

cDNA ライブラリーの作製

- Smart PCR cDNA Library Construction Kit (CLONTECH) -

0.025-0.5ug poly A RNA, or 0.05-1.0 ug total RNA を使用 (別添のプロトコルで精製する)

1 本鎖 cDNA 合成

- | | |
|-----------------------|-----------|
| 1) RNA solution | 1-3ul |
| SMART IV Oligo | 1ul |
| CDS III/3' PCR primer | 1ul |
| DW | up to 5ul |

混合し、72C, 2 min, then on ice

↓

- | | |
|------------------------|-----|
| 2) 次を加える | |
| 5X first-strand buffer | 2ul |
| DTT | 1ul |
| dNTP | 1ul |
| Reverse transcriptase | 1ul |
| Drop mineral oil | |

↓

- | | |
|------------|--|
| 3) 42C, 1h | |
|------------|--|

PCR による 2 本鎖 cDNA 合成

- | | |
|-----------------------------|------|
| 1) DW | 75ul |
| 10X PCR buffer (FB1 Takara) | 10ul |
| dNTP (Takara) | 8ul |
| 5' PCR primer | 2ul |
| CDS III/3' PCR primer | 2ul |
| HS Tag (Takara) | 1ul |
| First strand cDNA | 2ul |

↓

- | | |
|---|--|
| 2) PCR cycle | |
| 95C 1min, (95C - 15 sec, 68C - 6 min) 18 cycles | |

↓

- | | |
|----------------------------------|--|
| 3) 2ul を電気泳動、cDNA がスメアーに検出されればよい | |
|----------------------------------|--|

cDNA が見えない場合は、4 サイクルさらに回して、電気泳動

Proteinase K, Sfi I 消化

1) 2 本鎖 cDNA 溶液 90ul に proteinase K 3.6ul, DW 5.4ul を加え、45C, 30min 消化

↓

2) Phe/Chl 100ul 加え、2 分緩やかに攪拌。遠心し、上清を回収

↓

3) CIA 100ul 加え、2 分緩やかに攪拌。遠心し、上清を回収

↓

4) エタ沈

サンプル	100ul
3M AcNa	10ul
Glycogen	1.3ul
EtOH	260ul

↓

5) 即座に 14,000rpm, 20 min, at RT 遠心

↓

6) 70% EtOH で洗浄、アルコールを完全にピペットで除去。10 分、風乾

↓

7) 沈殿に DDW 79ul を加え、可溶化

↓

8) 制限酵素消化

サンプル	79ul
10X Sfi buffer	10ul
Sf1 enzyme	10ul
100X BSA	1ul

50C, 2h

サイズセレクション

1) 0.6% アガロース、精製用コームで厚めにゲルを作製する

↓

2) サンプル 100ul に泳動バッファ 20ul を加え、全量を泳動

↓

3) 1kb - 4kb の位置のゲルを切り出す

↓

4) ゲル重量の 3 倍量の Buffer QG (Qiagen: gel extraction kit) を加え、55C で可溶化

↓

- 5) 2本のカラムに添加し、遠心を繰り返して、全量をカラムに通す
↓
- 6) Buffer PE 750 ul でカラムを洗浄
↓
- 7) Buffer EB 50ul で cDNA を回収 (全量 100ul)
↓
- 8) エタ沈

サンプル	100ul
3M AcNa	10ul
Glycogen	1.3ul
EtOH	260ul

 ↓
- 9) 即座に 14,000rpm, 20 min, at RT 遠心
↓
- 10) 70% EtOH で洗浄、アルコールを完全にピペットで除去。10分、風幹

ファージベクターへのライゲーション

- 1) cDNA の沈殿を 4ul DW に溶かす
↓
- 2) 0.5ul を電気泳動し、cDNA の回収を確認
↓
- 3) ライゲーション

	A	B
cDNA	1.0ul	1.5ul
Vector	1.0	1.0
10X ligation buffer	0.5	0.5
ATP	0.5	0.5
T4 DNA ligase	0.5	0.5
DW	1.5	1.0

16C, O.N.

In vitro Packaging

- 1) Gigapack Gold を超低温槽から取り出し、指で暖めて、半解凍。すぐにライゲーション溶液を 4ul 加える。

- ↓
- 2) 22C, 90-120 min インキュベート。2 時間を超さないこと
- ↓
- 3) SM buffer 500 ul, クロロホルム 20ul を加え、緩やかに攪拌。4C 保存

タイトレーション

- 1) XL1 Blue を LB (MgSO₄, マルトース添加) 50 ml で、5 時間培養
(この間に、トップアガーをオートクレーブし、65C に維持する。ボトムアガーを 37C に暖める)
- ↓
- 2) 2000rpm, 10 min 遠心、上澄みを除去
- ↓
- 3) 50 mM MgSO₄ 10ml に菌をサスペンド。2ml を別のチューブに移し、OD=0.5 程度に希釈
- ↓
- 4) ファージ溶液を 1ul 取り、SM buffer 1ul を加える。
- ↓
- 5) 200ul の大腸菌溶液 (OD=0.5) に、希釈したファージ溶液 1ul を加える。37C, 15min 加温
- ↓
- 6) トップアガーを 3ml 加え、攪拌、ボトムアガーの表面に広げる
- ↓
- 7) 37C に 12 時間以上インキュベートする。プラークをカウントする。