

製品コード 6136

研究用

Takara

cDNA Library Construction Kit

説明書

v201706Da

目次

- I. 製品説明
- II. 内容
- III. 保存
- IV. cDNA 合成反応を行う前の準備、注意点
 - 1. 器具類の滅菌法
 - 2. 試薬類の調製法
 - 3. RNA サンプルの調製
- V. プロトコール
 - V-1. 1st Strand cDNA 合成反応
 - V-2. 2nd Strand cDNA 合成反応および末端の平滑化
 - V-3. アダプターのライゲーション
 - V-4. 制限酵素 *Not*I による消化
 - V-5. スピнкаラムによる短鎖 DNA の除去
 - V-6. ベクターライゲーション
 - V-7. トランスフォーメーション
- VI. 実施例
- VII. トラブルシューティング
- VIII. 補足資料
 - 1. プライマーおよびアダプターの塩基配列
 - 2. pAP3neo ベクターマップ
 - 3. 注意事項
- IX. ライブラリーの利用方法
 - IX-1. ライブラリーの増幅
 - IX-2. スクリーニング (コロニーハイブリダイゼーション) 用メンブレンの調製
- X. 参考文献
- XI. 関連製品
- XII. 注意

I. 製品説明

真核生物の様々な組織や細胞より調製した polyA⁺ RNA から cDNA を合成し、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、頻繁に実施されています。また、この技術により遺伝子の構造解析や目的のタンパク質を発現させる操作が容易に行えるようになりました。

一般的に、cDNA 合成とそのライブラリーは、目的の polyA⁺ RNA に相補的な二本鎖 cDNA を合成してバクテリアやウイルス由来のベクターに組み込んだ後、この組換えベクターを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 の解析を行うためや、更に *in vitro* transcription や *in vitro* translation 等を行うために利用されます。cDNA Library Construction Kit は、主に動植物由来の polyA⁺ RNA より二本鎖 cDNA を合成し、プラスミドベクターへ組み込むことにより cDNA ライブラリーを構築するためのキットです。本キットで使用しているベクター pAP3neo は SV40 プロモーターを有し、哺乳動物細胞での発現が可能です (VIII. 補足資料参照)。

本キットでの cDNA ライブラリーの構築には、Gubler-Hoffman の方法¹⁾に基づいたリンカープライマー法²⁾を使用しており、遺伝子の方向性を維持する Directional cloning が可能です。

システムの原理を次ページ図 1 に示します。

- 1) PrimeScript™ RTase と Oligo (dT)₁₈ Anchor Primer^{1, 3-5)} を用いて 1st Strand cDNA を合成する。1st Strand cDNA 合成時には 5-methyl dCTP を使用する。
- 2) *E. coli* RNase H⁶⁾ で、mRNA-1st Strand 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 cDNA を合成する。^{1, 7)}
- 3) T4 DNA Polymerase により、末端の平滑化を行う。
- 4) アダプターをライゲーション後、Not I にて消化を行う。
- 5) スピнкаラムにより短鎖 DNA を除去する。
- 6) ベクター pAP3neo⁸⁾ とのライゲーション反応を行う。(Directional cloning)
- 7) エレクトロポレーションにより大腸菌へ導入する。
- 8) タイターおよびインサート分布を確認する。

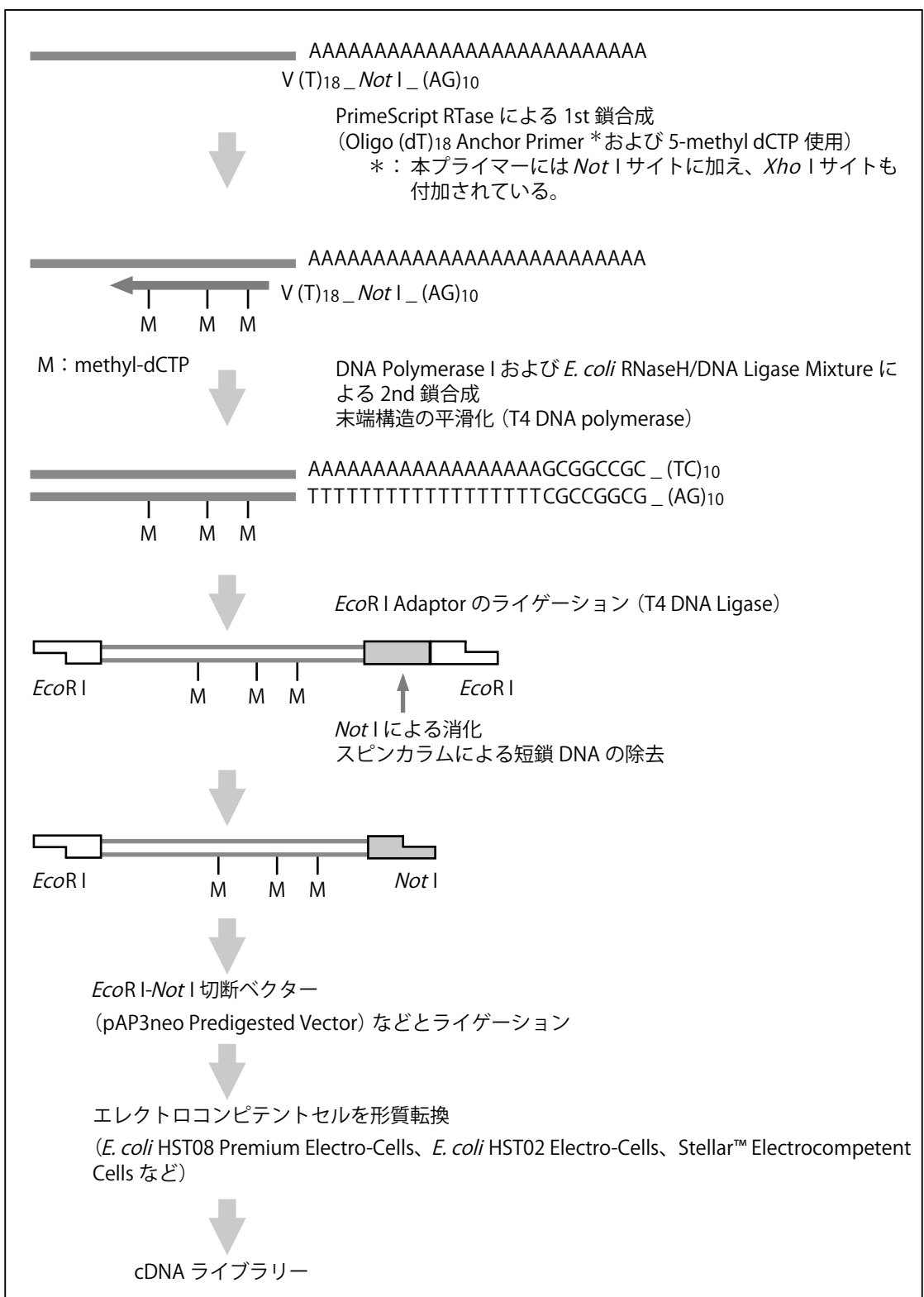


図 1. 本キットを用いた cDNA ライブラリー構築の流れ

II. 内容 (5 回構築分)

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 \times 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 \times 2nd Strand Synthesis Buffer *2	150 μ l
10. T4 DNA Polymerase (1 U/ μ l)	20 μ l
11. 10 \times 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 *3	60 μ l (4°C保存)
18. 3 M Sodium Acetate (pH5.2)	1 ml (4°C保存)
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 *6 (5 pmol/ μ l)	20 μ l
23. T3 promoter primer (for pAP3neo) *6 (5 pmol/ μ l)	20 μ l
Spin Column (CHROMA SPIN™-1000+DEPC-H ₂ O Columns *7)	5 本 (4°C保存)

* 1 : Oligo (dT)₁₈ Anchor Primer には、*Not* I サイトの他に *Xho* I サイトも付加されています (VIII. 補足資料参照)。 *Not* I ではなく *Xho* I 消化を行うことで、*Eco*R I-*Xho* I フラグメントとして二本鎖 cDNA を調製することも可能ですので、これらのサイトを利用したベクター (脱リン酸化されたものは不可) での cDNA ライブラリー構築にも使用できます。なお、本キットには *Xho* I 消化用の酵素などは含まれていませんので、別途用意してください。また、アダプターライゲーション後に *Xho* I 消化を行う場合には、VIII. 補足資料 3. 注意事項をご確認ください。

* 2 : PrimeScript Double Strand cDNA Synthesis Kit (製品コード 6111A) に含まれるものとは組成が異なります。

* 3 : Gen とるくん™エタ沈キャリア (製品コード 9094) と同じものです。

* 4 : *Eco*R I、*Not* I で切断済みです。

* 5 : 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 pSPTet3 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。本キットには 1 反応分 (5 μ g) の Control RNA が含まれます。

なお、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、二本鎖 cDNA が full-length のものであれば、プラスミドはテトラサイクリン耐性になります。

* 6 : インサートチェックおよびシーケンスに使用可能です。配列情報は、VIII. 補足資料を参照。

* 7 : 下蓋は別添付です。

(注) 本製品には形質転換 (エレクトロポレーション法) に必要な大腸菌は含まれておりません。本製品の使用には、メチル化 DNA による形質転換が可能な大腸菌のエレクトロコンピテントセルが必要です。*E. coli* HST08 Premium Electro-Cells (製品コード 9028)、Clontech の Stellar Electrocompetent Cells (製品コード 636765) などを別途ご用意ください。

キット以外に必要な試薬、器具類 (主なもの)

<試薬>

エレクトロポレーション用コンピテントセル：
E. coli HST08 Premium Electro-Cells (製品コード 9028)
Stellar Electrocompetent Cells (製品コード 636765) など
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)
エタノール
TE バッファー (10 mM Tris-HCl/1 mM EDTA, pH8.0)
DNA サイズマーカー
1% アガロースゲル (0.1 µg/ml エチジウムブロマイド含有)
LB 培地
LB/Amp (100 µg/ml) プレート

<器具>

微量遠心機 (マイクロ遠心機)
恒温水槽 (次の各温度設定で使用；温度によっては、サーマルサイクラーも可)；
8°C、12°C、16°C、37°C、42°C、65°C、70°C
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
FALCON チューブ (BD 社 Code. No.352059)
エレクトロポレーション装置・器具類一式
電気泳動装置一式

III. 保存

- [17] Dr. GenTLE Precipitation Carrier、[18] 3 M Sodium Acetate (pH5.2)、Spin Column : 4°C
- その他のコンポーネント : - 20°C

IV. 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ピ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°C 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°C、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°C の冷凍庫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 Guanidinium 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)

(2) polyA⁺ RNA の精製

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)、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°C 、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真核細胞の全 RNA では 2 本の ribosomal RNA (28S と 18S) 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 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 バイオアナライザおよび Agilent RNA6000 Nano LabChip キット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、 A_{260}/A_{280} 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。

V. プロトコール

V-1. 1st Strand cDNA 合成反応

- 1) マイクロ遠心チューブ内で以下の反応液を調製する。

試薬	使用量
[3] Oligo(dT) ₁₈ Anchor Primer*	2 μ l
[5] 1st Strand dNTP Mixture	1.2 μ l
鋳型 RNA (polyA ⁺ RNA)	5 μ g
[20] RNase-free H ₂ O	up to 10 μ l

- 2) 65°Cで5分間加熱後、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
上記鋳型 RNA/Primer mixture	10 μ l
[4] 5 × 1st Strand Synthesis Buffer	4 μ l
[2] RNase Inhibitor	1 μ l
[1] PrimeScript RTase	1 μ l
[20] RNase-free H ₂ O	4 μ l

- 4) 穏やかにピペティングで混合する。
- 5) 42°Cで1時間保温する。
- 6) 氷中に移し、2分間冷却する。

*：本プライマーには *Not*I サイトに加え、*Xho*I サイトも付加されています。

V-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 を含んだマイクロ遠心チューブに以下の反応液を加えて、全量を146 μ l とする。

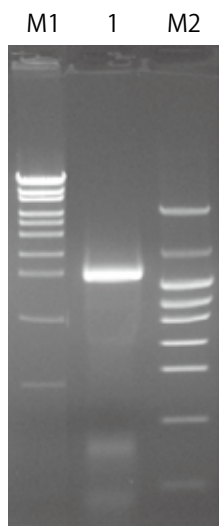
試薬	使用量
[9] 5 × 2nd Strand Synthesis Buffer	30 μ l
[8] 2nd Strand dNTP Mixture	4.5 μ l
[20] RNase-free H ₂ O	87.5 μ l
[6] <i>E. coli</i> RNase H / <i>E. coli</i> DNA Ligase Mixture	2 μ l
[7] <i>E. coli</i> DNA Polymerase I	2 μ l

- 2) 穏やかにピペティングで混合し、16°Cで2時間保温する。
- 3) 70°Cで10分間保温後、室温で5分間放置する。
- 4) [10] T4 DNA Polymerase を4 μ l 加え、穏やかにピペティングする。
- 5) 37°Cで10分間保温する。
- 6) 2nd Strand cDNA 合成反応後の反応液* 150 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150 μ l 加え、ボルテックスミキサーで5~10秒間混合する。
- 7) 室温で15,000 rpm、5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。)
- 8) クロロホルム/イソアミルアルコール (24:1) を150 μ l 加え、ボルテックスミキサーで5~10秒間混合する。
- 9) 室温で15,000 rpm、5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。
- 10) 上清に1/10量の [18] 3 M Sodium Acetate (pH5.2)、4 μ lの [17] Dr. GenTLE Precipitation Carrier、2~2.5倍量のエタノールを添加し、よく混合する。
- 11) 直ちに室温で15,000 rpm、30分間遠心し、沈殿に注意して上清を除く。
- 12) 70%エタノールで沈殿をリンスする。
- 13) 風乾後、沈殿を12.5 μ lの [20] RNase-free H₂O に溶解する。

* : 使用する polyA⁺ RNA が不純物を含む、あるいは分解が疑われる場合は、2nd 鎖合成後、一部を電気泳動し cDNA の伸長や合成量を確認してください。
 これらの polyA⁺ RNA を使用すると cDNA の合成および伸長に影響が出る場合があります。通常、電気泳動パターンはスミアになりますが、cDNA の合成が確認されない場合や低分子へのシフトが確認される場合は、より高純度の RNA サンプルより再度 cDNA を合成することをお勧めします。

<参考：コントロール反応実施例>

プロトコールに従って、5 μg のコントロール RNA (約 1.4 kb) を鋳型に、Oligo (dT)₁₈ Anchor Primer を用いて 2nd Strand cDNA 合成反応まで行った。
 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、一部を電気泳動に用いた。



Lane
 1 : 2nd Strand cDNA 合成産物
 M1 : λ-*EcoT14 I* digest
 M2 : pHY Marker

(結果)
 2nd Strand cDNA 合成で二本鎖の cDNA のバンドが確認できた。

V-3. アダプターのライゲーション

1) V-2.13) の cDNA 溶液 12.5 μl に以下の反応液を加えて、全量を 20 μl とする。

試薬	使用量
[11] 10 × T4 DNA Ligase Buffer	2 μl
[13] <i>EcoR I-Sma I</i> Adapter	3.5 μl
[12] T4 DNA Ligase	2 μl

2) ピペッティングで穏やかに混合し、8°C で一晩以上保温する。
 3) 70°C で 30 分間保温し、更に 5 分間室温に放置する。

V-4. 制限酵素 *Not I* による消化

1) アダプターライゲーション溶液 20 μl に以下の反応液を加え、全量を 50 μl とする。

試薬	使用量
[14] <i>Not I</i> Supplement	27 μl
[15] <i>Not I</i>	3 μl

2) ピペッティングで穏やかに混合し、37°C で 3 時間保温する。

V-5. スピнкаラムによる短鎖 DNA の除去

以下のカラム処理は、400 bp 以下の短鎖 DNA を除去するために行います。

A. スピнкаラムの準備*1

- 1) カラム内のゲルを反転により均一に再懸濁する。
- 2) カラム下部の末端部分を折って取り除き、次に上蓋を取り外す。上蓋および下蓋（別添付）は捨てないように注意する。
- 3) カラム内のバッファーを自然流出させる（溶出には約 10 分を要する）。
- 4) 下蓋を装着し、1 ml の TE バッファーを加える。さらに上蓋を装着し、反転によりカラム内のゲルを均一に再懸濁する。
- 5) 上蓋を取り外した後、下蓋をゆっくり取り外す。上蓋および下蓋は捨てないように注意する。
- 6) A-3) ~ A-4) の操作を再度繰り返す。
- 7) 上蓋および下蓋を取り外し、カラム内のバッファーを自然流出させる。
- 8) 排出液回収用に予め蓋を除去した 1.5 ml チューブを FALCON チューブに設置し、その中にピンセットを用いて静かにカラムをセットする。*2
- 9) スウィングロータータイプの遠心機で $700 \times g$ 、5 分間遠心する。
- 10) 新しく蓋を除去した 1.5 ml チューブを FALCON チューブに設置し、カラムをセットする。

* 1 : スピнкаラムの準備は、*Not I* 消化中に行うことをお勧めします。ただし、ゲル表面の乾燥には注意する必要があります。

* 2 : カラムのゲル内に気泡が入った場合は、下蓋を装着し再度 TE を添加後、上蓋を取り付けゲルを反転により再懸濁し、上記 A-7) に進んでください。

B. 短鎖 DNA の除去

- 1) *Not I* 消化溶液 50 μ l に以下の反応液を加えて混合する。

試薬	使用量
TE バッファー	40 μ l
[16] tRNA	1 μ l

- 2) B-1) で調製した溶液を A で準備したカラム内のゲル表面中央部に 10 μ l ずつ数回に分けてゆっくり添加する。
- 3) スウィングロータータイプの遠心機で $700 \times g$ 、5 分間遠心する。
- 4) カラム溶出液約 100 μ l * を新しい 1.5 ml チューブに移す。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 100 μ l 加え、ボルテックスミキサーで 5 ~ 10 秒間混合する。
- 5) 室温で 15,000 rpm、5 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。)
- 6) クロロホルム/イソアミルアルコール (24:1) を 100 μ l 加え、ボルテックスミキサーで 5 ~ 10 秒間混合する。
- 7) 室温で 15,000 rpm、5 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。
- 8) 上清に 1/10 量の [18] 3 M Sodium Acetate (pH5.2)、4 μ l の [17] Dr. GenTLE Precipitation Carrier、2 ~ 2.5 倍量のエタノールを添加し、よく混合する。
- 9) 直ちに室温で 15,000 rpm、30 分間遠心し、沈殿に注意して上清を除く。
- 10) 70%エタノールで沈殿をリンスする。
- 11) 風乾後、沈殿を 15 μ l の [20] RNase-free H₂O に溶解する。

* : 溶出液が 100 μ l に満たない場合、TE を添加することも可能です。

V-6. ベクターライゲーション

- 1) 以下の反応液を調製し、ベクターとのライゲーション反応を行う。

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

- 2) ピペッティングで穏やかに混合し、12℃で一晩保温する。
- 3) ライゲーション反応液に TE バッファーを 80 μ l 加え、更にフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25 : 24 : 1) を 100 μ l 添加後、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、5 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。)
- 5) クロロホルム/イソアミルアルコール (24 : 1) を 100 μ l 加え、ボルテックスミキサーで 5 ~ 10 秒間混合する。
- 6) 室温で 15,000 rpm、5 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。
- 7) 上清に 1/10 量の [18] 3 M Sodium Acetate (pH5.2)、4 μ l の [17] Dr. GenTLE Precipitation Carrier、2 ~ 2.5 倍量のエタノールを添加し、よく混合する。
- 8) 直ちに室温で 15,000 rpm、30 分間遠心し、沈殿に注意して上清を除く。
- 9) 70%エタノールで沈殿をリンスする。
- 10) 風乾後、沈殿を 20 μ l の TE バッファーに溶解する。
- 11) - 20℃で保存する。

V-7. トランスフォーメーション

- 1) Stellar Electrocompetent Cells を -70°C から出し氷上で溶かす。
- 2) 氷上で冷やしておいた滅菌済マイクロチューブにライゲーション溶液の一部 (0.5 ~ 1.0 μ l) を取り、大腸菌 (40 μ l) を加え、ピペッティングでゆっくりと混合する。
- 3) 速やかに氷上で冷やしておいた 0.1 cm キュベットに移し、電圧パルスを加える。

エレクトロポレーション実施例*1

ライゲーション溶液：0.5 ~ 1.0 μ l

宿主大腸菌：Stellar Electrocompetent Cells

機種：Gene Pulser II (Bio-Rad 社)

パルス条件：1.5 kV, 200 Ω , 25 μ F

(パルス条件はご使用のエレクトロポレーターの取扱説明書もご参照ください。)

- 4) すばやく SOC 培地 (960 μ l) をキュベットに加え、全量を回収する。
- 5) 培養用チューブ (FALCON チューブなど) に移し、37°C にて 1 時間振とう培養する。
- 6) 5) の一部 (1 μ l および 10 μ l 相当) を LB/Amp プレートにプレーティングする。残りの培養液は 4°C で保存する。*2
- 7) 37°C で一晩培養する。
- 8) コロニー数をカウントし、プライマリーライブラリーのタイターを求める。
- 9) [22] T7 promoter primer および [23] T3 promoter primer (for pAP3neo) にてコロニー PCR を行い*3、インサート分布を確認する。PCR による検出が難しい場合は、制限酵素を用いてインサートの分布を確認する。

* 1 : cDNA インサートはメチル化されていますので、形質転換される場合には、*E. coli* HST08 Premium Electro-Cells (製品コード 9028)、Stellar Electrocompetent Cells (製品コード 636765) など、メチル化 DNA による形質転換が可能な大腸菌をご利用ください。また、エレクトロポレーション法を行う際には、大腸菌 50 μ l あたり 4 μ l 以下のライゲーション液を目安に形質転換を行ってください。

* 2 : 4°C での一晩保存は問題ありませんが、それ以上長期の 4°C 保存はお勧めしません。

* 3 : コロニー PCR 条件の例 (10 μ l 反応系)

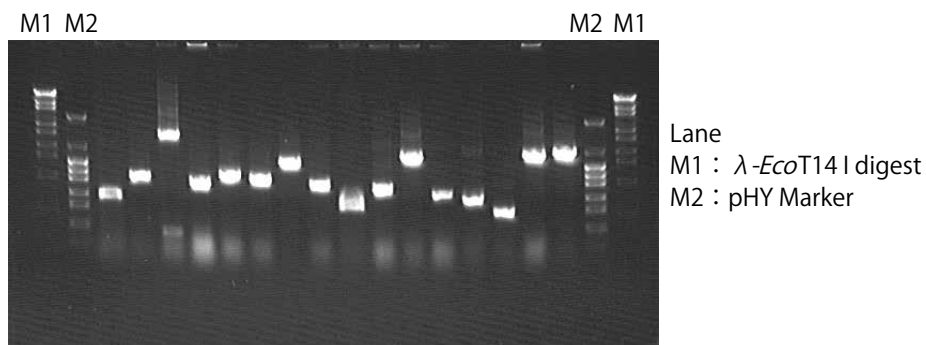
- TaKaRa LA Taq® HS 0.1 μ l (0.5 U)
- 各 Primer 0.5 μ l (各 2.5 pmol)

本キットには 40 反応分のプライマーが入っています。不足する場合は VIII. 補足資料のプライマー塩基配列をご参照の上ご用意ください。

95°C	1 分	} 30 cycles
↓		
94°C	30 秒	
55°C	30 秒	
72°C	3 分	}
↓		
72°C	10 分	

VI. 実施例

プロトコールに従って、Chicken 由来の 5 μ g の polyA⁺ RNA を鋳型として、cDNA ライブラリーを作製した。得られたコロニーからランダムに選択したクローン 16 個について、キット添付のベクタープライマーを用いた PCR によりインサート DNA の増幅を行い、1% アガロースゲル電気泳動により確認した。



VII. 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 pSPTet3 polyA⁺ RNA が含まれていますので、1st Strand および 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。純度の悪い RNA サンプルを使用すると cDNA 合成量や cDNA の伸長、最終的なライブラリーのタイター、インサート長にも影響を及ぼしますので、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。

4. エレクトロポレーションによる形質転換

エレクトロポレーションに用いるライゲーション溶液が多くなると形質転換効率が落ちる場合があります。その場合、最適な形質転換効率が得られる条件を検討し、形質転換を行ってください。

VIII. 補足資料

1. プライマーおよびアダプターの塩基配列

- Oligo (dT)₁₈ Anchor Primer

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

※ 本 Anchor Primer には *Not* I サイトに加えて *Xho* I サイトが付加されています。キット添付の pAP3neo 以外のベクターを使用する場合などに利用可能です。

- *Eco*R I-*Sma* I Adaptor

5'-OH-AATTCCTCGGG-3'

GGGCCC p-5'

- T7 promoter primer

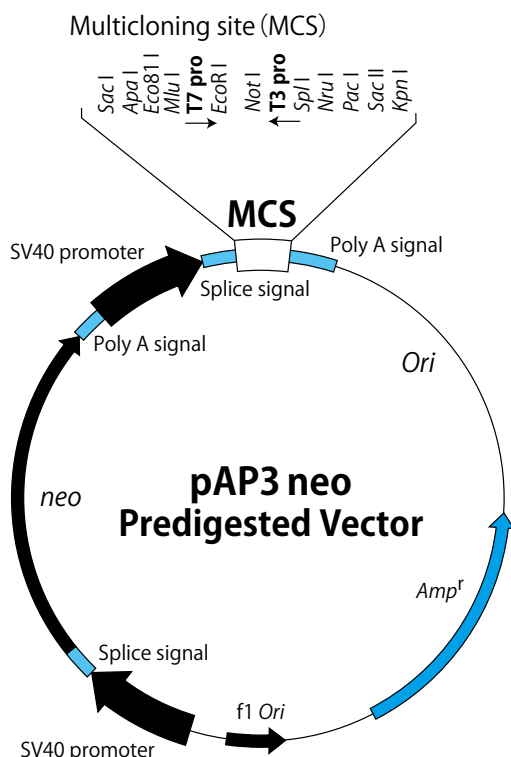
5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'

- T3 promoter primer (for pAP3neo)

5'-ATTAACCCTCACTAAAGGGCG-3'

※ pAP3neo ベクター専用の配列です。

2. pAP3neo ベクターマップ



※ 本キットに含まれる pAP3neo Predigested Vector は、*Eco*R I および *Not* I で切断されています。*Eco*R I 側にはリン酸基が存在しますが、*Not* I 側は脱リン酸処理によりリン酸基が除かれています。

※ 本ベクターの *Eco*R I サイト上流の T7 プロモーターは、*in vitro* transcription 反応に利用できます。

GenBank Accession No. AB 003468

3. 注意事項

Not I 消化の代わりに *Xho* I 消化を行う場合は、V-3. アダプターのライゲーション 1) ~ 3) を行った後、エタノール沈殿により DNA を回収し、制限酵素 *Xho* I (製品コード 1094AH) と添付の H Buffer を用いて 50 μ l 系で 37°C、3 時間程度、消化を行ってください。

IX. ライブラリーの利用方法

IX-1. ライブラリーの増幅

- 1) 必要クローン数を含むプラスミドライブラリー（ライゲーション溶液）をエレクトロポレーションにて *E. coli* HST08 Premium Electro-Cells 等へ導入し、タイターを確認する。（エレクトロポレーションについては、V-7. トランスフォーメーション参照）
- 2) 翌日、φ15 cm LB/Amp プレート（100 μg/ml ampicillin）一枚あたり約5万クローン以下となるようプレーティングを行い、37℃で一晩インキュベートする。
- 3) 生じたプレート上のコロニーに LB/Amp（100 μg/ml ampicillin）を約2 ml *¹ 添加し、スプレッダーおよびピペットで回収する。
- 4) 再度、LB/Amp（100 μg/ml ampicillin）をプレートに約2 ml *¹ 添加し、再回収を行う。
- 5) 得られた菌液にグリセロールを20%となるよう加え、-80℃で保存する。*²
- 6) タイターを確認後、スクリーニングやプラスミド調製などに利用する。

*¹：添加した液体培地の多くがプレートへ吸収される場合、添加量を増やしてください。

*²：保存中にタイターが低下する場合があります。タイターを確認後ご使用ください。

IX-2. スクリーニング（コロニーハイブリダイゼーション）用メンブレンの調製

- 1) 必要クローン数を含むプラスミドライブラリー（ライゲーション溶液）をエレクトロポレーションにて *E. coli* HST08 Premium Electro-Cells 等へ導入し、タイターを確認する。（エレクトロポレーションについては、V-7. トランスフォーメーション参照）
- 2) 翌日、φ15 cm LB/Amp プレート（100 μg/ml ampicillin）一枚あたり約5万クローン以下となるようプレーティングを行い、37℃で6～8時間インキュベートする。コロニーがお互いに接しない程度まで生育させる。
- 3) 生じたプレート上のコロニーにナイロンメンブレンをゆっくり接着させ、コロニーをメンブレンに移行させる。この際、後でメンブレンとプレートの位置を照合できるように針にて穴をあけておく。
- 4) メンブレンを新しい LB/Amp プレート（100 μg/ml ampicillin）へコロニー面を上にして置き、数時間以上培養することによりコロニーを確実に増殖させる。（マスタープレートは数時間培養後、4℃へ保存する。）
- 5) 適当な容器にろ紙*を2枚重ね、0.5 N NaOH を染み込ませる。この上にコロニー面を上にしてメンブレンをゆっくり置き、0.5 N NaOH を染み込ませ30秒以上アルカリ処理をする。
- 6) 新しい2枚重ねのろ紙*に1 M Tris-HCl (pH7.6) を染み込ませる。この上にコロニー面を上にしてメンブレンをゆっくり置き、30秒以上処理する。
- 7) 新しい2枚重ねのろ紙*に1 M Tris-HCl (pH7.6) /1.5 M NaCl を染み込ませる。この上にコロニー面を上にしてメンブレンをゆっくり置き、30秒以上処理する。
- 8) 新しい1 M Tris-HCl (pH7.6) /1.5 M NaCl 中にメンブレンを浸す。手袋をはめ、ゆっくり菌体残渣を洗い流す。
- 9) 新しい1 M Tris-HCl (pH7.6) /1.5 M NaCl にて洗浄する。
- 10) ろ紙にてメンブレンを挟み80℃、2時間処理し、DNA をメンブレン上へ固定する。（UVクロスリンカーを使用してもよい。）
- 11) ろ紙等に挟み埃がかからないようにし、室温にて保存する。
- 12) 上記操作にて作製したメンブレンをコロニーハイブリダイゼーションによるスクリーニングに使用し、目的のクローンを単離することができます。プレハイブリダイゼーション、プローブ調製、ハイブリダイゼーション、洗浄、露光・検出に関しては、一般的な手順および使用するラベリングおよび検出試薬などの取扱説明書に従ってください。

*：コロニー面に液体がかかると、コロニーが流れ落ち良好なシグナル検出ができない場合があるため、メンブレン上部に液体がかからないようにしてください。また、ろ紙とメンブレン間に気泡が入らないよう注意してください。

X. 参考文献

- 1) Gubler, U. and Hoffman, B. J. *Gene*. (1983) **25**: 263.
- 2) 野島博 実験医学別冊 バイオマニュアルシリーズ2「遺伝子ライブラリーの作製法」(1994) p79-94.
- 3) Wokdnar-Filipowicz, A. *et al. Proc Natl Acad Sci USA*. (1984) **81**: 2295.
- 4) Howells, R. D., *et al. Proc Natl Acad Sci USA*. (1984) **81**: 7651.
- 5) Schneider, C., *et al. Nature*. (1984) **311**: 675.
- 6) Leis, P., *et al. Proc Natl Acad Sci USA*. (1973) **70**: 466.
- 7) Okayama, H. and Berg, P. *Mol Cell Biol*. (1982) **2**: 161.
- 8) Kobori, M., Ikeda, Y., Nara, H., Kato, M., Kumegawa, M., Nojima, H., and Kawashima, H. *Genes To Cells*. (1998) **3**: 459-475.

XI. 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)
pHY Marker (製品コード 3404A/B)
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)
E. coli HST08 Premium Electro-Cells (製品コード 9028)
E. coli HST02 Electro-Cells (製品コード 9026)
Stellar™ Electrocompetent Cells (製品コード 636765)
CHROMA SPIN™ -1000+DEPC-H₂O Columns (製品コード 636093/636094)

XII. 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。
- ・*TaKaRa LA Taq* はタカラバイオ株式会社の登録商標です。PrimeScript、Dr. GenTLE、Gen とるくんはタカラバイオ株式会社の、Stellar、CHROMA SPIN は Takara Bio USA, Inc. 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。

組換え大腸菌の取扱いには、適切な処置をとる必要があります。
ご利用の際は、文部科学省が定める省令「研究開発などに関わる遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置を定める省令」平成16年文部科学省・環境省令第1号および組織内の安全委員会の指示に従ってください。

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