

## 1 st strand cDNA 合成

1. 以下の試薬を混合する。

2.

total RNA	x $\mu$ l (5.0 $\mu$ g)
水	y $\mu$ l
10 M AP primer (※)	1.0 $\mu$ l
合計	12.0 $\mu$ l

※ oligo dT primer でも良い。筆者は 3' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends (Invitrogen CAT. NO. 18373-019) に入っている AP primer (5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACT TTT TTT TTT TTT TTT T -3') を用いている。場合によっては 3' RACE も行うことが可能なため。

3. 70°C 10 分放置する。

4. 氷水中でチューブを振って急冷し、0°C 2 分放置する。

+ 5x 1 st strand buffer	4.0 $\mu$ l
+ 0.1 M DTT	2.0 $\mu$ l
+ 10 mM dNTP	1.0 $\mu$ l
+ SuperScript II (Invitrogen)	1.0 $\mu$ l
合計	20.0 $\mu$ l

5. 42°C 1 時間放置する。

6. 50°C 30 分放置する。

7. 70°C 15 分放置する。

8. 1 st strand cDNA 合成終了。増幅する遺伝子によるが、通常は 10  $\mu$ l の系で PCR する時、この cDNA を水か TE で 1/10 に希釈したものを 1  $\mu$ l 用いている。

<以上>