

cDNA Library Construction Kit

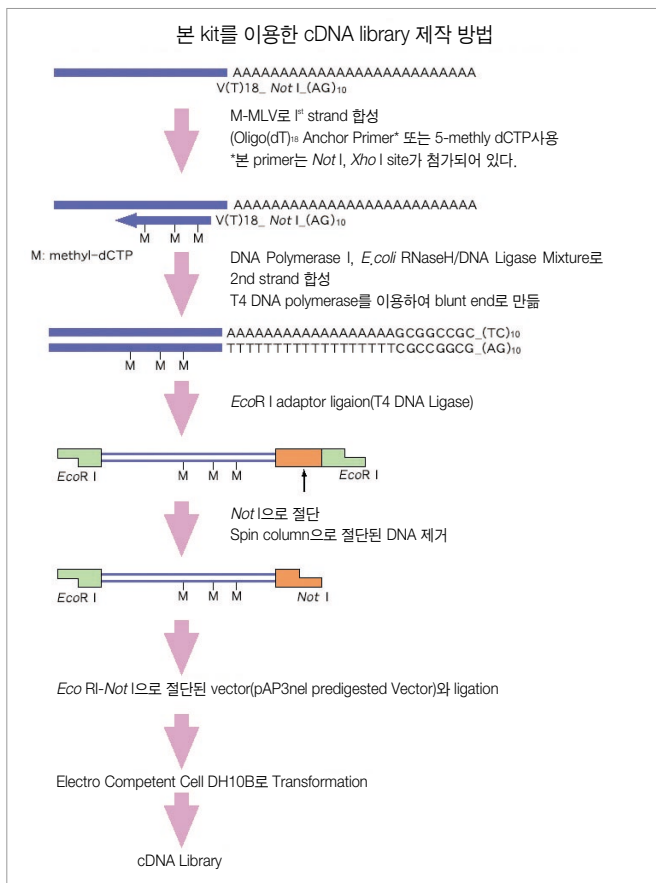
제품명	TaKaRa Code	용량
cDNA Library Construction Kit (with Electro-Cells)	6135	5회
cDNA Library Construction Kit	6136	5회

진핵생물의 여러 조직이나 세포에서 추출한 poly(A)⁺ RNA로부터 cDNA를 합성하여 cloning 하는 것은 분자생물학적 연구에서 중요한 방법중의 하나로 흔히 시행되고 있으며 cloning 후 유전자의 구조 분석이나, 목적 단백질의 발현 조작 등에 이용할 수 있다.

일반적으로, cDNA 합성과 library는 목적하는 poly(A)⁺ RNA에 상보적인 double strand cDNA를 합성하여 박테리아나 바이러스 유래의 vector에 넣은 후, cDNA recombinant를 박테리아 혹은 진핵세포에 도입하여 복제 한 후, cDNA를 증폭시켜 cDNA 해석, *in vitro* transcription, *in vitro* translation 등에 이용된다.

본 제품은 주로 동식물 유래의 poly(A)⁺ RNA에서 double strand cDNA를 합성하여, pAP3neo 등의 plasmid vector에 넣는 cDNA library kit이다. cDNA library 구축에는, Gubler-Hoffman 방법에 기초한 linker primer 방법으로 directional cloning이 가능하다.

본 제품의 원리



Kit의 내용(5회분)

[1]. Reverse Transcriptase (M-MLV)(200 U/ μl)	5 μl
[2]. RNase Inhibitor(20 U/ μl)	5 μl
[3]. Oligo (dT) ₁₈ Anchor Primer(1 μg/ μl) ¹	10 μl
[4]. 5 × 1st Strand Synthesis Buffer ²	40 μl
[5]. 1st Strand dNTP Mixture	6 μl
[6]. E. coli RNase H/E, coli DNA Ligase Mixture	10 μl
[7]. E. coli DNA Polymerase I(20 U/ μl)	10 μl
[8]. 2nd Strand dNTP Mixture ²	23 μl
[9]. 5 × 2nd Strand Synthesis Buffer ²	150 μl
[10]. T4 DNA Polymerase(1 U/ μl)	20 μl
[11]. 10 × T4 DNA Ligase Buffer	20 μl
[12]. T4 DNA Ligase(350 U/ μl)	20 μl
[13]. EcoR I-Sma I Adaptor(0.4 μg/ μl)	18 μl
[14]. Not I Supplement	135 μl
[15]. Not I(50 U/ μl)	15 μl
[16]. tRNA (10 μg/ μl)	5 μl
[17]. Dr. GenTLE Precipitation Carrier ³	60 μl
[18]. 3 M Sodium Acetate(pH5.2)	1 ml
[19]. pAP3neo Predigested Vector(100 ng/ μl) ⁴	5 μl
[20]. RNase-free H ₂ O	640 μl
[21]. Control RNA(1 μg/ μl) ⁵	5 μl
[22]. T7 promoter primer ⁶ (5 pmol/ μl)	20 μl
[23]. T3 promoter primer (for pAP3neo) ⁶ (5 pmol/ μl)	20 μl
Spin column	5개
E. coli DH10B Electro-Cells ⁷	50 μl × 10개
SOC배지 ⁷	1 ml × 10개

*1:Oligo (dT)₁₈ Anchor Primer에는, Not I, Xho I 부위가 있다(Oligo (dT) Anchor Primer:5'-(GA)₁₈CTCGAGCGGCCG(T)₁₈-3' (V = A or C or G)). Xho I으로 절단 하면 EcoR I - Xho I 단편으로 double strand cDNA를 만들 수 있으며 생성된 효소부위를 이용하여 vector (탈 인산화 된 것은 불가)의 cDNA library 구축에 사용할 수 있다. 본 kit에는 Xho I 등 효소는 포함되어 있지 않으므로 별도 판매 제품을 구입해 사용하기 바란다.

*2:cDNA Synthesis Kit (M-MLV Version) (Code 6130) 에 포함된 제품과는 조성이 다르다.

*3:Dr.GenTLE(Code 9094) 와 동일한 제품이다.

*4:EcoR I, Not I 으로 절단된 상태이다.

*5:본 kit에 포함된 Control RNA는 SP6 promoter 영역 하류에 pBR322 유래의 tetracyclin 내성 유전자를 포함한 약 1.4 kb 단편을 삽입한 plasmid pSPTet3를 주

형으로 SP6 RNA Polymerase를 이용해 *in vitro* transcription으로 합성한 것이다. 본 kit에는 1반응 분량(5 µg)의 Control RNA가 포함된다. Control RNA는 30개의 아데닌 염기를 함유한 poly (A)⁺ tail을 가진 약 1.4 kb의 poly(A)⁺RNA로, 이를 주형으로 double strand cDNA를 합성하고 적당한 plasmid에 삽입 했을때 double strand cDNA가 full-length가 되면, plasmid는 tetracyclin 내성을 갖게 된다.

- *6: Insert 확인 및 sequencing에 사용 가능하다.
- *7: TaKaRa Code 6136에는 *E. coli* DH10B Electro-Cells과 SOC 배지가 포함되어 있지 않다. 별도 판매 제품(TaKaRa Code 9029)을 구입해 사용하기 바란다.

보존

- [17], Dr. GenTLE Precipitation Carrier, [18], 3M Sodium Acetate (pH5.2), Spin column: 4°C
- *E. coli* DH10B Electro-Cells : -80°C
- 그 외 kit내 시약류 : -20°C

Kit 이외에 필요한 시약, 기구

< 시약 >

- Phenol/Chloroform/Isoamylalcohol(25:24:1, v/v/v)
- Chloroform/Isoamylalcohol (24:1, v/v)
- Ethanol
- TE buffer(10 mM Tris-HCl/1 mM EDTA, pH8.0)
- DNA size marker
- 1% agarose gel
- LB 배지
- LB/Amp(100 µg/ml) plate

< 기구 >

- Mini centrifuge
- Water Bath: 8°C, 12°C, 16°C, 37°C, 42°C, 70°C
- Electroporator

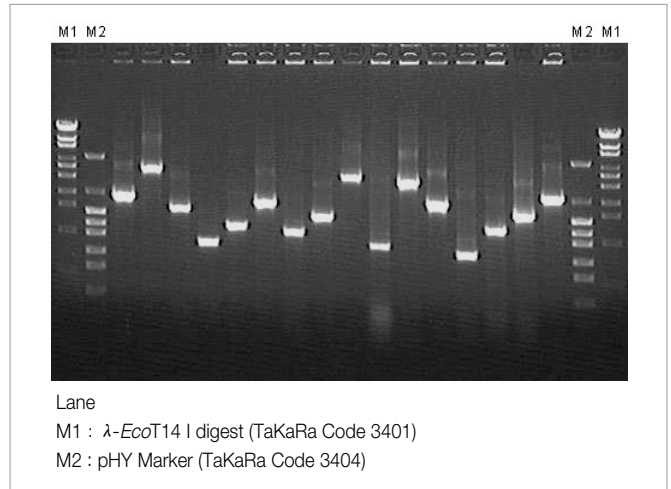
cDNA library construction 후 insert 분포 확인

표준 Protocol에 따라, Chicken 유래의 poly (A)⁺ RNA 5 µg을 주형으로 cDNA library를 제작하였다. 형성된 colony 중 무작위로 16개 선별하고, 첨부된 vector primer(T7, T3 promoter primer(for pAP3neo))를 이용하여 colony PCR로 insert DNA의 분포를 확인하였다.

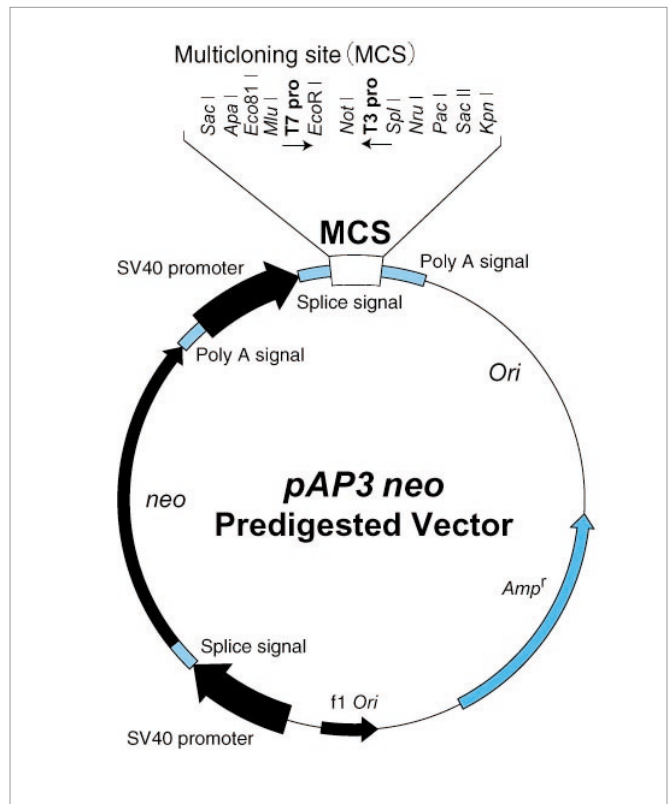
[Colony PCR 조건 (10 µl반응)]

TaKaRa Ex Taq HS 0.1 µl (0.5 U)
 각 Primer 각 2.5 pmol

95°C, 5분
 ↓
 94°C, 30초
 55°C, 30초 } 30cycle
 72°C, 3분
 ↓
 72°C, 10분



pAP3neo Vector map



* 본 Kit에 포함되어있는 pAP3neo Predigested Vector는 EcoRI과 NotI로 절단되어 있다. EcoRI 쪽에는 인산기가 존재하고, NotI에는 탈인산처리를 하여 인산기를 제거하였다.
 * 본 vector의 EcoRI site위에 존재하는 T7 promoter는 *in vitro* transcription에 응용 가능하다.