

製品コード RR014A

研究用

Takara

PrimeScript™ RT-PCR Kit

説明書

v202108Da

PCR (Polymerase Chain Reaction) は、目的とする DNA 領域をはさむ 2 種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 は直接の基質とはなりませんが、逆転写酵素によって 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 RT-PCR Kit は、優れた伸長性と非常に高い増幅効率を提供する 2 step RT-PCR 用のキットです。逆転写反応には、M-MLV 由来の RTase をベースにしてタカラバイオが独自に開発した逆転写酵素 PrimeScript RTase を採用しています。また、PCR には増幅効率に優れた Hot Start PCR 用酵素 *TaKaRa Ex Taq*[®] HS を用いています。

さらにタカラバイオの RT-PCR テクノロジーを組み合わせることにより、本キットは次のような特長を示します。

- ・ 非常に効率よく RT-PCR 増幅産物が得られる。
- ・ 標準的な逆転写反応温度 (42°C) で、高次構造を取り得る鋳型 RNA にも優れた伸長性を示す。RNA が分解されるリスクのある高温での反応は不要。
- ・ 反応液調製時などサイクル前のミスプライミングやプライマーダイマーに由来する非特異的増幅を抑制する。

本キットには、逆転写反応による RNA からの cDNA 合成および PCR による cDNA 増幅に必要な全ての試薬が含まれます。

I. 内容 (50 回用)*1

1. PrimeScript RTase (for 2step)	25 μ l
2. 5 × PrimeScript Buffer	200 μ l
3. RNase Inhibitor (40 U/ μ l)	25 μ l
4. dNTP Mixture (10 mM each)	150 μ l
5. Oligo dT Primer (2.5 μ M)	50 μ l
6. Random 6 mers (20 μ M)	50 μ l
7. <i>TaKaRa Ex Taq</i> HS (5 U/ μ l)	25 μ l
8. 10 × PCR Buffer II	250 μ l
9. Control F-1 Primer*2 (20 μ M)	10 μ l
10. Control R-1 Primer*3 (20 μ M)	10 μ l
11. Positive Control RNA (2 × 10 ⁵ copies/ μ l)	20 μ l
12. RNase Free dH ₂ O	1 ml

* 1 : [逆転写反応系 20 μ l → PCR 反応系 50 μ l] の場合の 50 回分

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

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

【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) ₆
Oligo dT Primer	弊社独自の設計による dT 領域の配列*4
Control F-1 Primer	5'-CTGCTCGCTTCGCTACTTGGA-3'
Control R-1 Primer	5'-CGGCACCTGTCTACGAGTTG-3'

* 4 : 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 相補領域を含みません。

【 Positive Control RNA 】

本キットに添付されている Positive 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す。

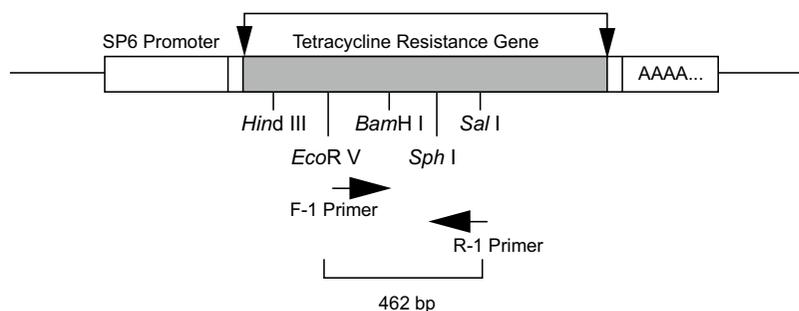


図 1. コントロール RNA : Control Primer を用いた場合の増幅断片

キット以外に必要な試薬、機器 (主なもの)

1. 遺伝子増幅システム (authorized instruments)
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
2. 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
3. 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
4. マイクロ遠心機
5. 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

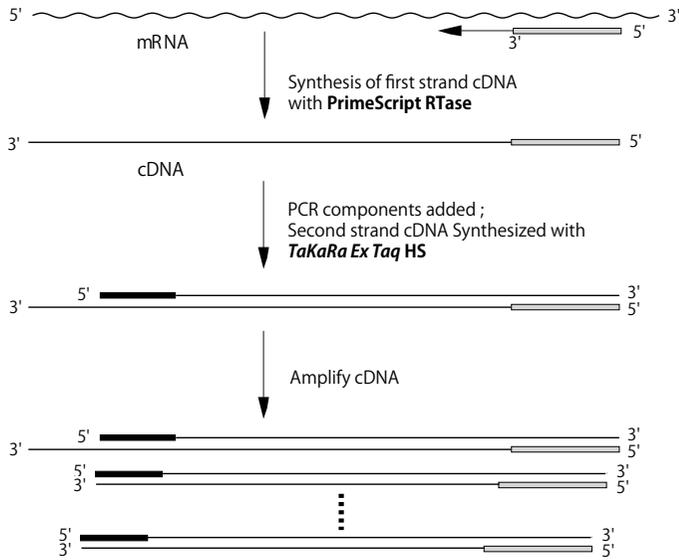


図 2. PrimeScript RT-PCR Kit の原理

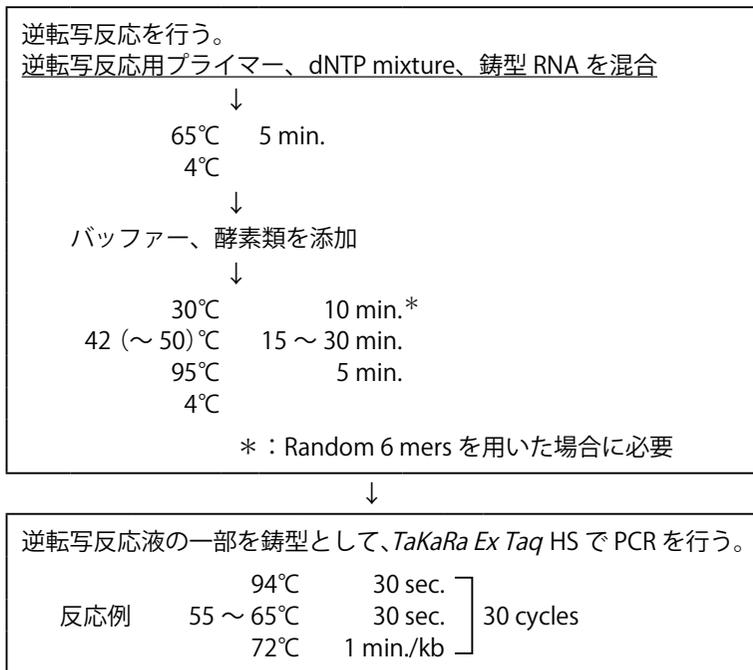


図 3. PrimeScript RT-PCR Kit の操作フロー

本キットでは、まず PrimeScript RTase による RNA からの cDNA 合成を行い、その反応液の一部を鋳型として TaKaRa Ex Taq HS による PCR 増幅を行います。

RNA から cDNA 合成を行う際のプライマーとして Random 6 mers、Oligo dT Primer、あるいは配列特異的な下流プライマーを用いることができます。

IV. 特長

RNA テンプレート	全般
増幅サイズ	12 kb の増幅を確認
逆転写酵素	PrimeScript RTase (至適温度 42°C)
DNA Polymerase	<i>TaKaRa Ex Taq</i> HS
RNase Inhibitor	必要 (キットに含まれる)
1st strand cDNA 合成用プライマー	Random 6 mers Oligo dT Primer 特異的下流プライマー

} より選択可

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. 逆転写酵素反応および PCR の際に調製する反応液は、数回～10 回分ぐらいを 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 RTase、RNase Inhibitor、*TaKaRa Ex Taq* HS の攪拌は泡立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。
3. 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。
4. 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。
5. 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。

【プライマーの選択について】

逆転写反応におけるプライマーの選択は、実験の種々の要素を考慮して Random 6 mers、Oligo dT Primer、特異的下流プライマーの 3 種類から選んでください。ヘアピン構造のない短い mRNA の場合、3 種類のどれを選んでも問題はありますが、一般的には以下の選択基準を参考にしてください。

Oligo dT Primer

polyA tail を持つ mRNA の逆転写反応にのみ用いることが可能です。

(注：原核生物の RNA、真核生物の rRNA や tRNA、ある種の真核生物の mRNA は polyA tail を持っていません。)

Random 6 mers

長い RNA の逆転写の場合、またヘアピン構造を持つ RNA の逆転写反応の場合に適しています。また rRNA、mRNA、tRNA などすべての RNA の逆転写反応に使用可能です。

特異的下流プライマー (PCR 時のアンチセンスプライマー)

鋳型と相補的なシーケンスを持つオリゴヌクレオチドを合成する必要があるため、予めターゲットのシーケンスがわかっている必要があります。

VI. 操作

A. 鋳型 RNA の変性および逆転写反応

A-1. 下記に示す反応液を調製する。

試薬	使用量
dNTP Mixture (10 mM each)	1 μ l
Oligo dT Primer (2.5 μ M) or Random 6 mers (20 μ M) or Specific Primer (2 μ M)*1	1 μ l
Template RNA *2 (or Positive Control RNA [4 \times 10 ⁵ copies])	
RNase Free dH ₂ O	up to 10 μ l

* 1 : 反応に用いるプライマーは Oligo dT Primer、Random 6 mers、特異的下流プライマー (Control RNA の場合は R-1 Primer) のいずれかを選択。(選択基準については前項をご参照ください。)

* 2 : Template RNA は、8 μ l まで持ち込むことができます。total RNA の場合、5 μ g まで使用可能です (推奨使用量 : 100 pg \sim 1 μ g)。

A-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、次のプログラムで変性・アニーリングを行う。

65°C 5 min.
4°C

【重要】この変性・アニーリング操作により、鋳型 RNA の変性と、逆転写プライマーの鋳型 RNA への特異的なアニーリングが効率的に行われ、逆転写効率が向上します。

A-3. 変性・アニーリング済み反応液に以下のように試薬を添加する。

試薬	使用量
A-2. の変性・アニーリング済み反応液	10 μ l
5 \times PrimeScript Buffer	4 μ l
RNase Inhibitor (40 U/ μ l)	0.5 μ l
PrimeScript RTase (for 2step)	0.5 μ l
RNase Free dH ₂ O	5 μ l
Total	20 μ l

A-4. チューブをサーマルサイクラーにセットし、次のプログラムで逆転写反応を行う。

(30°C 10 min.)*3
42°C (\sim 50°C) 15 \sim 30 min.
95°C 5 min.*4
4°C

* 3 : 逆転写反応に Random 6 mers を用いる場合、42°C (\sim 50°C) での反応の前に追加で行ってください。この操作により Random 6 mers が 42°C (\sim 50°C) で鋳型 RNA と充分アニーリングできる長さになるまで伸長し、逆転写効率が向上します。

* 4 : 長鎖を増幅する場合は、1st ストランド cDNA にニックなどのダメージを与えないように、70°C、15 min. の失活操作を行ってください。

【重要】PrimeScript RTase は、高次構造にも強い伸長性を示すので、通常の反応は 42°C で行ってください。特異的下流プライマーを逆転写プライマーとして使用した場合、ミスプライミングによる非特異的な増幅産物が生じることがあります。そのような場合は、反応温度を 50°C にすることで改善が見られます。

B. PCR 反応

B-1. 下記に示す反応液を調製する。

試薬	使用量	最終濃度
10 × PCR Buffer II	5 μ l	1 ×
dNTP Mixture (10 mM each)	2 μ l	400 μ M
上流 Primer (20 μ M) *5 (センス)	0.5 μ l	0.2 μ M
下流 Primer (20 μ M) *6 (アンチセンス)	0.5 μ l	0.2 μ M
TaKaRa Ex Taq HS (5 U/ μ l)	0.5 μ l	
A-4 の逆転写反応液	\leq 5 μ l	
滅菌水	up to 50 μ l	

* 5 : Positive Control RNA の場合、F-1 Primer

* 6 : Positive Control RNA の場合、R-1 Primer

B-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 PCR を行う。

一般的な反応条件

(A) 3 step PCR の場合

94°C	30 sec.] 30 cycles
55 ~ 65°C	30 sec.	
72°C	1 min./kb	

(B) 2 step PCR の場合

98°C	10 sec.] 30 cycles
68°C	1 min./kb	

Positive Control RNA の場合*7

94°C	30 sec.] 30 cycles
60°C	30 sec.	
72°C	1 min.	

* 7 : 逆転写反応に Oligo dT Primer、Random 6 mers、R-1 Primer のいずれを用いた場合も、Control Primer F-1 と R-1 を用いた PCR で、462 bp の増幅産物が得られます。

VII. PCR 条件について

- **アニーリング温度**
コントロール RNA の場合、60°C に設定して PCR を行いますが、実際のサンプルでは最適条件が変わります。55 ~ 65°C で至適条件を検討してください。必要があれば、範囲を広げて (45 ~ 65°C) 検討してください。
- **伸長時間**
伸長時間は、ターゲットの鎖長にあわせて変更します。TaKaRa Ex Taq HS では、72°C で 1 kb あたり 1 分を目安に設定してください。
- **サイクル数**
cDNA が少ない場合は、40 ~ 50 cycles で行ってください。
- **本キットを用いて増幅した PCR 産物のほとんどは、3' 末端に A が 1 塩基付加されています。したがって、その PCR 産物をそのまま T-Vector にクローニングすることが可能です。T-Vector へのクローニングには Mighty TA-cloning Kit (製品コード 6028) をご利用ください。また、末端平滑化およびリン酸化を行って、平滑末端ベクターにクローニングすることも可能です。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。**

VIII. 実施例

- ヒト心臓由来 total RNA、または HL60 細胞由来 total RNA を鋳型として、様々な長さのターゲット遺伝子を RT-PCR で増幅しました。

各 total RNA 1 μ g/20 μ l RT 反応系で逆転写反応

↓

2 μ l を鋳型として 50 μ l PCR 反応系で増幅 (total RNA 100 ng 相当 / 50 μ l PCR 反応系)

Target gene	使用 total RNA
Dystrophin トランスフェリンレセプター (TFR)	ヒト心臓由来 HL60 細胞由来

PCR 条件：

0.5 ~ 6 kb

94°C 1 min.

↓

94°C 30 sec.

55°C 30 sec.

72°C 1 min./kb

30 cycles

8 ~ 12 kb

94°C

1 min.

↓

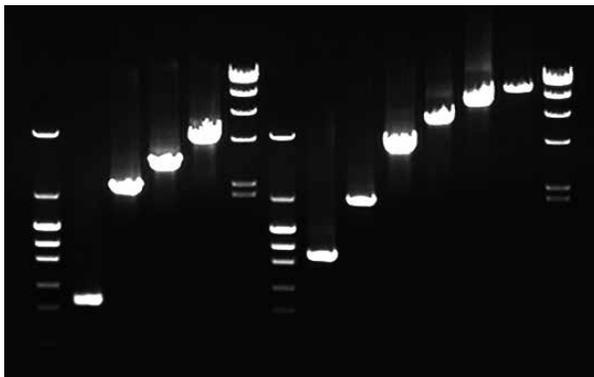
98°C

10 sec.

68°C 8 min. or 15 min.

30 cycles

M1 1 2 3 4 M2 M1 5 6 7 8 9 10 M2



M1 : pHY Marker

1 : TFR 0.5 kb

2 : TFR 2.2 kb

3 : TFR 3 kb

4 : TFR 4.4 kb

5 : Dystrophin 1 kb

6 : Dystrophin 2 kb

7 : Dystrophin 4 kb

8 : Dystrophin 6 kb

9 : Dystrophin 8 kb

10 : Dystrophin 12 kb

M2 : λ -Hind III digest

0.5 ~ 12 kb で、非常に良好な伸長と増幅が確認できました。

2. HL60 細胞由来の total RNA を鋳型として、本キットのプロトコールにより Oligo dT Primer で逆転写を行った逆転写反応液を用い、GAPDH をターゲットとして、検出感度測定を実施しました。

ターゲット：GAPDH 428 bp

PCR 条件： 94℃ 1 min.

↓

94℃	30 sec.	}	40 cycles
55℃	30 sec.		
72℃	1 min.		

M 1 2 3 4 5 M



RNA template (total RNA)

1 : 0.1 pg

2 : 1 pg

3 : 10 pg

4 : 100 pg

5 : 1 ng

M : 100 bp Ladder

total RNA 量 1 pg から検出が可能でした。

IX. RNA サンプルの調製について

本キットは RNA から cDNA 合成、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 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】

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 (Guanidinium thiocyanate 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。

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。

X. 関連製品

PrimeScript™ Reverse Transcriptase (製品コード 2680A/B/C)
PrimeScript™ II Reverse Transcriptase (製品コード 2690A/B/C)
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)
PrimeScript™ II High Fidelity One Step RT-PCR Kit (製品コード R026A/B)
PrimeScript™ 1st strand cDNA Synthesis Kit (製品コード 6110A/B)
PrimeScript™ II 1st strand cDNA Synthesis Kit (製品コード 6210A/B)
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® Gradient (製品コード TP600)
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® *Touch* (製品コード TP350)
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)
Mighty TA-cloning Kit (製品コード 6028)
Mighty Cloning Reagent Set (Blunt End) (製品コード 6027)

XI. 注意

- ・本製品は研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断用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*、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、TaKaRa RNA PCR、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