	2 μ g
dNTP Mixture	1 μ l
Oligo (dT) ₁₈ Primer or Random Primer (9 mer)	2 μ l
RNase free dH ₂ O	up to 10 μ l

2. 65°C で 5 分間保温した後、氷上で急冷する。
3. 以下の反応液を加え、全量を 20 μ l にする。

試薬	使用量
2. の溶液	10 μ l
5 × 1st Strand Synthesis Buffer	4 μ l
RNase Inhibitor	1 μ l
PrimeScript RTase	1 μ l
RNase free dH ₂ O	up to 20 μ l

4. 穏やかに攪拌する。
5. 42°C で 1 時間反応を行う。
6. 氷中に移し、2 分間冷却する。

IV-2. 2nd Strand cDNA 合成反応および末端の平滑化

1. 1st Strand cDNA 合成反応後の反応液 20 μ l を含んだマイクロチューブに以下の反応液を加えて、全量を 142 μ l とする。

試薬	使用量
1st Strand cDNA 合成反応後	20 μ l
5 × 2nd Strand Synthesis Buffer	30 μ l
dNTP Mixture	3 μ l
RNase free dH ₂ O	89 μ l
Total	142 μ l

2. さらに、2 μ l の *E. coli* DNA Polymerase と 2 μ l の *E. coli* RNase H / *E. coli* DNA Ligase Mixture を加え、軽く攪拌する。
3. 16°C で 2 時間保温する。
4. 70°C で 10 分間保温する。
5. T4 DNA Polymerase を 4 μ l 加え、軽く攪拌する。
6. 37°C で 10 分間保温する。
7. 15 μ l の 0.25 M EDTA (pH8.0) と、15 μ l の 10% SDS 溶液を加えて攪拌して、反応を停止する。

IV-3. 生成 2nd Strand cDNA の精製

1. 反応停止を行った反応液 180 μ l にフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25:24:1) を 180 μ l 加え、ボルテックスミキサーで 5~10 秒間混合する。
2. 室温で 15,000 rpm、1 分間遠心し、分離した 2 層のうち、上層 (水層) を新しいチューブに移す (中間層を取らないように注意する)。
3. クロロホルム/イソアミルアルコール (24:1) を 180 μ l 加え、ボルテックスミキサーで 5~10 秒間混合する。
4. 室温で 15,000 rpm、1 分間遠心し、分離した 2 層のうち、上層 (水層) を新しいチューブに移す。
5. 10 M 酢酸アンモニウムを 60 μ l 加える。
6. 2.5 倍量のエタノール (600 μ l) を加え、よく混合する。
7. 室温で 10 分間放置する。
8. 4°C で 15,000 rpm、15 分間遠心し、沈殿に注意して上清を除く。
9. 70% エタノールを加え、4°C で 15,000 rpm、5 分間遠心する。
10. 沈殿を残して上清を除き、乾燥する。
11. 沈殿を適当量の TE Buffer に溶解する。
12. -20°C で保存する。

cDNA の合成量が少ない場合には、エタノール沈殿の際に Gen とるくん™ エタ沈キャリア (製品コード 9094) などの共沈剤を添加してください。

2nd Strand cDNA の精製は、スピンカラムクロマトグラフィーやゲルろ過によっても可能です。また、アガロースゲル電気泳動によってサイズセレクションを行い、目的の cDNA を回収することも可能です。

また、この操作手順は鋳型 RNA 量を 2 μ g とした場合について記載してありますが、1st Strand、2nd Strand cDNA 反応とも、鋳型 RNA 量に比例して、cDNA 合成反応時の液量を増加させることができます。

<参考>

用いた鋳型 RNA 量 (polyA ⁺ RNA)	1st Strand cDNA 合成 反応液量	2nd Strand cDNA 合成 反応液量 (酵素溶液を含む)
2 μ g	20 μ l	150 μ l
3 μ g	30 μ l	225 μ l
4 μ g	40 μ l	300 μ l
5 μ g	50 μ l	375 μ l

V. コントロール反応実施例

プロトコールに従って、Control RNA (約 1.4 kb) 2 μ g を鋳型に、Oligo (dT)₁₈ Primer を用いて 1st Strand cDNA 合成反応を行った後、その半量を用いて 2nd Strand cDNA 合成反応および末端平滑化反応を行った。
反応液をフェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿によって精製し、全量を電気泳動に用いた。

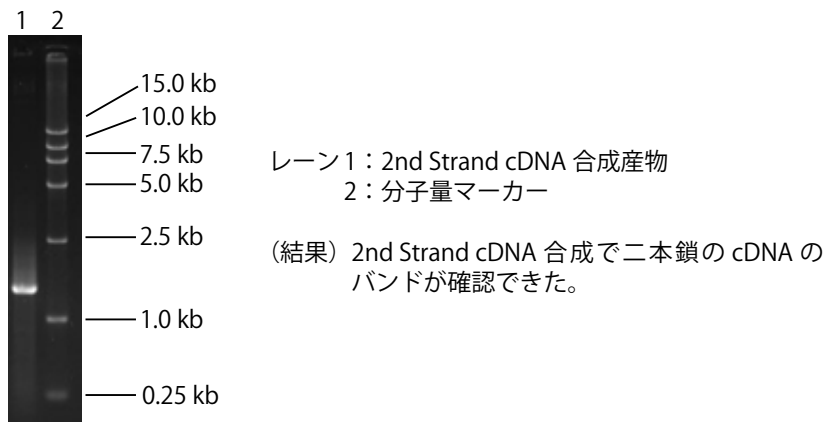


図3. コントロール RNA での反応

VI. 使用例

VI-1. cDNA cloning

アダプターを用いた cDNA cloning

アダプターライゲーション後、Methylation 反応、制限酵素反応を行うことなく、直接ベクターに挿入することができる。ここでは *EcoRI-Not I-BamHI* adaptor を用いた例について述べる。

A. アダプターライゲーション

1. マイクロチューブ中に以下の濃度になるように反応液を調製する。*1

0.01 ~ 0.1 pmol 分	二本鎖 cDNA
cDNA の 100 倍量以上(モル比)	<i>EcoRI-Not I-BamHI</i> adaptor
66 mM	Tris-HCl (pH7.6)
6.6 mM	MgCl ₂
10 mM	DTT
0.1 mM	ATP
350 U	T4 DNA Ligase
Total	10 μ l

2. 16°C で 2 時間~オーバーナイト保温する。*1

* 1 : アダプターライゲーションには、DNA Ligation Kit Ver.1 (製品コード 6021)、DNA Ligation Kit Ver.2.1 (製品コード 6022) あるいは DNA Ligation Kit <Mighty Mix> (製品コード 6023) を用いることもできます。

3. 0.5 M EDTA を 1 μ l 加えて反応を停止する。
4. 等量 (11 μ l) のフェノール/クロロホルムを用いて抽出操作を行う。
5. 1/10 量 (1.1 μ l) の 3 M 酢酸ナトリウム溶液を加える。
6. 2 倍量 (24.2 μ l) のエタノールを加える。
7. -20°C で 30 分間冷却する。
8. マイクロ遠心機で 20 分間遠心する。
9. ペレットを 80% エタノールで洗浄後、真空乾燥を行う。
10. cDNA を適量の TE Buffer に溶解する。

B. アダプター部分のリン酸化反応

1. マイクロチューブ中に以下の濃度になるように反応液を調製する。

50 mM	Tris-HCl (pH8.0)
10 mM	MgCl ₂
5 mM	DTT
0.1 mM	ATP
0.01 ~ 0.1 pmol	アダプター付加二本鎖 cDNA
5 ~ 20 U	T4 Polynucleotide Kinase
Total	50 μ l

2. 37°C で 30 分間保温する。
3. 0.5 M EDTA を 5 μ l 加えて反応を停止する。
4. 70°C で 5 分間保温する。
5. 等量 (55 μ l) のフェノール/クロロホルムを用いて抽出操作を行う。
6. 1/10 量 (5.5 μ l) の 3 M 酢酸ナトリウム溶液を加える。

7. 2 倍量 (121 μ l) のエタノールを加える。
8. -20°C で 30 分間冷却する。
9. マイクロ遠心機で 20 分間遠心する。
10. ペレットを 80%エタノールで洗浄後、真空乾燥を行う。
11. cDNA を適当量の TE Buffer に溶解する。
12. ゲルろ過、スピンカラムクロマトグラフィー、アガロースゲル電気泳動などの操作により、未反応のアダプターを除去する。
13. cDNA 断片の回収を行う。
14. 適当なベクターに挿入する。(一般的には λ -ベクターを用いる。)
(「VI-2. cDNA の λ -ベクターへの挿入」参照)

VI-2. cDNA の λ -ベクターへの挿入

1. マイクロチューブ中に以下のように反応液を加える。

0.01 ~ 0.1 pmol 分	アダプター (リンカー) 付加二本鎖 cDNA 断片
cDNA 断片のモル比の 2 倍量	λ -ベクター DNA (<i>Eco</i> RI 分解脱リン酸化断片)
反応液の 1/10 倍量	3 M 酢酸ナトリウム溶液
反応液の 2 倍量	エタノール

2. -20°C で 30 分間冷却する。
3. マイクロ遠心機で 20 分間遠心する。
4. ペレットを 80%エタノールで洗浄後、真空乾燥を行う。
5. 適当量の TE Buffer に溶解する。
6. cDNA 断片と λ -ベクター DNA の混合した溶液に試薬を加えて以下の組成になるように反応液を調製する。^{*2}

66 mM	Tris-HCl (pH7.6)
6.6 mM	MgCl ₂
10 mM	DTT
0.1 mM	ATP
	cDNA/ λ -ベクター混合液
350 U	T4 DNA Ligase
Total	10 μ l

7. 16°C で 2 時間~オーバーナイト保温する。^{*2}

*2 : λ -ベクターライゲーションには、DNA Ligation Kit Ver.1 (製品コード 6021) あるいは DNA Ligation Kit <Mighty Mix> (製品コード 6023) を用いることもできます。

8. 上記の反応液の一部あるいは全量を用いて市販のキットなどにより *In vitro* packaging 反応を行う。
9. 適当な host に transfection して、培地にプラークを形成させる。
10. プラークハイブリダイゼーションによりスクリーニングを行うなどの操作に用いる。

VII. cDNA 合成能評価

polyA⁺ mRNA ladder (Thermo Fisher Scientific 社) 2 μ g を鋳型に、Oligo (dT)₁₈ Primer を用いて 1st Strand cDNA 合成反応を行った後、その半量を用いて 2nd Strand cDNA 合成を行った。cDNA 合成反応後、1%アガロースゲル電気泳動により cDNA 合成能について分析した。

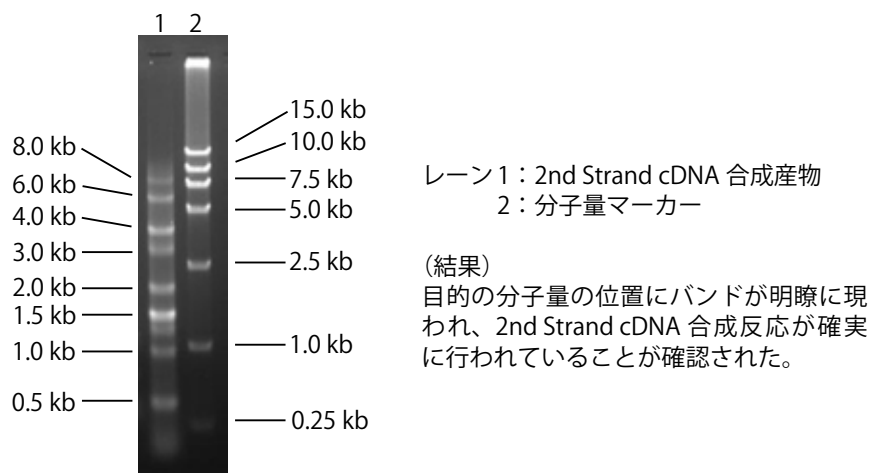


図 4. 電気泳動による cDNA の分析

VIII. トラブルシューティング

製品の品質管理には万全を期しておりますが、万が一実験が正しく行えない場合には、今一度本書の内容をご確認いただき、以下の点についてもご検討ください。

1. Control RNA の利用

このキットには、Control RNA として pSP Tet3 polyA⁺ RNA が含まれていますので、2nd Strand cDNA 合成反応が正しく行えるかどうか調べてください。

2. polyA⁺ RNA の純度チェック

cDNA 合成の効率を最大限に得るためには、インタクトな polyA⁺ RNA ができるだけ高い割合で含まれていることが大切です。cDNA 合成反応に用いる前に、260 nm、280 nm における吸光度の測定 (A₂₆₀/A₂₈₀ の値が 1.8 ~ 2.1 程度が理想的) や、ゲル電気泳動により RNA の純度を調べておくことをお勧めします。

3. RNase の混入

RNA への RNase の混入を避けるよう細心の注意を払うことが大切です。用いる器具、試薬類はできるだけ乾熱滅菌、オートクレーブを行い、必ずプラスチック手袋を装着して実験を行うようにしてください。

IX. 参考文献

- 1) Gubler, U. and Hoffman, B. J. *Gene*. (1983) **25**: 263.
- 2) Wokdnarfliowicz, 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) Haymerle, H., *et al. Nucleic Acids Res*. (1986) **14**: 8615.
- 6) Koike, S., Sakai, M., and Muramatsu, M. *Nucleic Acids Res*. (1987) **15**: 2499.
- 7) Leis, P., *et al. Proc Natl Acad Sci USA*. (1973) **70**: 466.
- 8) Okayama, H. and Berg, P. *Mol Cell Biol*. (1982) **2**: 161.
- 9) Buell, C., *et al. J Biochem*. (1978) **235**: 2471.

X. 関連製品

PrimeScript™ Reverse Transcriptase (製品コード 2680A/B/C)
Recombinant RNase Inhibitor (製品コード 2313A/B)
DNA Polymerase I (*E. coli*) (製品コード 2130A/B)
T4 DNA Polymerase (製品コード 2040A/B)
T4 DNA Ligase (製品コード 2011A/B)
T4 Polynucleotide Kinase (製品コード 2021S/A/B)
Random Primer (nonadeoxyribonucleotide mixture; pd (N)₉) (製品コード 3802)
Adaptor, *EcoR* I-*Not* I-*Bam*HI (製品コード 4510)
dNTP Mixture (製品コード 4030)
pHY Marker (製品コード 3404A/B)
DNA Ligation Kit Ver.1 (製品コード 6021)
DNA Ligation Kit Ver.2.1 (製品コード 6022)
DNA Ligation Kit <Mighty Mix> (製品コード 6023)
RNAiso Plus (製品コード 9108/9109)
NucleoSpin RNA (製品コード 740955.10/.50/.250)
Oligotex-dT30 <Super> (製品コード W9021A/B)
Oligotex-dT30 <Super> mRNA Purification Kit (From Total RNA) (製品コード 9086)
Gen とるくん™エタ沈キャリア (製品コード 9094)
Mupid-2plus (製品コード M-2P)
Mupid-exU (製品コード EXU-1)

XI. 注意

- ・本製品は研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- ・タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ・ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- ・PrimeScript、Gen とるくんはタカラバイオ株式会社の商標です。その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先

テクニカルサポートライン

Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995

ウェブサイト <http://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社