

製品コード R026A

研究用

TAKARA

PrimeScript™ II
High Fidelity One Step RT-PCR Kit

説明書

v202408Da

I. 概要

PCR (Polymerase Chain Reaction) は、目的とする DNA 領域をはさむ 2 種類のプライマーを用いて特定の DNA 塩基配列を増幅する反応です。PCR 法は原理的に DNA を増幅する反応であり、RNA は直接の鋳型とはなりません。逆転写反応によって RNA から cDNA を合成後、目的領域を PCR 増幅する (RT-PCR) ことで、RNA の解析に PCR 法を応用することが可能となります。現在までにこの RT-PCR 法により RNA の構造解析、効率の良い cDNA クローニング、RNA レベルでの発現解析など数多くの分野での応用が報告されています。

PrimeScript II High Fidelity One Step RT-PCR Kit は、正確性の高い RT-PCR を一本のチューブ内で連続的に行う 1 step RT-PCR 用のキットです。逆転写酵素には伸長性に優れ完全長 cDNA 合成に威力を発揮する PrimeScript II RTase を、また PCR には、正確性が高く、長鎖や GC リッチな cDNA の PCR 増幅にも卓越した性能を示す PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase を 1 step RT-PCR 用に最適化して使用しています。

その結果、広範な濃度の RNA から、逆転写反応 10 分、PCR における伸長時間 10 秒/kb の高速条件下で、増幅しにくい長鎖や GC リッチ領域を含む様々なターゲットに対して、極めて簡便迅速に正確な cDNA 増幅産物を得ることが可能となりました。

本製品は次のような特長を示します。

- コンタミネーションのリスクを軽減する 1 ステップ反応で、RNA から正確、簡便にターゲットの増幅ができる。
- 逆転写反応 10 分、PCR 伸長時間 10 秒/kb の高速反応が可能
- GC リッチ、長鎖 cDNA 増幅に対応
- 反応に使用できる total RNA 量の許容範囲が広く、使いやすい。

本製品には、逆転写反応による RNA からの cDNA 合成および PCR による cDNA 増幅に必要なすべての試薬が含まれます。

II. 内容 (50 回用)

- | | |
|---|-----------------|
| 1. PrimeScript II RT Enzyme Mix | 50 μ l |
| 2. PrimeSTAR GXL for 1 step RT-PCR | 200 μ l |
| 3. 2 × One Step High Fidelity Buffer | 625 μ l × 2 |
| 4. Control F-1 primer*1 (20 μ M) | 10 μ l |
| 5. Control R-1 primer*2 (20 μ M) | 10 μ l |
| 6. Positive Control RNA (2 × 10 ⁵ copies/ μ l) | 20 μ l |
| 7. RNase Free dH ₂ O | 625 μ l × 2 |

* 1 : Positive Control RNA 用上流センスプライマー

* 2 : Positive Control RNA 用下流アンチセンスプライマー

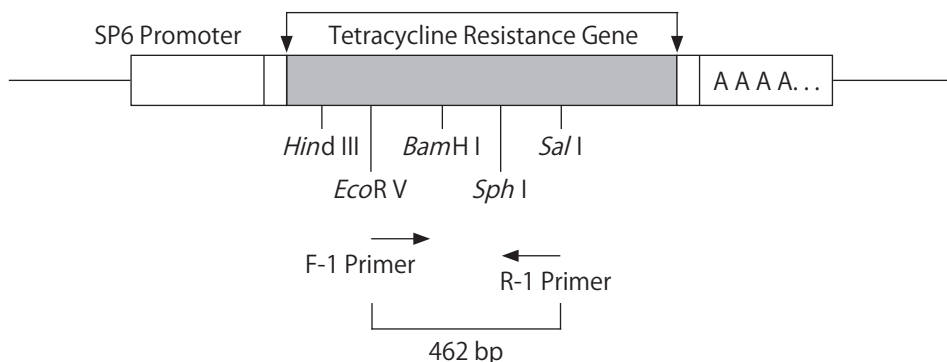


図 1. コントロール RNA : Control Primer を用いた場合の増幅断片

【各プライマーのシーケンス】

| プライマー名 | シーケンス |
|--------------------|-----------------------------|
| Control F-1 primer | 5'-CTGCTCGCTTCGCTACTTGGA-3' |
| Control R-1 primer | 5'-CGGCACCTGTCCTACGAGTTG-3' |

【Positive Control RNA】

本製品に添付されている Control RNA は、SP6 promoter 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。

本製品以外に必要な試薬、機器 (主なもの)

- 遺伝子増幅システム (authorized instruments)
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® Gradient (製品コード TP600 : 終売)
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice *Touch* (製品コード TP350 : 終売) など
- アガロースゲル
Agarose L03 「TAKARA」(製品コード 5003/5003B)
PrimeGel™ Agarose PCR-Sieve (製品コード 5810A) など
- 電気泳動装置
Mupid-2plus (製品コード M-2P)
Mupid-exU (製品コード EXU-1) 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)

III. 保存

− 20℃

IV. 原理

PrimeScript II High Fidelity One Step RT-PCR Kit では、まず PrimeScript II RTase による RNA からの cDNA 合成を行い、引き続き同じ反応系のまま PrimeSTAR GXL for 1 step RT-PCR による PCR 増幅を行います。

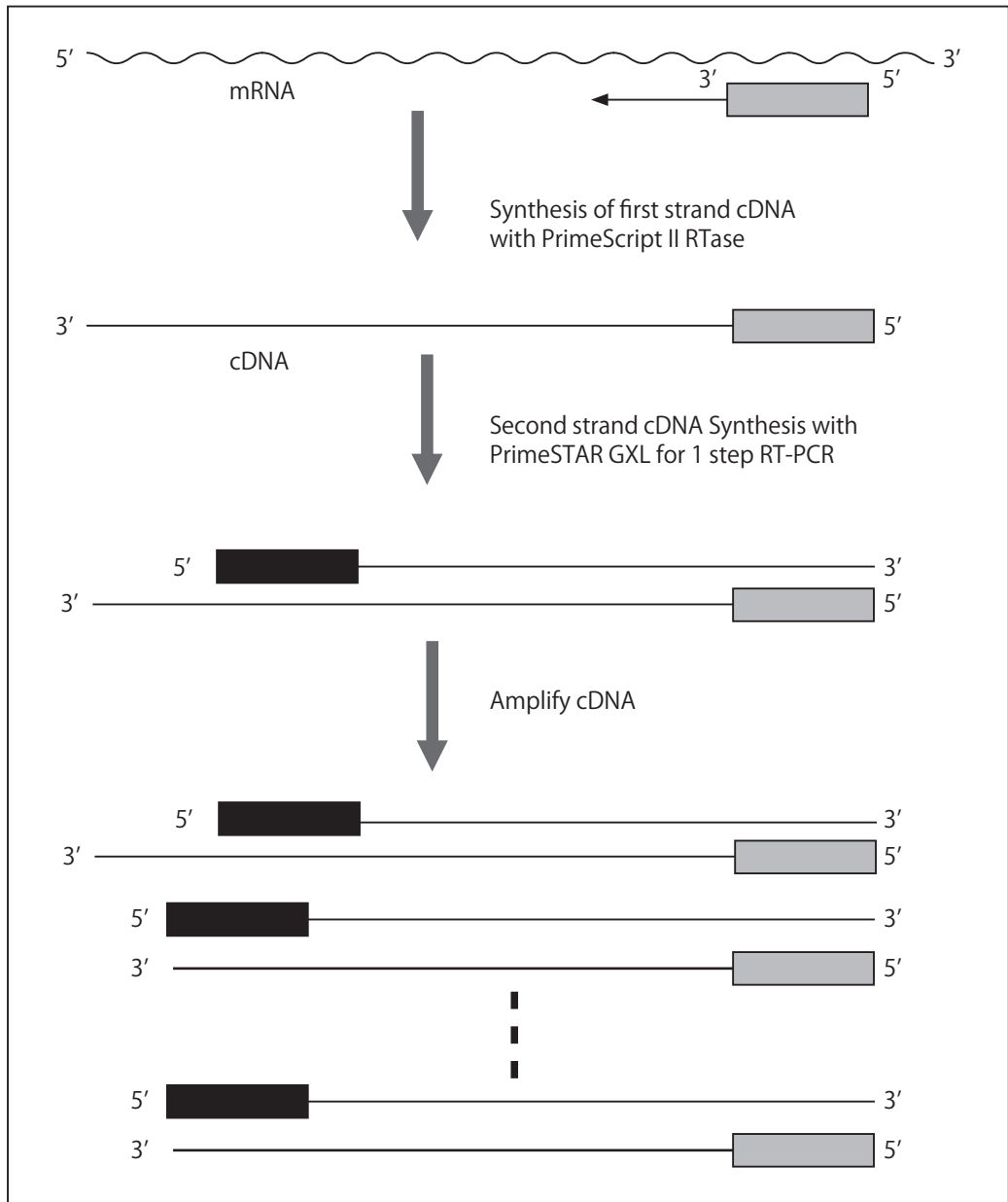


図 2. PrimeScript II High Fidelity One Step RT-PCR Kit の原理

V. 特長

| | |
|--------------------------|--|
| RNA テンプレート | 全般 |
| 増幅サイズ | 8 kb の増幅を確認 |
| 逆転写酵素 | PrimeScript II RTase (45°C で使用) |
| DNA Polymerase | PrimeSTAR GXL for 1 step RT-PCR |
| RNase Inhibitor | 必要 (PrimeScript II RT Enzyme Mix に含まれる) |
| 1st strand cDNA 合成用プライマー | 遺伝子特異的下流プライマー (PCR 用のアンチセンスプライマー) 注: Random プライマーや Oligo dT プライマーの使用は不可 |
| 操作 | 1 本のチューブ内で連続的に RT-PCR を行う |

VI. 操作上の注意

本製品を使用する際の注意事項です。使用前に必ずお読みください。

1. 数回～10 回分程度の反応液を Master Mix としてまとめて調製すると便利です。Master Mix を作ることで、ピペッティングによるロスや、試薬の分注・攪拌回数が少なくなり、正確な試薬の分注を行うことができます。その結果、実験間のデータのばらつきも防げます。
2. PrimeScript II RT Enzyme Mix、PrimeSTAR GXL for 1 step RT-PCR の攪拌は泡立え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。50%グリセロールを含む酵素類は粘度が高いため、注意深くゆっくりとピペッティングを行ってください。
3. 2 × One Step High Fidelity Buffer は使用前によく vortex をした後、軽く遠心してください。
4. 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。
5. 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。可能であれば -70 ~ -80°C での保存をお勧めします。
6. 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。
7. 本製品による逆転写反応には、遺伝子特異的なプライマーを用います。Random Primer や Oligo-dT Primer は使用できません。

VII. 操作

1. 下記に示す反応液を調製する。

| 試薬 | 使用量 | 最終濃度 |
|------------------------------------|------------------|-------------|
| 2 × One Step High Fidelity Buffer | 25 μ l | 1 × |
| PrimeScript II RT Enzyme Mix | 1 μ l | |
| PrimeSTAR GXL for 1 step RT-PCR | 4 μ l | |
| 上流 Primer (20 μ M) *1 (センス) | 1 μ l | 0.4 μ M |
| 下流 Primer (20 μ M) *2 (アンチセンス) | 1 μ l | 0.4 μ M |
| Template RNA | *3 | |
| RNase Free dH ₂ O | up to 50 μ l | |

- * 1 : Positive Control RNA の場合、F-1 Primer
- * 2 : Positive Control RNA の場合、R-1 Primer
- * 3 : total RNA の場合は 10 ~ 1,000 ng の使用を推奨。
なお、Positive Control RNA の場合は 1 μ l を使用してください。

2. 調製したチューブをサーマルサイクラーにセットし、至適プログラムで RT-PCR を行う。

一般的な反応条件

| | | |
|---------------|---------------|-------------|
| 45°C *4 | 10 min. | |
| 94°C | 2 min. | |
| ↓ | | |
| 98°C | 10 sec. | } 30 cycles |
| 60 or 55°C *5 | 15 sec. | |
| 68°C | 10 sec./kb *6 | |

Positive Control RNA の場合 コントロール反応では、462 bp が検出される。

| | | |
|------|---------|-------------|
| 45°C | 10 min. | |
| 94°C | 2 min. | |
| ↓ | | |
| 98°C | 10 sec. | } 30 cycles |
| 60°C | 15 sec. | |
| 68°C | 10 sec. | |

* 4 : 逆転写反応温度

PrimeScript II RTase (PrimeScript II RT Enzyme Mix に含まれる) は、プライミングの特異性が向上しているため、特異性が要求される下流プライマーからの逆転写反応を RNA の分解や酵素の失活の心配のない 45°C で反応することができます。6 kb を超える長鎖増幅の場合には、逆転写反応時間を 15 min. にのばすことにより、cDNA 合成量が向上する場合があります。

* 5 : アニーリング温度

プライマーの T_m 値 (下記の式で計算) が 55°C をこえる場合
→ 60°C に設定
プライマーの T_m 値 (下記の式で計算) が 55°C 以下の場合
→ 55°C に設定

※ T_m 値計算方法

$$T_m \text{ 値 (}^\circ\text{C)} = [(A, T \text{ の数}) \times 2] + [(G, C \text{ の数}) \times 4] - 5$$

- * 6 : 伸長時間は 1 kb あたり 10 sec. で設定してください。ただし、1 kb 未満の場合は 10 sec. にしてください。

以上の設定で良好な結果が得られない場合は、以下の方法で検討してください。

<スミア、エキストラバンドが生じる場合 >

- (1) アニーリング温度を 63℃まで 2℃ずつ上げてみる。
- (2) プライマーの Tm 値が 50℃以下の場合、アニーリング温度を 50～55℃で試す。

< 目的産物が増幅しない (少ない) 場合 >

- (1) 鋳型量を推奨条件にあわせる。
- (2) PCR サイクル数を 40～50 サイクルに増やして反応を行う。
- (3) アニーリング温度を 2℃ずつ下げしてみる。

※ PrimeSTAR GXL for 1 step RT-PCR では、dTTP の代わりに dUTP を使用することはできません (著しく反応性が低下します)。また、イノシンを含むプライマーの使用は避けてください。

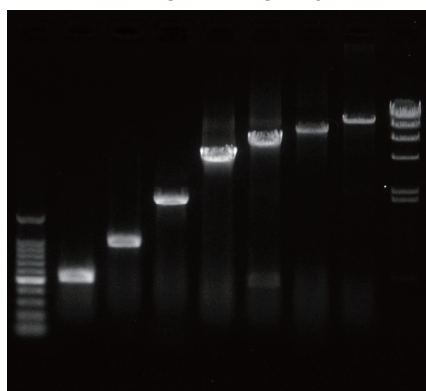
VIII. 実施例

1. 増幅鎖長の確認

【方法】ヒト心臓およびマウス心臓由来の total RNA、または HL60 細胞由来の total RNA を鋳型として (1 μg/50 μl 反応系)、ターゲット遺伝子の様々な長さの領域を 1 ステップ RT-PCR で増幅した。

| | | |
|-----------|----------------------|-------------|
| 反応条件： 45℃ | 10 min. | |
| | (但し 12 kb は 15 min.) | |
| 94℃ | 2 min. | |
| ↓ | | |
| 98℃ | 10 sec. | } 30 cycles |
| 55℃ | 15 sec. | |
| | (但し 8、12 kb は 60℃) | |
| 68℃ | 10 sec./kb | |

M1 1 2 3 4 5 6 7 M2



| Target | Size | (Template) |
|----------------|--------|---------------------|
| 1 : TFR | 0.5 kb | (HL60 由来 total RNA) |
| 2 : Dystrophin | 1 kb | (ヒト心臓由来 total RNA) |
| 3 : Dystrophin | 2 kb | (ヒト心臓由来 total RNA) |
| 4 : TFR | 4.4 kb | (HL60 由来 total RNA) |
| 5 : Dystrophin | 6 kb | (マウス心臓由来 total RNA) |
| 6 : Dystrophin | 8 kb | (マウス心臓由来 total RNA) |
| 7 : Dystrophin | 12 kb | (マウス心臓由来 total RNA) |

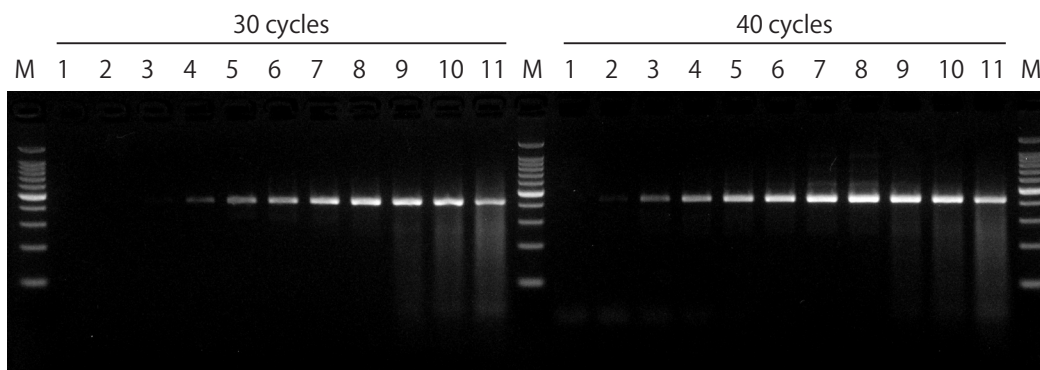
M1 : 100 bp DNA Ladder
M2 : λ-Hind III digest

【結果】0.5～12 kb で、増幅が確認できました。

2. 検出感度の測定

【方法】さまざまな量の HL60 細胞由来 total RNA を鋳型として用い、GAPDH 遺伝子の 428 bp をターゲットとした 1 ステップ RT-PCR で、検出感度を測定した。

反応条件： 45°C 10 min.
94°C 2 min.
↓
98°C 10 sec. }
55°C 15 sec. } 30 または 40 cycles
68°C 10 sec. }



Template 量 (HL60 由来 total RNA)

| | |
|------------|-----------------------|
| 1 : 10 fg | 7 : 10 ng |
| 2 : 100 fg | 8 : 100 ng |
| 3 : 1 pg | 9 : 1 μ g |
| 4 : 10 pg | 10 : 2 μ g |
| 5 : 100 pg | 11 : 4 μ g |
| 6 : 1 ng | M : 100 bp DNA Ladder |

【結果】total RNA 量 10 pg (30 cycles) または 100 fg (40 cycles) から検出が可能でした。また、total RNA 4 μ g を用いた場合にも良好な反応が見られ、反応に使用できる鋳型量の許容範囲が広いことも確認できました。

IX. RNA サンプルの調製について

本製品は RNA から cDNA 合成、PCR 増幅を行うキットです。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、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 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℃ 12 時間処理する。
- (2) 残存 DEPC を除去するために、オートクレーブ (120℃ 30 分) にかける。

また、実験台、実験器具、チューブなどの RNase 除去には RNase-OFF® (製品コード 9037) の使用をお勧めします。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 専用として使用してください。

【RNA サンプルの調製法】

培養細胞や組織サンプルからの高純度 total RNA の調製には、スピнкаラムタイプの NucleoSpin RNA (製品コード 740955.10/.50/.250) や AGPC 法の簡便化試薬である RNAiso Plus (製品コード 9108/9109) が便利です。また、血液からの抽出には NucleoSpin RNA Blood (製品コード 740200.10/.50) が使用できます。

X. 増幅産物の電気泳動、クローニング、制限酵素処理について

1. 増幅産物の電気泳動

本製品を用いて得られた増幅産物を電気泳動する場合は、TAE Buffer の使用を推奨します。TBE Buffer を使用すると、泳動パターンがやや裾広がりになり、きれいな泳動結果が得られない場合があります。

2. 増幅産物のクローニング

本製品を用いて得られた増幅産物のほとんどは平滑末端になっていますので、PCR 産物をそのまま (必要に応じてリン酸化を行って) 平滑末端のベクターにクローニングすることができます。平滑末端ベクターへのクローニングには Mighty Cloning Reagent Set (Blunt End) (製品コード 6027) をご利用ください。

T-vector にクローニングしたい場合には、3' 末端への dA 付加反応を行う必要があります。Mighty TA-cloning Reagent Set for PrimeSTAR (製品コード 6019) をご利用ください。

3. 制限酵素処理を行う場合

増幅産物を制限酵素処理する場合は、フェノール/クロロホルム処理などのタンパク質除去操作を行ってください。特に 3' - 突出型の制限酵素 (例えば *Pst* I など) の場合、PrimeSTAR GXL for 1 step RT-PCR の 3' → 5' exonuclease 活性が残存していると、制限酵素処理中に 3' - 突出末端が削られてしまいます。

XI. 関連製品

PrimeScript™ II 1st strand cDNA Synthesis Kit (製品コード 6210A/B)
PrimeScript™ 1st strand cDNA Synthesis Kit (製品コード 6110A/B)
PrimeScript™ II Reverse Transcriptase (製品コード 2690A/B/C)
PrimeScript™ Reverse Transcriptase (製品コード 2680A/B/C)
PrimeSTAR® Max DNA Polymerase (製品コード R045A/B)
PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase (製品コード R050A/B)
PrimeScript™ RT-PCR Kit (製品コード RR014A/B)
PrimeScript™ One Step RT-PCR Kit Ver.2 (製品コード RR055A/B)
PrimeScript™ One Step RT-PCR Kit Ver.2 (Dye Plus) (製品コード RR057A/B)
PrimeScript™ High Fidelity RT-PCR Kit (製品コード R022A/B)
PrimeScript™ II High Fidelity RT-PCR Kit (製品コード R023A/B)
Agarose L03「TAKARA」(製品コード 5003/5003B)
PrimeGel™ Agarose PCR-Sieve (製品コード 5810A)
RNase-OFF® (RNaseコンタミネーション除去溶液) (製品コード 9037)
NucleoSpin RNA (製品コード 740955.10/.50/.250)
RNAiso Plus (製品コード 9108/9109)
NucleoSpin RNA Blood (製品コード 740200.10/.50)
Mighty TA-cloning Reagent Set for PrimeSTAR® (製品コード 6019)
Mighty Cloning Reagent Set (Blunt End) (製品コード 6027)

XII. 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。
- ・PrimeSTAR、Thermal Cycler Dice はタカラバイオ株式会社の、RNase-OFF は PureBiotech, LLC 社の登録商標です。PrimeScript、PrimeGel 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 <https://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社