Takara Code：D6130

M-MLV RTase cDNA Synthesis Kit （20 μg RNA 用）

说明书

宝生物工程(大连)有限公司

目　　录

内　容	页 码
• 制品说明	1
• 制品内容	1
• 保　存	1
• 试剂盒原理	1
• cDNA 合成反应时的前期准备	3
• 操作方法	3
• 使用例	5
I.　cDNA 的克隆	5
II. 向λ载体中插入 cDNA	8
• cDNA 合成实验例	9
• 注意事项	10

● 制品说明

以原核细胞或者真核细胞的 mRNA 为模板合成 cDNA 后再进行 cDNA 的克隆，是分子生物学研究中的一种重要手段。利用这一技术可以进行基因的构造解析和目的蛋白质的表达研究等。

一般来说，cDNA 的合成以及 cDNA 文库的利用方法是：在合成与目的 mRNA 互补的双链 cDNA 后，将双链 cDNA 与细菌或病毒来源的载体进行重组，再将重组体导入细菌或真核细胞内进行复制、扩增 cDNA，然后再对 cDNA 进行解析，或者再进一步进行体外转录或体外翻译等。

使用本试剂盒无需使用载体/引物系统或利用 S1 核酸酶等除去发卡环结构，只需使用少量的 RNA，便能简便高效地制作成高比例的含有 5'末端序列的全长 cDNA 的基因文库。

● 制品内容（20 μg RNA 用）

1.	Reverse Transcriptase（M-MLV）（200 U/μl）	10 μl
2.	RNase Inhibitor（20 U/μl）	10 μl
3.	Oligo(dT)$_{18}$ Primer（1 μg/μl）	20 μl
4.	Random Primer（9mer）（0.3 μg/μl）	20 μl
5.	5×1st Strand Synthesis Buffer	40 μl
6.	dNTP Mixture（10 mM each）	40 μl
7.	*E. coli* RNase H/*E. coli* DNA Ligase Mixture	20 μl
8.	*E. coli* DNA Polymerase I（20 U/μl）	20 μl
9.	5×2nd Strand Synthesis Buffer	300 μl
10.	T4 DNA Polymerase（1 U/μl）	40 μl
11.	RNase-free H_2O	600 μl×2
12.	Control RNA（1 μg/μl）*	5 μl

*【Control RNA】

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 kbp 的 pBR322 来源的 DNA 片段，其 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 kbp）是带有 30 个 A 碱基的具有 Poly(A)$^+$尾的 RNA。以这种 RNA 为模板合成的双链 cDNA 插入到适当的质粒载体中，如果确实为全长的 cDNA，那这种质粒便可获得四环素抗性。

● 保　　存：-20℃

● 试剂盒原理

Takara 的 cDNA Synthesis Kit 主要是以 Gubler-Hoffman 法为基础构建的，其原理见图 1、图 2，简要说明如下：

1. 在逆转录酶的作用下，利用 Oligo(dT)$_{18}$ Primer 或者 Random Primer 合成 cDNA 的第一条链。
2. 使用 *E. coli* RNase H 使 DNA-RNA 杂合体中的 RNA 链形成单链切口（Nick）。
3. 在 *E. coli* DNA Polymerase I 与 *E. coli* DNA Ligase 的作用下，RNA 链被 DNA 链置换，合成 cDNA 的第二条链。
4. 使用 T4 DNA Polymerase 使双链 cDNA 片段末端平滑。

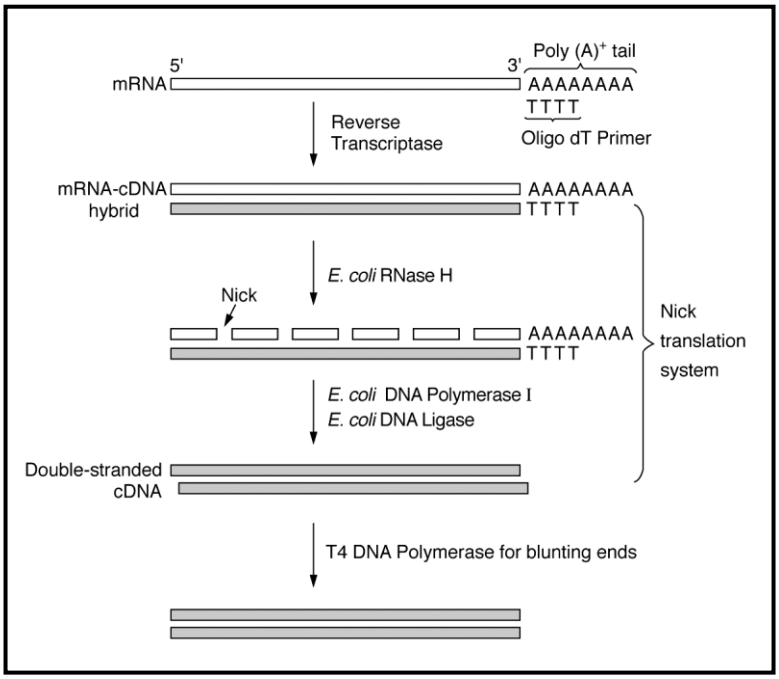


图 1. 使用 Oligo dT Primer 时的 cDNA 合成原理

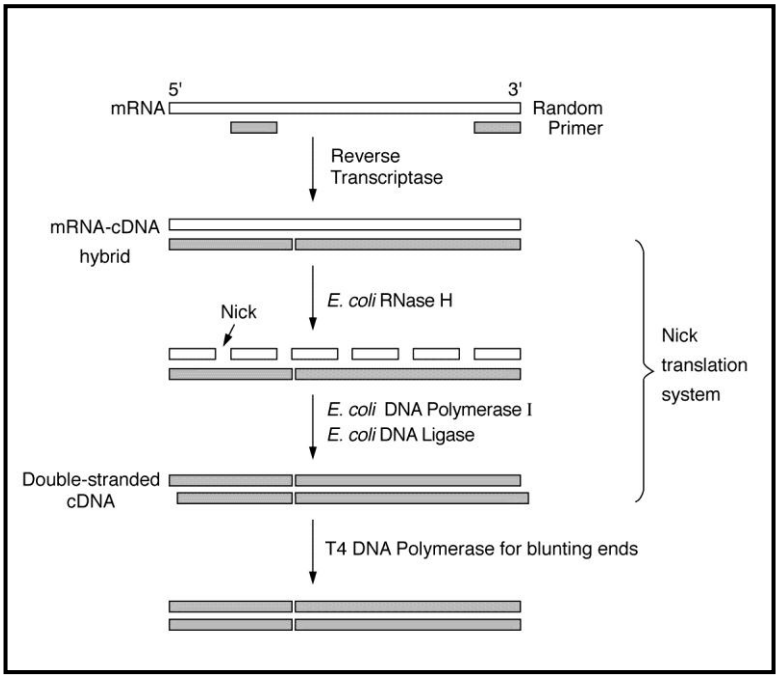


图 2. 使用 Random Primer 时的 cDNA 合成原理

● cDNA 合成反应时的前期准备

A） 实验器材及实验试剂

1. 实验器材

市售的一次性灭菌塑料器材通常被认为是无 RNase 的，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能使用。可以干热灭菌的器材（如玻璃器具等）必须在 160℃干热灭菌 2 小时以上；不能干热灭菌的器材（如塑料制品）须用 0.1% 的 DEPC 溶液在 37℃下处理 12 小时以上后，经高温高压灭菌后使用。做 RNA 实验的器材必须和一般实验器材严格分开。此外，做 RNA 实验时，通过人手混入 RNase 的机率极大，因此，进行实验操作时，一定要戴一次性橡胶手套。

2. 溶液试剂

用于 cDNA 合成反应的溶液试剂尽可能用 0.1% DEPC 进行处理，并在高压灭菌后使用。有些试剂不能高压灭菌时，首先用经过灭菌的器具、水等配制溶液后，再将溶液进行过滤除菌处理。
使用的溶液试剂和蒸馏水都要求 RNA 实验专用。

B） mRNA 的精制和分析

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，也可利用本公司的 Catrimox-14 RNA Isolation Kit（Takara Code：DWA005）来制备总 RNA。

2. Poly(A)$^+$ RNA 的分离

通常采用 Oligo（dT）纤维素或 Poly（U）Sepharose 的亲和层析法将 Poly(A)$^+$ RNA 从总 RNA 中分离出来。

3. Poly(A)$^+$ RNA 的分析

为了得到最大程度的 cDNA 合成活性，获得纯度高且完整的 Poly(A)$^+$ RNA 是极为关键的。建议使用乙二醛/DMSO 或甲醛变性琼脂糖凝胶电泳的方法对制备的 Poly(A)$^+$ RNA 进行分析，检查其完整性。

●操作方法

1st strand cDNA 合成反应

1. 在微量离心管中配制下述反应液，全量 20 μl。

试剂	使用量
Template RNA（poly(A)$^+$RNA）	2 μg
5×1st Strand Synthesis Buffer	4 μl
dNTP Mixture	1 μl
RNase Inhibitor	1 μl
Oligo(dT)$_{18}$ 或 Random Primer	2 μl
Reverse Transcriptase（M-MLV）（200 U/μl）	1 μl
RNase-free H_2O	up to 20 μl

2. 轻柔搅拌混匀。
3. 室温放置 10 分钟后，移至 42℃恒温水浴槽内。
4. 42℃反应 1 小时。
5. 反应结束后置于冰中冷却 2 分钟。

注）当使用二级结构较为复杂的模板 RNA 时，在进行 cDNA 合成反应之前，将 RNA 溶液于 65℃加热 5 分钟后迅速置于冰中，利用这种办法可以减弱二级结构的影响，提高逆转录反应效率。

2nd strand cDNA 合成反应以及末端平滑化

1. 在第一条cDNA链合成后的微量离心管中按下列顺序配制合成cDNA第二条链的反应液，全量为146 μl。

试剂	使用量
合成 cDNA 第一条链的反应液	20 μl
5×2nd Strand Synthesis Buffer	30 μl
dNTP Mixture	3 μl
RNase-free H_2O	89 μl
E. coli DNA Polymerase I	2 μl
E. coli RNase H/*E. coli* DNA Ligase Mixture	2 μl

2. 16℃反应 2 小时。
3. 70℃加热 10 分钟。
4. 加入 4 μl 的 T4 DNA Polymerase，轻轻搅拌。
5. 37℃反应 10 分钟。
6. 加入 15 μl 的 0.25 M EDTA（pH8.0）以及 15 μl 的 10% SDS 溶液，停止反应。

合成的 cDNA 精制

1. 反应停止后反应液总体积为 180 μl，加入等量（180 μl）的苯酚/氯仿/异戊醇（25:24:1）溶液。
2. 剧烈振荡混匀。
3. 在室温下 12,000 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）。
4. 向水相中加入等量（180 μl）的氯仿/异戊醇（24:1）溶液，剧烈振荡混匀。
5. 在室温下 12,000 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。
6. 加入 150 μl 的 4 M CH_3COONH_4。
7. 加入 2.5 倍量的乙醇（825 μl），充分混匀。
8. 室温下放置 10 分钟。
9. 在 4℃下 15,000 rpm 离心 15 分钟，除去上清。
10. 用 70%乙醇清洗沉淀。
11. 用适量的 TE Buffer 溶解。
12. -20℃保存。

注）① 利用这种方法可以极为有效地除去未反应的 dNTP。此外，用 Spin column 层析法或凝胶过滤的方法也可以除去 dNTP。

② 如果采用琼脂糖凝胶电泳胶回收法，不仅可以除去未反应的 dNTP，还可以根据分子量来选择回收目的大小的 cDNA。

③ 以上操作是模板 RNA 为 2 μg 时的反应系统。实际操作时可以根据模板 RNA 的使用量来调整 1st Strand，2nd Strand 的 cDNA 合成反应液量，具体情况如下表。

模板 RNA 量	合成 cDNA 第一条链反应液量（含酶）	合成 cDNA 第二条链反应液量（含酶）
2 μg	20 μl	150 μl
3 μg	30 μl	225 μl
4 μg	40 μl	300 μl
5 μg	50 μl	375 μl

* 此反应液量中包含用于末端平滑的 T4 DNA Polymerase。

●使用例

I. cDNA 的克隆

A） 使用甲基化系统（Methylation System）进行 cDNA 克隆

如果在想要克隆的 cDNA 片段中含有 Linker 所带有的限制酶切位点时，应先用相应的甲基化酶对酶切位点进行甲基化保护，避免 cDNA 片段在 Linker 连接→酶切反应时被限制酶切断，以保证插入到载体中的 cDNA 的完整性。这里介绍的是使用 *Eco*R I 的甲基化系统进行 cDNA 的克隆例。

cDNA 链的甲基化反应

1. 在微量离心管中制备下列反应液（浓度表示值为终浓度）。

试剂	使用量
Tris-HCl（pH8.0）	100 mM
EDTA	10 mM
DTT	2 mM
S-Adenosylmethionine（SAM，腺苷甲硫氨酸）	80 μM
双链 cDNA	0.5~1 μg
Methylase *Eco*R I	20 U
Total	20 μl

2. 37℃反应 1 小时。
3. 用等量（20 μl）的苯酚/氯仿/异戊醇（25:24:1）抽提二次。
4. 加入 1/10 量（2 μl）的 3 M CH_3COONa 溶液。
5. 加入 2 倍量（44 μl）的无水乙醇。
6. -20℃放置 30 分钟。
7. 12,000 rpm 离心 20 分钟。
8. 用 80%乙醇清洗沉淀后真空干燥。
9. 用适量的 TE Buffer 溶解 cDNA。
10. -20℃保存。

Linker 连接以及限制酶反应

1. 在微量离心管中制备下列反应液（浓度表示值为终浓度）。

试剂	使用量
甲基化的 cDNA	0.01~0.1 pmol
p*Eco*R I Linker	cDNA（摩尔数比）的 100 倍量以上
Tris-HCl（pH7.6）	66 mM
$MgCl_2$	6.6 mM
DTT	10 mM
ATP	0.1 mM
T4 DNA Ligase	350 U
Total	10 μl

注）连接反应也可以使用 Takara DNA Ligation Kit Ver.2(Takara Code：D6022)。

2. 16℃反应 2 小时～过夜。
3. 65℃保温 10 分钟。
4. 制备下列反应液，进行 *Eco*R I 酶切反应。

试剂	使用量
操作 3.的 cDNA 溶液	10 μl
10×H Buffer（*Eco*R I 用）	5 μl
*Eco*R I（20~100U）	< 5 μl
H_2O	up to 50 μl

5. 37℃反应 2 小时。
6. 用等量（50 μl）的苯酚/氯仿/异戊醇（25:24:1）抽提 2 次。
7. 加入 1/10 量（5 μl）的 3 M CH_3COONa。
8. 加入 2 倍量（110 μl）的无水乙醇。
9. -20℃冷却 30 分钟。
10. 12,000 rpm 离心 20 分钟。
11. 用 80%乙醇清洗沉淀后真空干燥。
12. 用适量的 TE Buffer 溶解 cDNA 沉淀。
13. 用凝胶过滤、Spin column 层析或凝胶电泳等方法除去未反应的 Linker。
14. 回收 cDNA 片段。
15. 插入至适当的载体中。

B）使用 Adaptor 进行 cDNA 克隆

Adaptor 与 cDNA 进行连接反应后 ,不需要进行甲基化反应和限制酶切反应 ,便可以直接向载体中插入 cDNA 片段。这里介绍的是使用 *Eco*R I-*Not* I-*Bam*H I Adaptor 进行 cDNA 的克隆例。

Adaptor 的连接反应

1. 在微量离心管中制备下列反应液（浓度表示值为终浓度）。

试剂	使用量
双链 cDNA	0.01~0.1 pmol
*Eco*R I-*Not* I-*Bam*H I Adaptor	cDNA（摩尔数比）的 100 倍量
Tris-HCl（pH7.6）	66 mM
$MgCl_2$	6.6 mM
DTT	10 mM
ATP	0.1 mM
T4 DNA Ligase	350 U
Total	10 μl

注）连接反应也可以使用 Takara DNA Ligation Kit Ver.2.0（Takara Code：D6022）。

2. 16℃反应 2 小时～过夜。
3. 加入 1 μl 的 0.5 M EDTA 停止反应。
4. 用等量（11 μl）的苯酚/氯仿/异戊醇（25:24:1）抽提 2 次。
5. 加入 1/10 量（1.1 μl）的 3 M CH_3COONa。
6. 加入 2 倍量（24.2 μl）的无水乙醇。
7. -20℃冷却 30 分钟。
8. 12,000 rpm 离心 20 分钟。
9. 用 80%乙醇清洗沉淀后真空干燥。
10. 用适量的 TE Buffer 溶解 cDNA 沉淀。

Adaptor 的磷酸化反应

1. 在微量离心管中制备下列反应液（浓度表示值为终浓度）。

试剂	使用量
Tris-HCl（pH8.0）	50 mM
$MgCl_2$	10 mM
DTT	5 mM
ATP	0.1 mM
连接 Adaptor 后的 cDNA	0.01~0.1 pmol
T4 Polynucleotide Kinase	5～20 U
Total	50 μl

2. 37℃反应 30 分钟。
3. 加入 5 μl 的 0.5 M EDTA 停止反应。
4. 70℃反应 5 分钟。
5. 用等量（55 μl）的苯酚/氯仿/异戊醇（25:24:1）抽提 2 次。
6. 加入 1/10 量（5.5 μl）的 3 M CH_3COONa。
7. 加入 2 倍量（121 μl）的无水乙醇。
8. -20℃冷却 30 分钟。
9. 12,000 rpm 离心 20 分钟。
10. 用 80%的乙醇清洗沉淀后真空干燥。
11. 用适量的 TE Buffer 溶解 cDNA 沉淀。
12. 用凝胶过滤、Spin column 层析或琼脂糖凝胶电泳等方法除去未反应的 Adaptor。
13. 回收 cDNA 片段。
14. 插入至适当的载体中。

II. 向λ载体中插入 cDNA

1. 在微量离心管中制备下列反应液。

试剂	使用量
带有酶切后的 Linker（或 Adaptor）的双链 cDNA	0.01~0.1 pmol
λ-Vector DNA（*Eco*R I 片段）	cDNA（摩尔数）的 2 倍量
3 M CH_3COONa	反应液 1/10 量
无水乙醇	反应液 2 倍量
Total	50 μl

2. -20℃冷却 30 分钟。
3. 12,000 rpm 离心 20 分钟。
4. 用 80%的乙醇清洗沉淀后真空干燥。
5. 用适量的 TE Buffer 溶解沉淀。
6. 向上述操作 5.溶液中加入下列试剂（浓度表示值为终浓度）。

试剂	使用量
Tris-HCl（pH7.6）	66 mM
$MgCl_2$	6.6 mM
DTT	10 mM
ATP	0.1 mM
T4 DNA Ligase	350 U
Total	10 μl

注）连接反应也可以使用 Takara DNA Ligation Kit Ver.2.0（Takara Code：D6022）。

7. 16℃反应 2 小时～过夜。
8. 取全量或部分连接液，使用市售的试剂盒进行体外包装反应。
9. 转染合适的宿主菌，在平板培养基上形成噬菌斑。

● cDNA 合成实验例

A） 以 0.5~10 kb RNA Ladder(Invitrogen code 15623-200) 1 μg 为模板的 cDNA 合成

使用 Oligo(dT)$_{18}$ Primer 进行 1st Strand cDNA 合成反应后 ,其中半量用于 2nd strand cDNA 的合成以及末端平滑化的反应。上述反应液分别进行苯酚/氯仿处理、乙醇沉淀以及 RNase H 处理后，全量进行 1%的琼脂糖凝胶电泳（结果见图 3）。

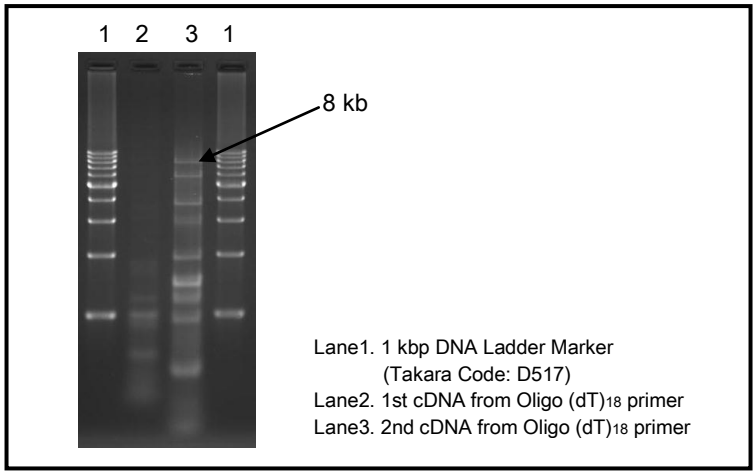


图 3. 0.5~10 kb RNA Ladder 的 cDNA 合成结果

B） 以 Control RNA（约 1.4 kb）2 μg 为模板的 cDNA 合成

使用 Oligo(dT)$_{18}$ Primer 进行 1st Strand cDNA 合成反应后 ,其中半量用于 2nd strand cDNA 的合成以及末端平滑化的反应。上述反应液分别进行苯酚/氯仿处理、乙醇沉淀以及 RNase H 处理后，全量进行 1%的琼脂糖凝胶电泳（结果见图 4）。

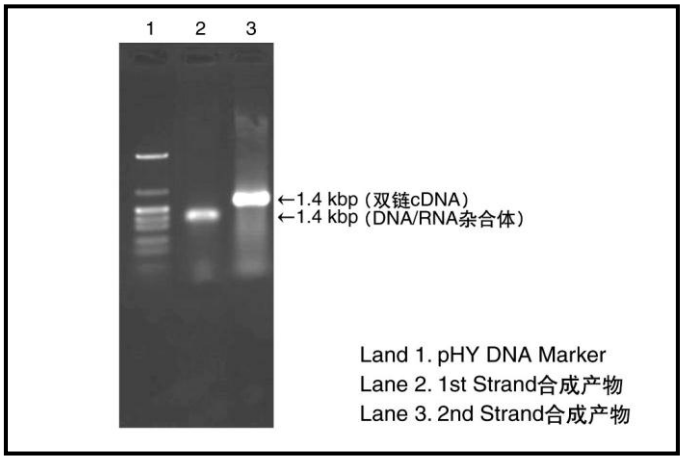


图 4.Control RNA 的 cDNA 合成结果

注）以 1 μg 的 pSP Tet3 RNA Poly(A)$^+$ RNA 为模板，在标准反应条件下，通常能够获得以下的实验结果：

① 从 mRNA 反转录至 1st Strand cDNA 的效率为：＞25%。

② 从 1st Strand cDNA 合成 2nd Strand cDNA 的效率为：＞80%。

●注意事项

1. Control RNA 的使用

   本试剂盒中的 Control RNA（pSP Tet3 Poly(A)$^+$ RNA）可以用于对照实验。用液体闪烁计数器或碱性琼脂糖凝胶电泳法可以确认 1st Strand cDNA 或 2nd Strand cDNA 的合成反应是否顺利进行。

2. mRNA 的纯度检测

   为了能够获得最高的 cDNA 合成效率，尽可能使用完整的 mRNA 是非常重要的。在进行 cDNA 合成反应前，可以通过测定 260 nm 和 280 nm 的吸光度（$A_{260}/A_{280}\geq 1.7$），或使用琼脂糖凝胶电泳法对 RNA 的纯度进行检测。

3. RNase 的污染

   实验时要注意一定不能在 mRNA 的样品中混入 RNase。实验用的器具、试剂等应尽可能进行高温灭菌处理。

   操作时注意戴手套进行。

4. 模板 RNA 的二次结构对反转录反应的影响

   有的 mRNA 由于二次结构的影响而导致反转录效率下降。在这种情况下，应在 cDNA 合成反应前把 RNA 溶液 65℃加热 5 分钟后，放入冰中急冷，然后再进行 cDNA 的合成反应。这样能够减弱二次结构的影响，提高反转录效率。

Note

This product is for research use only. It is not intended for use in therapeutic or diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc.

Takara products may not be resold or transfered, modified for resale or transfer, or used to manufacture commercial products without written approval from TaKaRa Biotechnology (Dalian) Co.,Ltd..

MEMO

技术咨询热线：

0411-87641685，87641686
8008909508，4006518769

宝生物工程（大连）有限公司

TaKaRa Biotechnology (Dalian) Co., Ltd.

辽宁省大连经济技术开发区东北二街 19 号（116600）

No.19 Dongbei 2nd Street, Development Zone, Dalian, China

电　话：0411-87641681 87641683

传　真：0411-87619946 87621675

E.mail：service@takara.com.cn

网　址：http://www.takara.com.cn

V2011. 07