

Code No. 6111A

研究用

---

**TaKaRa**

PrimeScript™ Double Strand  
cDNA Synthesis Kit

---

说明书

# 目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	2
● 保 存	2
● cDNA 合成反应时的前期准备	2
● 操作方法	3
● Control 反应例	5
● 使用例	5
I. cDNA 的克隆	5
II. 向 $\lambda$ 载体中插入 cDNA	6
● cDNA 合成能力评估	7
● Troubleshooting	8
● 参考文献	8
● 关联产品	9

## ● 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。利用这一技术可以容易地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。

本试剂盒主要以来自植物和动物的 poly (A)<sup>+</sup> RNA 合成双链 DNA。

本试剂盒主要是以 Gubler-Hoffman<sup>1)</sup>法为基础构建的, 其原理见图 1、图 2。

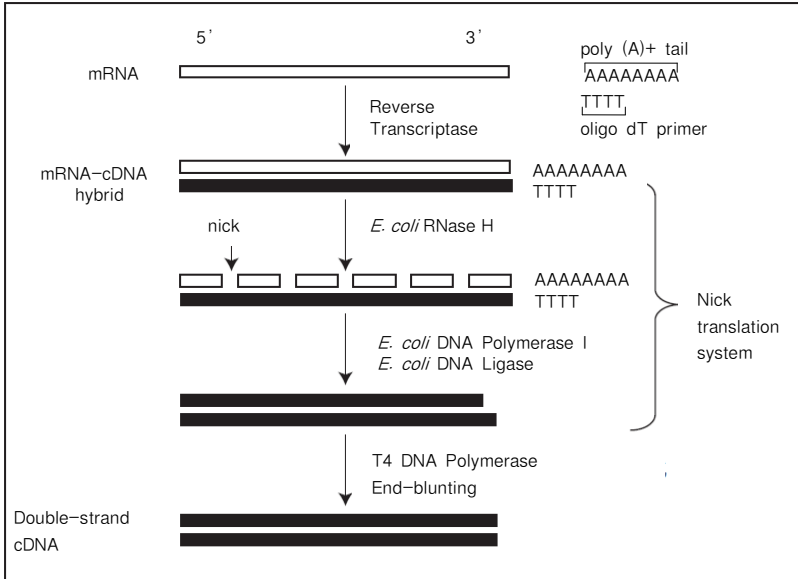


图 1. 使用 Oligo (dT)<sub>18</sub> Primer 时的 cDNA 合成原理

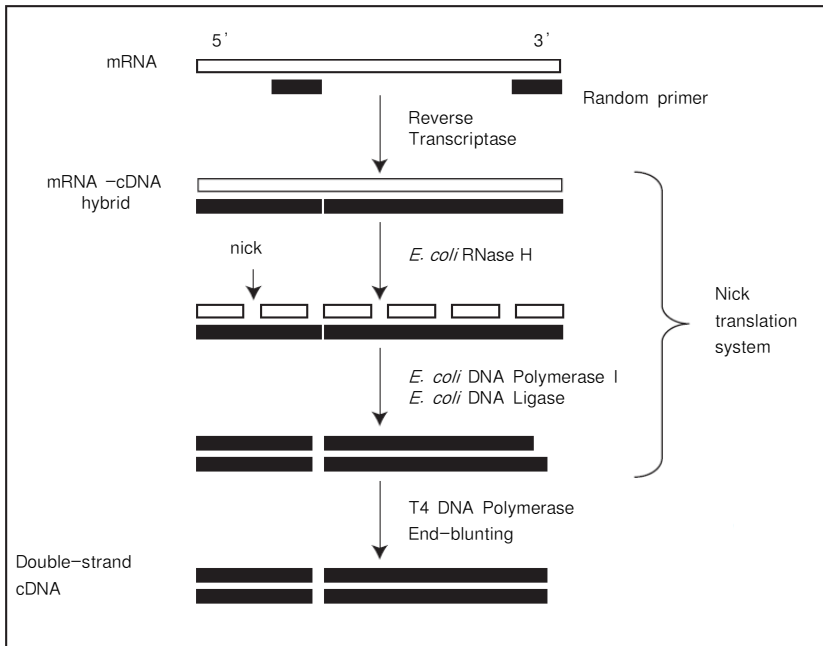


图 2. 使用 Random Primer 时的 cDNA 合成原理

1. 在 PrimeScript RTase<sup>2)</sup> 的作用下, 利用 Oligo(dT)<sub>18</sub> Primer<sup>1-4)</sup> 或者 Random Primer<sup>5, 6)</sup> 合成 cDNA 的第一条链。
2. 使用 *E. coli* RNase H<sup>7)</sup> 使 DNA-RNA 杂合体中的 RNA 链形成单链切口 (Nick)。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。<sup>1, 8)</sup>
3. 使用 T4 DNA Polymerase 使双链 cDNA 片段末端平滑。

## ● 制品内容 (10 次量)

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

### \* 【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 kb 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 kb) 是带有 30 个 A 碱基的具有 Poly(A)<sup>+</sup> 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。

### 【Kit 外所需试剂及仪器】

试剂: 10% (w/v) SDS

0.25 M EDTA (pH8.0)

苯酚/氯仿/异戊醇 (25: 24: 1, v/v)

氯仿/异戊醇 (24: 1, v/v)

10 M 醋酸铵

异丙醇

乙醇

TE Buffer

仪器: 微量离心机 (微型离心机)

42°C 水浴槽 (或 TaKaRa PCR Thermal Cycler 等)

16°C 水浴槽

70°C 水浴槽

37°C 水浴槽

微量移液枪及枪头

Microtube

## ● 保 存: -20°C

## ● cDNA 合成反应时的前期准备

### 1. 实验器材灭菌

商品化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°C 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°C 下处理 12 小时以上后, 经高温高压灭菌后使用 (防止 RNA 被 DEPC 羧甲基化)。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. 溶液试剂处理

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。

## 3. RNA 样品的制备

需要制备高纯的 RNA。若多糖或蛋白质等物质混入 RNA，可能会阻碍 cDNA 合成。另外，要防止 DNA 混入，避免对逆转录产生影响。

尽快从组织和细胞中提取 RNA。若不能及时提取，应于液氮中或 -80°C 冷冻保存。

### (1) 总 RNA 的制备

可以利用硫氰酸胍苯酚氯仿法 (AGPC 法) 方法，也可利用商品化的 RNA 分离纯化试剂、试剂盒来制备总 RNA。

例如：RNAiso Plus (Code No. 9108/9109)

NucleoSpin RNA (Code No. 740955.10/.50/.250)

### (2) Poly(A)<sup>+</sup> RNA 的纯化 (真核生物)

通常采用 Oligo(dT)纤维素或 Poly(U) Sepharose 的亲层析法将 Poly(A)<sup>+</sup> RNA 从总 RNA 中分离出来。可使用适合的试剂或试剂盒回收高纯度 Poly(A)<sup>+</sup> RNA。

### (3) Poly(A)<sup>+</sup> RNA 的纯度分析

为了得到更大程度的 cDNA 合成活性，获得纯度高且完整的 Poly(A)<sup>+</sup> RNA 是非常关键的。cDNA 合成前需对 RNA 纯度进行检测。

#### 1) 琼脂糖凝胶电泳法检测 (total RNA)

1~2 μg total RNA 变性 (65°C、10 分钟) 后进行琼脂糖凝胶电泳。清晰显示出未分解的 total RNA 中的 2 条核糖体 RNA 条带 (真核细胞: 28S 和 18S, 原核细胞: 23S 和 16S), 比例约 2:1。若核糖体 RNA 条带弥散, 则可能已混入 RNase, 请不要使用。

另外, 当有分子量大于 28S 或 23S 的条带出现时, 可能是基因组 DNA 混入, 可使用 Recombinant DNase I (RNase-free) (Code No. 2270A/B) 处理后再进行 cDNA 合成反应。

#### 2) 吸光度法检测 (total RNA 及 Poly(A)<sup>+</sup> RNA)

吸光度测定时, 不建议采用 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 的比值 1.7 或以下的结果, 建议采用比值 1.8~2.1 的结果。

另外, 测定吸光度时, 使用 10 mM Tris-HCl/0.1 mM EDTA (pH7.5)。

## ● 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 10 μl。

试剂	使用量
Template RNA (polyA <sup>+</sup> mRNA)	2 μg
dNTP Mixture	1 μl
Oligo(dT) <sub>18</sub> Primer 或 Random Primer	2 μl
RNase free dH <sub>2</sub> O	up to 10 μl

2. 65°C 温育 5 min 后, 放入冰中急冷。

3. 配制以下反应液加入到上述反应液中, 全量 20 μl。

试剂	使用量
5 × 1st Strand Synthesis Buffer	4 μl
RNase Inhibitor	1 μl
PrimeScript RTase	1 μl
RNase free dH <sub>2</sub> O	4 μl

- 轻柔搅拌混匀。
- 42°C反应 1 小时。
- 反应结束后置于冰中冷却 2 分钟。

#### 2nd strand cDNA 合成反应以及末端平滑化

- 在 1st Strand cDNA 合成反应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142 μl。

试剂	使用量
5 × 2nd Strand Synthesis Buffer	30 μl
dNTP Mixture	3 μl
RNase free dH <sub>2</sub> O	89 μl

- 加入 2 μl *E. coli* DNA Polymerase I 以及 2 μl *E. coli* RNase H / *E. coli* DNA Ligase Mixture，轻轻搅拌。
- 16°C反应 2 小时。
- 70°C加热 10 分钟。
- 加入 4 μl 的 T4 DNA Polymerase，轻轻搅拌。
- 37°C反应 10 分钟。
- 加入 15 μl 的 0.25 M EDTA (pH8.0) 以及 15 μl 的 10% SDS 溶液搅拌，停止反应。

#### 合成的 2nd Strand cDNA 精制

- 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。剧烈振荡 5~10 秒混合。
- 在室温下 15,000 rpm 离心 1 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)。
- 向水相中加入等量 (180 μl) 的氯仿/异戊醇 (24:1) 溶液，剧烈振荡 5~10 秒混合。
- 在室温下 15,000 rpm 离心 1 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。
- 加入 60 μl 的 10 M CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>。
- 加入 2.5 倍量的乙醇 (600 μl)，充分混匀。
- 室温下放置 10 分钟。
- 在 4°C下 15,000 rpm 离心 15 分钟，除去上清。
- 用 70%乙醇清洗沉淀，在 4°C下 15,000 rpm 离心 5 分钟，除去上清。
- 用适量的 TE Buffer 溶解。
- 20°C保存。

- 注) ① cDNA 的合成量减少时，进行乙醇沉淀并添加 Dr. GenTLE Precipitation Carrier (Code No. 9094)。
- ② 可用 Spin column 层析和凝胶过滤对 2nd Strand cDNA 进行提纯。另外，如果采用琼脂糖凝胶电泳回收法，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，具体情况见下表。

模板 RNA 量 (poly (A) <sup>+</sup> mRNA)	1st Strand cDNA 合成 反应液量 (含酶)	2nd Strand cDNA 合成 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

## ● Control 反应例

按照操作方法, 以 2 μg Control RNA (约 1.4 kb) 为模板、使用 Oligo(dT)<sub>18</sub> 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, 全量进行琼脂糖凝胶电泳。

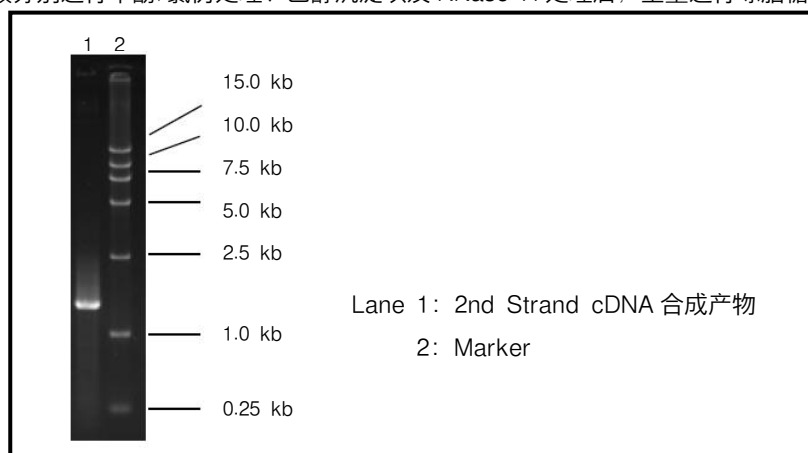


图 3. Control RNA 的 cDNA 合成结果

(结果) 2nd Strand cDNA 合成的双链 DNA 条带得到确认。

## ● 使用例

### 1. cDNA 的克隆

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 *EcoR* 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。\*1

试剂	使用量
双链 cDNA	0.01~0.1 pmol
<i>EcoR</i> I- <i>Not</i> I- <i>Bam</i> H I Adaptor	cDNA (摩尔数比) 的 100 倍量
Tris-HCl (pH7.6)	66 mM
MgCl <sub>2</sub>	6.6 mM
DTT	10 mM
ATP	0.1 mM
T4 DNA Ligase	350 U
Total	10 μl

2. 16°C反应 2 小时~过夜。\*1  
\*1: Adaptor 连接也可使用 DNA Ligation Kit Ver.1 (Code No. 6021)、Ver.2.1 (Code No. 6022) 或 DNA Ligation Kit <Mighty Mix> (Code No. 6023)。
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/异戊醇抽提 2 次。
5. 加入 1/10 量 (1.1 μl) 的 3 M CH<sub>3</sub>COONa。
6. 加入 2 倍量 (24.2 μl) 的无水乙醇。
7. -20°C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。

试剂	使用量
Tris-HCl (pH8.0)	50 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
DTT	5 mM
ATP	0.1 mM
连接 Adaptor 后的双链 cDNA	0.01~0.1 pmol
T4 Polynucleotide Kinase	5~20 U
Total	50 μl

2. 37°C反应 30 分钟。
3. 加入 5 μl 的 0.5 M EDTA 停止反应。
4. 70°C反应 5 分钟。
5. 用等量 (55 μl) 的苯酚/氯仿/异戊醇抽提 2 次。
6. 加入 1/10 量 (5.5 μl) 的 3 M CH<sub>3</sub>COONa。
7. 加入 2 倍量 (121 μl) 的无水乙醇。
8. -20°C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。(一般使用 λ 载体)

#### 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 ( <i>Eco</i> R I 片段去磷酸化)	cDNA (摩尔数) 的 2 倍量
3 M CH <sub>3</sub> COONa	反应液 1/10 量
无水乙醇	反应液 2 倍量
Total	50 μl



2. -20°C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。\*2

试剂	使用量
Tris-HCl (pH7.6)	66 mM
MgCl <sub>2</sub>	6.6 mM
DTT	10 mM
ATP	0.1 mM
T4 DNA Ligase	350 U
Total	10 μl

7. 16°C反应 2 小时~过夜。\*2
- \*2: λ-Vector 连接反应也可使用 DNA Ligation Kit Ver.1 (Code No. 6021) 或 DNA Ligation Kit <Mighty Mix> (Code No. 6023)。
8. 取全量或部分连接液, 使用商品化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。
  10. 利用菌斑杂交进行筛选。

## ● cDNA 合成能力评估

以 2 μg polyA<sup>+</sup> mRNA ladder (Life Technologies) 为模板, 使用 Oligo (dT)<sub>18</sub> Primer 进行 1st Strand cDNA 的合成反应后, 用一半的量进行 2nd Strand cDNA 的合成。合成 cDNA 后, 用 1.0%琼脂糖凝胶电泳对合成的 cDNA 进行分析。

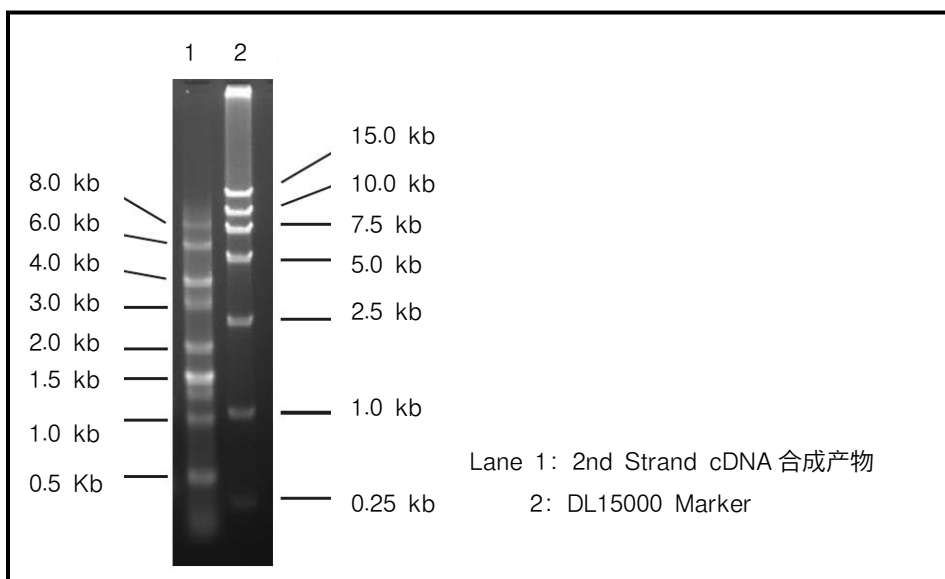


图 4 根据电泳进行 cDNA 分析  
(结果) 目的分子量的位置处条带明显, 双链 cDNA 反应得到确认。

## ● Troubleshooting

如果实验不能正常进行，请按照说明书内容确认实验操作，检验以下几点：

1. Control RNA 的使用  
本试剂盒中的 Control RNA (pSP Tet3 Poly(A)<sup>+</sup> mRNA) 可以用于对照实验，并确认 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  
为了能够获得更高的 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 ( $A_{260}/A_{280}$  在 1.8~2.1 是理想值)，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。操作过程要佩戴手套。

## ● 参考文献

- 1) Gubler U and Hoffman B J. *Gene* (1983) **25**: 263.
- 2) Wokdnarfilipowicz 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.

## ● 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)  
Random Primer (nonadeoxyribonucleotide mixture; pd (N)<sub>9</sub>) (Code No. 3802)  
Adaptor, *Eco*R I-*Not* I-*Bam*H I (Code No. 4510)  
dNTP Mixture (Code No. 4030)  
pHY Marker (Code No. 3404A/B)  
DNA Ligation Kit Ver.1 (Code No. 6021)  
DNA Ligation Kit Ver.2.1 (Code No. 6022)  
DNA Ligation Kit<Mighty Mix> (Code No. 6023)  
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)  
Mupid-2plus (Code No. AD110)  
Mupid-exU (Code No. AD140)

PrimeScript and Dr. GenTLE are trademarks of Takara Bio Inc.

### 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](http://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>

v201902Da