

製品コード 6121

研究用

TAKARA

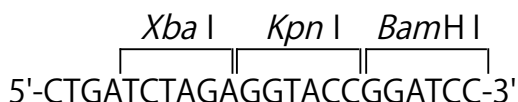
3'-Full RACE Core Set

説明書

v202006Da

RNA の解析において、RT-PCR を利用することにより目的の領域を増幅した後、クローニングやシーケンスを行うことが可能です。しかしながら mRNA から完全長の cDNA を得ることは困難であることが多く、このような場合、得られた cDNA の情報を元にさらに上流や下流をクローニングする RACE (Rapid Amplification cDNA Ends) 法が有効です。

本製品は 3' RACE 法によって mRNA の 3' 末端を含む領域を特異的に増幅するための Core Set であり、*TaKaRa Taq*[™]、*TaKaRa Ex Taq*[®]、*TaKaRa LA Taq*[®] あるいは PrimeSTAR[®] GXL DNA Polymerase などと組合わせて使用できます。本製品の Oligo dT-3sites Adaptor Primer は、polyA⁺ mRNA の 3' 末端からの cDNA 合成を効率よく行えるよう工夫されています。また、3sites Adaptor Primer には *Bam*H I、*Kpn* I、*Xba* I の制限酵素部位があり、クローニングを容易に行うことができます。この際には上流の特異的プライマーの 5' 側にも以下の配列を付加しておくことが必要です。



I. 内容 (20 回分)

| | | | |
|-----|--|-------------------------------|--------|
| 1. | AMV Reverse Transcriptase XL *1 | 5 U/μl | 20 μl |
| 2. | RNase Inhibitor | 40 U/μl | 10 μl |
| 3. | Oligo dT-3sites Adaptor Primer | 2.5 μM | 20 μl |
| 4. | RNase Free dH ₂ O | | 500 μl |
| 5. | 3sites Adaptor Primer | 20 μM | 20 μl |
| 6. | 10 × RNA PCR Buffer *2 | | 40 μl |
| 7. | dNTP Mixture | 各 10 mM | 40 μl |
| 8. | MgCl ₂ | 25 mM | 80 μl |
| 9. | Control F-1-3sites Adaptor Primer (Positive Control RNA 用上流 Primer) | 20 μM | 10 μl |
| 10. | Positive Control RNA (pSPTet 3 プラスミドの転写 polyA ⁺ mRNA) | 2 × 10 ⁵ copies/μl | 10 μl |

* 1 : Avian Myeloblastosis Virus 由来です。

* 2 : 100 mM Tris-HCl (pH8.3)、500 mM KCl

【各プライマーのシーケンス】

- Oligo dT-3sites Adaptor Primer
弊社独自の設計による dT 領域と *Bam*H I、*Kpn* I、*Xba* I の制限酵素部位を含む。
- 3sites Adaptor Primer
5'-CTGATCTAGAGGTACCGGATCC-3'
- Control F-1-3sites Adaptor Primer
5'-CTGATCTAGAGGTACCGGATCCATATCGCCGACATCACCGATG-3'

【Positive Control RNA】

本キットに添付されている Control RNA は、SP6 プロモーター領域下流に pBR322 由来のテトラサイクリン耐性遺伝子を含む約 1.4 kb の断片を挿入したプラスミド pSPTet3 を鋳型として、SP6 RNA Polymerase を用いて *in vitro* transcription により合成を行ったものである。

この Control RNA は、30 個のアデニン塩基よりなる polyA⁺ tail を持つ鎖長約 1.4 kb の polyA⁺ mRNA で、この RNA を鋳型に二本鎖 cDNA を合成して、適当なプラスミドに挿入した際、この二本鎖 cDNA が full-length のものであれば、このプラスミドはテトラサイクリン耐性になる。

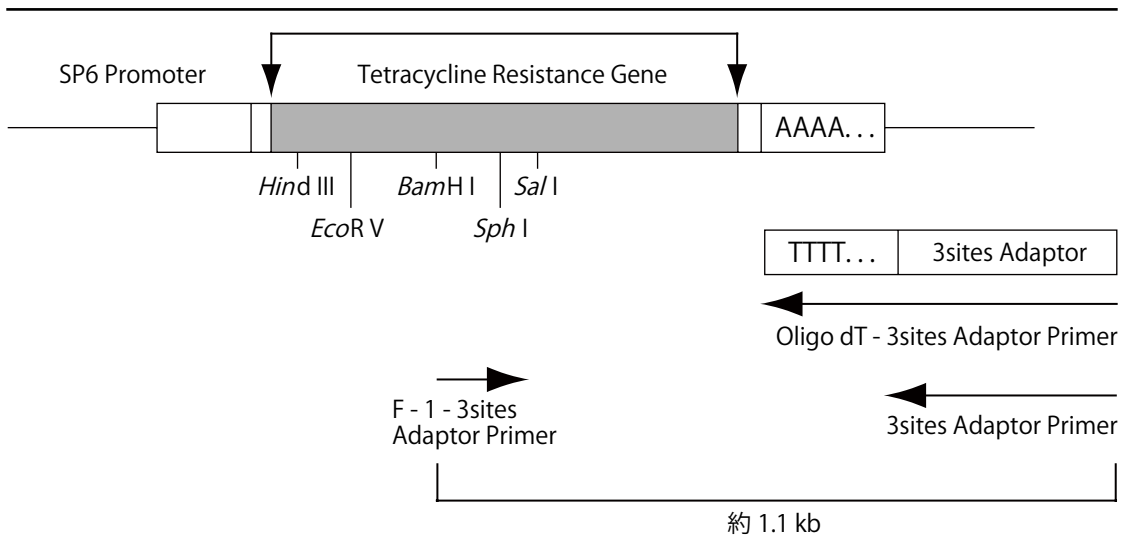


図 1. Positive Control RNA : 各プライマーを用いた際の増幅断片

【3' RACE 法を行うために必要な試薬、機器 (主なもの)】

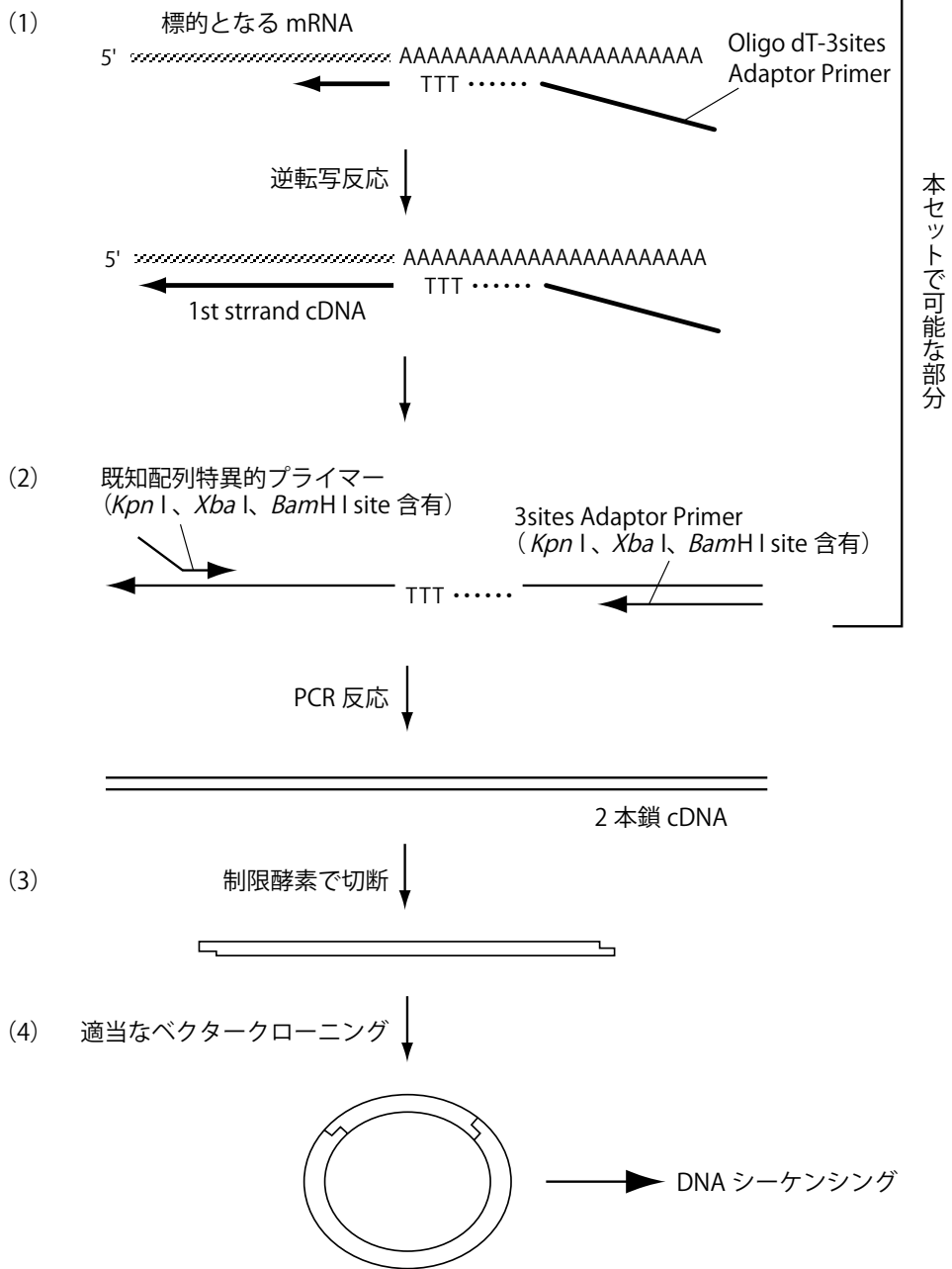
- 本製品
- 既知領域特異的上流プライマー
プライマーの合成は下記にお問い合わせください。
タカラバイオ(株)受託窓口 TEL: 077-565-6999
- PCR 用酵素
 - TaKaRa Taq* (製品コード R001A/B/C)
 - TaKaRa Taq Hot Start Version* (製品コード R007A/B)
 - TaKaRa Ex Taq* (製品コード RR001A/B/C)
 - TaKaRa Ex Taq Hot Start Version* (製品コード RR006A/B)
 - TaKaRa LA Taq* (製品コード RR002A/B)
 - TaKaRa LA Taq Hot Start Version* (製品コード RR042A/B)
 - PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (製品コード R050A/B)
 - PrimeSTAR Max DNA Polymerase (製品コード R045A/B)

などより選択できます。
- サーマルサイクラー
 - TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® Gradient (製品コード TP600)
 - TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice *Touch* (製品コード TP350) など
- マイクロ遠心機
- マイクロピペットおよびチップ (オートクレーブ処理したもの)

II. 保存

– 20℃

III. 原理



- (1) 目的とする mRNA に Oligo dT-3sites Adaptor Primer を用いて逆転写反応を行い、1st strand cDNA を合成する。
- (2) *Kpn* I、*Xba* I、*Bam*HI site 含有既知配列特異的上流プライマーと 3sites Adaptor Primer で PCR を行う。
- (3) PCR 産物を制限酵素 (*Kpn* I、*Xba* I、または *Bam*HI) で切断する。
- (4) 適当なベクターにクローニングし、DNA シーケンシングを行う。

IV. RNA サンプルの調整について

本製品は mRNA の 3' 末端からの cDNA 合成を行うセットです。cDNA 合成を成功させるためには純度の高い RNA サンプルを得ることが大切です。そのためには、細胞内に含まれる RNase の作用を抑えること、また使用する器具や溶液などの外部からの RNase の混入を避けることが大切です。

RNA 調製にあたっては、実験者の汗や唾液に含まれる RNase を防ぐため作業中は不必要に話さず、清潔なディスポーザブルグローブを着用し、RNA 調製専用の実験台を設けるなどの細心の注意を払ってください。

【器具】

実験器具に関しては、可能な限りディスポーザブルのプラスチック製品を使用してください。

一般のガラス器具は以下の処理を行ってから使用してください。

- (1) ガラス器具を 0.1% ジエチルピロカーボネート (DEPC) 溶液で、37°C、12 時間処理する。
- (2) 残っている DEPC を除去するために、オートクレーブ (120°C、30 分) する。

RNA 実験に用いる器具 (プラスチックおよびガラス) は、他の器具と区別して RNA 専用として用いることをお勧めします。

【溶液】

実験に用いる溶液は、乾熱滅菌 (180°C、60 分) したガラス器具で調製し、可能ならば 0.1% DEPC 処理を行いオートクレーブしたものを用います。反応に用いる精製水も上記のように処理することをお勧めします。

用いる溶液、精製水はすべて RNA 実験専用としてお使いください。

【RNA サンプルの調製法】

RT-PCR に用いる RNA サンプルは、通常少量の RNA があればよい場合が多いので簡便な精製法が用いられることもありますが、できれば GTC 法 (グアニジンチオシアネート法) 等で高純度に精製した RNA を用いることをお勧めします。

組織、細胞からの抽出には RNAiso Plus (製品コード 9108/9109) や NucleoSpin RNA (製品コード 740955.10/.50/.250) を用いると、短時間で高純度の total RNA を調製することができます。

1 回の反応に用いる RNA サンプル量は、total RNA として約 1 μ g の量が最適です。また、total RNA からの mRNA の調製には、*Oligotex-dT30 <Super>* (製品コード W9021)、*Oligotex-dT30 <Super>* mRNA Purification Kit (From Total RNA) (製品コード 9086) を用いると、迅速かつ効率的に mRNA を回収することができます。

V. 操作上の注意

本キットを使用する場合の注意事項です。使用前に必ずお読みください。

1. Reverse Transcriptase、RNase Inhibitor 等、酵素類の攪拌は泡立てないようにゆるやかに行ってください。
また、ピペッティングの前に試薬を軽く遠心して、チューブの底に落としてください。
酵素類は、50% グリセロール溶液で粘度が高いため、注意深くゆっくりとピペッティングを行ってください。
2. 酵素類は使用直前まで -20°C で保存し、使用後は直ちに -20°C に保存してください。
3. Positive Control RNA は分解を防ぐためにできる限り凍結、融解は避けてください。少量ずつ分注後保存することをお勧めします。また、可能であれば -70°C ～ -80°C での保存をお勧めします。
4. 試薬の分注を行うときは必ず新しいディスポーザブルチップを用い、サンプル間のコンタミネーションを極力防止してください。

VI. 操作

< VI-1. 一般的なプロトコール >

A. 逆転写反応 (例)

1. 下記に示す反応液を調製する。

| 試薬 | 使用量 | 最終濃度 |
|--|-------------------|-----------------------|
| 10 × RNA PCR Buffer | 2 μl | 1 × |
| MgCl ₂ (25 mM) | 4 μl | 5 mM |
| dNTP Mixture (各 10 mM) | 2 μl | 1 mM |
| AMV Reverse Transcriptase XL (5 U/ μl) | 1 μl | 0.25 U/ μl |
| RNase Inhibitor (40 U/ μl) | 0.5 μl | 1 U/ μl |
| Oligo dT-3sites Adaptor Primer (2.5 μM) | 1 μl | 0.125 μM |
| Positive Control RNA (2 × 10 ⁵ copies/ μl) or Experimental sample (total RNA 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) * | 1 μl | |
| RNase Free dH ₂ O | 8.5 μl | |
| Total | 20 μl | |

* : Experimental sample は発現量の少ない RNA の場合、9.5 μl まで反応系に持ちこむことができます。

2. 調製済みのチューブをサーマルサイクラーにセットし、次のプログラムで反応を行う。

| | | |
|----------------------------|--------------|-----------|
| 30 $^{\circ}\text{C}$ | 10 min. | } 1 cycle |
| 42 ~ 60 $^{\circ}\text{C}$ | 15 ~ 30 min. | |
| 95 $^{\circ}\text{C}$ | 5 min. | |
| 5 $^{\circ}\text{C}$ | 5 min. | |

B. PCR 反応 (例)

PCR 反応には以下の PCR 酵素を用いることができます。

効率のよい PCR に： *TaKaRa Ex Taq*、*TaKaRa Ex Taq Hot Start Version*

長鎖の増幅に： *TaKaRa LA Taq*、*TaKaRa LA Taq Hot Start Version*

正確な PCR に： PrimeSTAR GXL DNA Polymerase、PrimeSTAR Max DNA Polymerase

スタンダードな PCR に： *TaKaRa Taq*、*TaKaRa Taq Hot Start Version*

1. 下記に示す反応液を調製する

TaKaRa Taq の場合

| 試薬 | 使用量 | 最終濃度 |
|---|----------|------------|
| 10 × PCR Buffer (Mg ²⁺ Free) * 1 | 4 μl | 0.8 × |
| MgCl ₂ (25 mM) * 2 | 3 μl | 2.5 mM |
| <i>TaKaRa Taq</i> (5 U/μl) | 0.25 μl | 0.025 U/μl |
| 上流 PCR プライマー (20 μM) * 2 | 0.5 μl | 0.2 μM |
| 3sites Adaptor Primer (20 μM) | 0.5 μl | 0.2 μM |
| 前項 RT 反応液 | 10 μl | |
| 滅菌精製水 | 31.75 μl | |
| Total | 50 μl | |

[注意] *TaKaRa Taq* を用いる場合は PCR 反応の際に dNTP Mixture を新たに加える必要はありません。

TaKaRa Ex Taq、*TaKaRa LA Taq* の場合

| 試薬 | 使用量 | 最終濃度 |
|---|----------|------------|
| 10 × <i>Ex Taq</i> Buffer (Mg ²⁺ plus) * 3 or 10 × LA PCR Buffer II (Mg ²⁺ plus) * 3 | 5 μl | 1 × |
| dNTP Mixture (2.5 mM) | 8 μl | 0.6 mM |
| <i>TaKaRa Ex Taq</i> or <i>TaKaRa LA Taq</i> (各 5 U/μl) | 0.25 μl | 0.025 U/μl |
| 上流 PCR プライマー (20 μM) * 2 | 0.5 μl | 0.2 μM |
| 3sites Adaptor Primer (20 μM) | 0.5 μl | 0.2 μM |
| 前項 RT 反応液 | 10 μl | |
| 滅菌精製水 | 25.75 μl | |
| Total | 50 μl | |

PrimeSTAR GXL DNA Polymerase の場合

| 試薬 | 使用量 | 最終濃度 |
|-------------------------------|-------------|--------|
| 5 × PrimeSTAR GXL Buffer | 10 μl | 1 × |
| dNTP Mixture (2.5 mM) | 4 μl | |
| PrimeSTAR GXL DNA Polymerase | 1 μl | |
| 上流 PCR プライマー (20 μM) * 2 | 0.5 μl | 0.2 μM |
| 3sites Adaptor Primer (20 μM) | 0.5 μl | 0.2 μM |
| 前項 RT 反応液 | 5 μl 以下 * 4 | |
| 滅菌精製水 | | |
| Total | 50 μl | |

* 1 : Mg²⁺ を含む Buffer を使用する場合は、MgCl₂ の添加は不要です。その場合は滅菌精製水の添加量を増やして反応液量が 50 μl になるようにしてください。

- * 2 : Positive Control RNA の場合、Control F-1-3sites Adaptor Primer
- * 3 : 10 × *Ex Taq* Buffer (Mg²⁺ free) を用いる場合は 25 mM MgCl₂ を 4 μl、10 × LA PCR Buffer II (Mg²⁺ free) を用いる場合は 25 mM MgCl₂ を 5 μl 加え、滅菌精製水の量を減らして反応液量が 50 μl になるようにしてください。
- * 4 : 25 ~ 750 ng RNA 相当量の cDNA が使用可能です。

2. 調製したチューブをサーマルサイクラーにセットし、次のプログラムで反応を行う。

| |
|---|
| <i>TaKaRa Taq</i> 、 <i>TaKaRa Ex Taq</i> 、 <i>TaKaRa LA Taq</i> の場合 |
|---|

| | | |
|-------|-----------------|-------------|
| 反応条件： | 94°C 30 sec. | } 30 cycles |
| | 55°C 30 sec. | |
| | 72°C 2 min. | |

| |
|---|
| PrimeSTAR GXL DNA Polymerase、PrimeSTAR Max DNA Polymerase の場合 |
|---|

| | | |
|-------|-----------------|-------------|
| 反応条件： | 98°C 10 sec. | } 30 cycles |
| | 55°C 15 sec. | |
| | 68°C 2 min. | |

3. 反応終了後、反応液の一部 (5 μl) をアガロース電気泳動で確認する。目的の増幅フラグメント (Positive Control RNA を用いた場合：約 1.1 kb) が確認できる。

【PCR 条件について】

- Annealing 温度
コントロール RNA の場合、55°Cで行っていますが、実際のサンプルは条件が変わりますので、37 ~ 65°Cの範囲で至適温度を調べてください。
- Extension time
Extension time はターゲットの長さに影響されます。通常 *TaKaRa Taq*、*TaKaRa Ex Taq*、*TaKaRa LA Taq* は、72°Cで1 kbあたり1 ~ 2分を目安に設定してください。

< VI-2. 実験例 –ヒトトランスフェリンレセプター mRNA の 3' 領域のクローニング–>

HL60 由来 total RNA を用いてヒトトランスフェリンレセプター mRNA をターゲットにして 3' RACE 法をおこなった。

【RT 反応】

| 試薬 | 使用量 |
|---|--------|
| 10 × RNA PCR Buffer | 2 μl |
| MgCl ₂ (25 mM) | 4 μl |
| dNTP Mixture (各 10 mM) | 2 μl |
| RNase Inhibitor (40 U/μl) | 0.5 μl |
| AMV Reverse Transcriptase XL (5 U/μl) | 1 μl |
| Oligo dT 3sites Adaptor Primer (2.5 μM) | 1 μl |
| total RNA (HL60 由来 1 μg/μl) | 1 μl |
| RNase Free dH ₂ O | 8.5 μl |
| Total | 20 μl |

反応条件：

| | | |
|------|---------|-----------|
| 30°C | 10 min. | } 1 cycle |
| 50°C | 30 min. | |
| 95°C | 5 min. | |
| 5°C | 5 min. | |

【PCR 反応】

| 試薬 | 使用量 |
|---|----------|
| <i>TaKaRa LA Taq</i> 添付 10 × LA PCR Buffer II (Mg ²⁺ free) | 5 μl |
| 25 mM MgCl ₂ | 5 μl |
| dNTP Mixture (各 2.5 mM) | 8 μl |
| <i>TaKaRa LA Taq</i> (5 U/μl) | 0.25 μl |
| 上流特異的プライマー (20 μM) * | 0.5 μl |
| 3sites Adaptor Primer (20 μM) | 0.5 μl |
| 上記 RT 反応液 | 10 μl |
| 滅菌精製水 | 20.75 μl |
| Total | 50 μl |

* : 5' 末端に *Bam*HI site を含む配列を付加したプライマーを用いた。

反応条件：

| | | |
|------|---------|-------------|
| 94°C | 30 sec. | } 30 cycles |
| 55°C | 30 sec. | |
| 72°C | 2 min. | |



アガロースゲル 1%電気泳動 (8 μl/lane)

1 : 3' RACE PCR 産物 (約 1.5 kb)

M : λ *Hind* III digest

【PCR産物の回収】

DNA回収用フィルター付き遠心チューブを使用してPCR産物を精製

【制限酵素処理】

制限酵素切断 BAP 処理済みプラスミドベクター pUC118 *Bam*HI/BAP (製品コード 3321) にサブクローニングするため、*Bam*HI 処理を行なった。

[PCR産物]

| 試薬 | 使用量 |
|-------------------------------|------------|
| 増幅 DNA (0.3 μ g/ μ l) | 2 μ l |
| <i>Bam</i> HI (10 U/ μ l) | 1 μ l |
| 10 × Buffer K | 5 μ l |
| H ₂ O | 42 μ l |
| Total | 50 μ l |

反応条件：30℃、1時間

【ライゲーション】

pUC118 *Bam*HI/BAP と *Bam*HI 処理増幅 DNA (約 1.5 kb) をライゲーションした。
(DNA Ligation Kit Ver.2.1 (製品コード 6022) 使用)

| 試薬 | 使用量 |
|--------------------------------|----------------------|
| 増幅 DNA | 6.5 μ l (200 ng) |
| pUC118 BAP 処理 DNA (製品コード 3321) | 0.5 μ l (50 ng) |
| Enzyme Solution I 液 | 7 μ l |
| Total | 14 μ l |

反応条件：16℃、1時間

【形質転換】

E. coli JM109 Competent Cells (製品コード 9052) にトランスフォーメーションを行った後、アンピシリン、IPTG、X-Gal を含む LB 寒天培地にプレートし、37℃、18時間培養。白色コロニーを拾った。
インサートの確認されたコロニーを LB 培地で培養後、プラスミドを回収した。この塩基配列解析を行った結果、目的のフラグメントが挿入されていることが確認された。

VII. 参考文献

- 1) Kawasaki, E. S. and Wang, A. M.
PCR Technology (Erlich, H. A. ed). *Stockton Press*. (1989) 89-97.
- 2) Lynas, C., Cook, S. D., Laycock, K. A., Bradfield, J. W. B., and Maitland, N. J.
J Pathology. (1989) **157**: 285-289.
- 3) Frohman, M. A., Dush, M. K., and Martin, G. R. *Proc Natl Acad Sci USA*. (1988) **85**: 8998-9002.

VIII. 関連製品

TaKaRa Taq[™] (製品コード R001A/B/C)
TaKaRa Taq[™] Hot Start Version (製品コード R007A/B)
TaKaRa Ex Taq[®] (製品コード RR001A/B/C)
TaKaRa Ex Taq[®] Hot Start Version (製品コード RR006A/B)
TaKaRa LA Taq[®] (製品コード RR002A/B)
TaKaRa LA Taq[®] Hot Start Version (製品コード RR042A/B)
PrimeSTAR[®] GXL DNA Polymerase (製品コード R050A/B)
PrimeSTAR[®] Max DNA Polymerase (製品コード R045A/B)
Reverse Transcriptase XL (AMV) for RT-PCR (製品コード 2630A)
Recombinant RNase Inhibitor (製品コード 2313A/B)
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (製品コード 740609.10/.50/.250)
RNAiso Plus (製品コード 9108/9109)
NucleoSpin RNA (製品コード 740955.10/.50/.250)
Oligotex-dT30 <Super> (製品コード W9021A/B)
Oligotex-dT30 <Super> mRNA Purification Kit (From Total RNA) (製品コード 9086)

IX. 注意

- ・本製品は研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- ・タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ・ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- ・*TaKaRa Ex Taq*、*TaKaRa LA Taq*、PrimeSTAR、Thermal Cycler Dice はタカラバイオ株式会社の登録商標です。*TaKaRa Taq* はタカラバイオ株式会社の商標です。その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先

テクニカルサポートライン

Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995

ウェブサイト <http://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社