

製品コード 6215A

研究用

---

**Takara**

**PrimeScript™ IV**  
**1st strand cDNA Synthesis Mix**

---

説明書

v201909Da

## I. 概要

PrimeScript IV 1st strand cDNA Synthesis Mixは、total RNAまたはpolyA<sup>+</sup> RNAから1st strand cDNAを合成するための製品です。1st strand cDNA合成に必要な逆転写酵素 PrimeScript IV RTase、RNase Inhibitor、Oligo dT Primer、dNTP Mixture および反応 Buffer がプレミックス化されているため、鋳型 RNA と水を添加するだけで簡単かつ迅速に実験を開始できます。

本製品はアクセサリタンパク質の添加によりバッファー組成を改良し、従来必要であった逆転写反応前の RNA 変性操作を行う必要がありません。

また、PrimeScript IV RTase は従来製品よりも短時間で cDNA 合成を行うことができます。

さらに耐熱性の向上により高温での逆転写反応が可能であり、Gene Specific Primer からの cDNA 合成効率と特異性の向上等に威力を発揮します。

本製品により合成された 1st strand cDNA は、2nd strand 合成、ハイブリダイゼーション、PCR 法による増幅、完全長 cDNA ライブラリーの作製など、高品質で完全長の cDNA が必要なアプリケーションに適しています。また、本製品付属の Random 6 mers を使用することにより polyA<sup>+</sup> を含まない RNA からの cDNA 合成や発現解析に適したリアルタイム PCR 用の cDNA 合成も可能です。

## II. 内容 (20 $\mu$ l 反応・50 回分)

1. 5×PrimeScript IV cDNA Synthesis Mix* <sup>1</sup>	200 $\mu$ l
2. Random 6 mers (50 $\mu$ M)* <sup>2</sup>	100 $\mu$ l
3. RNase Free H <sub>2</sub> O	1 ml × 2

### ■ 各プライマーのシーケンス

プライマー名	シーケンス
Random 6 mers	pd(N) <sub>6</sub>
Oligo dT Primer	弊社独自の設計による dT 領域の配列* <sup>3</sup>

\* 1 : PrimeScript IV RTase、RNase Inhibitor、Oligo dT Primer、dNTP Mixture および反応バッファー (Mg<sup>2+</sup>含有) を含む。

\* 2 : polyA を含まない RNA から cDNA を合成、またはリアルタイム PCR 用の cDNA 合成、RNA の全領域を均等に cDNA 合成する場合に反応系に添加する。

\* 3 : 本配列は TaKaRa RNA PCR™ Kit (AMV) Ver.3.0 (製品コード RR019A/B) の Oligo dT Adaptor Primer とは異なり、M13 Primer M4 配列を含みません。

### 本製品以外に必要な試薬、機器 (主なもの)

1. 恒温装置  
ヒートブロック (サーマルサイクラーでも代用可能)
2. 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)

## III. 保存

− 20℃

## IV. 1st strand cDNA 合成反応

[標準プロトコール]

1. 下記に示す反応液を氷上にて調製する。

< 1 反応あたり >

試薬	使用量
5×PrimeScript IV cDNA Synthesis Mix	4 $\mu$ l
Random 6 mers (50 $\mu$ M)	$\leq 2 \mu$ l *1*2
鋳型 RNA	total RNA : $\leq 5 \mu$ g polyA <sup>+</sup> RNA : $\leq 1 \mu$ g
RNase Free H <sub>2</sub> O	X $\mu$ l
	20 $\mu$ l

2. 穏やかに攪拌し、以下の条件で反応を行う。

30°C            10分 (Random 6 mers 使用時のみ)

42°C            10 ~ 20分 \*3

3. 95°C、5分または70°C、15分で酵素を失活させた後、氷上で冷却する。\*4

\* 1 : ランダムプライマーで2 kb未満のcDNAを合成する場合は1 ~ 2  $\mu$ l、2 kb以上のcDNAを合成する場合は0.4 ~ 1  $\mu$ lのRandom 6 mersを反応系に添加することをお勧めします。Random 6 mers 使用時には、反応の最初に30°C、10分のプレヒートのステップを加えてください。

\* 2 : 合成にはGene Specific Primerも使用可能です。その場合、最終濃度0.1  $\mu$ Mとなるように反応系に添加してください。

\* 3 : PrimeScript IV RTaseは高次構造にも強い伸長性を示すので、通常の場合は42°Cを推奨します。複雑な高次構造を持つRNAからcDNAを合成する場合、特に逆転写プライマーにGene Specific Primerを使用する場合、逆転写反応温度を45 ~ 55°Cにすることで改善が見られることがあります。

\* 4 : 長鎖cDNAを増幅する場合、cDNAへのダメージを避けるため70°C、15分の失活操作を行ってください。

---

## V. RT-PCR を行う場合

1st strand cDNA 合成反応液はそのまま PCR の鋳型として使用することができます。その場合、1st strand cDNA 合成反応液の PCR 反応への持込みは、PCR 反応液量の 1/10 量以下となるようにしてください。また、鋳型量が PCR の増幅効率に影響する場合がありますので、使用する PCR 酵素の取扱説明書を参考にして適切な鋳型量を検討することをお勧めします。

RT-PCR において非特異的な増幅が生じた場合や、増幅産物が得られない場合には、cDNA 合成反応液を RNase H 処理することによって PCR 増幅が改善されることがあります。推奨する PCR 酵素、リアルタイム PCR 試薬と RNase H については、VII. 関連製品の項をご覧ください。

## VI. RNA サンプルの調製について

本製品は RNA から cDNA 合成を行うキットです。cDNA 合成を成功させるためには、サンプルに含まれる RNase の作用を極力抑えること、また使用する器具や溶液など外部からの 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 の混入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。

### [ 溶液 ]

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 ]

RNA サンプルは、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。

下記の RNA 抽出キットを用いて、短時間で高純度の total RNA を調製することもできます。RNA サンプルは、最終的に滅菌精製水または TE Buffer 溶液となるように調製してください。

RNAiso Plus (製品コード 9108/9109)

NucleoSpin RNA (製品コード 740955.10/.50/.250)

---

## VII. 関連製品

### <サーマルサイクラー>

TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® *Touch* (製品コード TP350)  
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® *Gradient* (製品コード TP600)

### <消耗品>

0.2 ml シングルチューブ  
0.2 ml Hi-Tube Dome Cap (製品コード NJ200)  
0.2 ml Single-Tube Dome Cap (製品コード NJ204)  
0.2 ml Single-Tube Flat Cap (製品コード NJ205)  
0.2 ml 8 連チューブ&キャップ  
0.2 Hi-8-Tube/Dome Cap/Flat Cap (製品コード NJ300/NJ301/NJ302)  
TaKaRa PCR Micro Strip 8-Tube/Cap (製品コード 9148/9149)

### <RNA 精製>

RNAiso Plus (製品コード 9108/9109)  
NucleoSpin RNA (製品コード 740955.10/.50/.250)  
RNase-free Water (製品コード 9012)  
Ribonuclease H (RNase H) (製品コード 2150A)  
Recombinant DNase I (RNase-free) (製品コード 2270A/B)

### <PCR 酵素>

高成功率、高特異性の PCR に

Tks Gflex™ DNA Polymerase (製品コード R060A/B)

正確な PCR に

PrimeSTAR® Max DNA Polymerase (製品コード R045A/B)  
PrimeSTAR® HS DNA Polymerase (製品コード R010A/B)  
PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase (製品コード R050A/B)

高感度、高収量の PCR に

*TaKaRa Ex Taq*® (製品コード RR001A/B)  
*TaKaRa Ex Taq*® Hot Start Version (製品コード RR006A/B)

長鎖の増幅に

*TaKaRa LA Taq*® (製品コード RR002A/B)  
*TaKaRa LA Taq*® Hot Start Version (製品コード RR042A/B)

### <リアルタイム PCR >

Probe qPCR Mix (製品コード RR391A/B)  
Probe qPCR Mix, with UNG (製品コード RR392A/B)  
TB Green® Fast qPCR Mix (製品コード RR430S/A/B)  
TB Green® Premix *Ex Taq*™ II (Tli RNaseH Plus) (製品コード RR820A/B/L/W)

## VIII. 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。
- Thermal Cycler Dice、PrimeSTAR、*TaKaRa Ex Taq*、*TaKaRa LA Taq*、TB Green はタカラバイオ株式会社の登録商標です。PrimeScript、Tks Gflex、TaKaRa RNA PCR 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**