

製品コード 6210A/B

研究用

Takara

PrimeScript™ II
1st strand cDNA Synthesis Kit

説明書

v201706Da

目次

I.	概要.....	3
II.	内容.....	4
III.	保存.....	4
IV.	1st-strand cDNA 合成反応.....	5
V.	RT-PCR を行う場合.....	6
VI.	RNA サンプルの調製について.....	6
VII.	関連製品.....	7
VIII.	注意.....	7

I. 概要

本製品は、PrimeScript II RTase を用いて total RNA あるいは polyA⁺ RNA より 1st strand cDNA を合成するためのキットです。1st strand cDNA を合成するための全ての試薬が含まれており、すぐに実験を始めることができます。

複雑な構造の RNA や長鎖の RNA を鋳型にした場合、cDNA 合成を妨げる主たる要因は、RNA の高次構造部分への逆転写酵素自身の非特異的な結合です。また、逆転写酵素のミスプライミングに起因する非特異的な伸長は、RT-PCR や完全長 cDNA 取得に多大な悪影響を及ぼします。PrimeScript II RTase は、タカラバイオが独自に開発した PrimeScript RTase のさらなる改良により、この cDNA 合成の阻害要因を極限まで抑制した逆転写酵素です。

本製品では、PrimeScript II RTase を用いることにより、特に Oligo dT プライマーを利用する polyA からの伸長反応において、RNA の分解の恐れのない標準的な逆転写反応温度 (42°C) で PrimeScript RTase 元来の卓越した polyA の利用効率と合成スピードを維持しながら、バックグラウンドの少ないより高品質の完全長の cDNA 合成産物を得ることができます。

また、polyA からの cDNA 合成阻害の原因となる逆転写反応液調製時に生じる非特異的な伸長反応が完全に抑制されているため、反応液調製後、氷上においたまま逆転写反応するまでに時間を要しても cDNA 合成阻害が起りません。

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 法による増幅など幅広く使用することができ、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。

II. 内容 (50 回分)

PrimeScript II RTase (200 U/ μ l)	50 μ l
5 × PrimeScript II Buffer	200 μ l
RNase Inhibitor (40 U/ μ l)	25 μ l
dNTP Mixture (10 mM each)	50 μ l
Oligo dT Primer (50 μ M)	50 μ l
Random 6 mers (50 μ M)	100 μ l
RNase Free dH ₂ O	1 ml

■ 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*1

* 1 : 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。

■ キット以外に必要な試薬、機器 (主なもの)

1. 恒温装置
サーマルサイクラーで代用可能
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® Gradient (製品コード TP600) 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-One (製品コード O1-01)
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)

III. 保存

− 20℃

IV. 1st-strand cDNA 合成反応

[標準プロトコール]

1. マイクロチューブ内で以下の液を混合する。

試薬	使用量
Oligo dT Primer (50 μ M) or Random 6 mers (50 μ M)	1 μ l or 1 μ l (0.4 ~ 2 μ l) *2
dNTP Mixture (10 mM each)	1 μ l
鋳型 RNA	total RNA : 5 μ g 以下 polyA ⁺ RNA : 1 μ g 以下
RNase Free dH ₂ O	up to 10 μ l

2. 65°Cで5分間保温した後、氷上で急冷する。
<重要> この操作により鋳型 RNA が変性し、逆転写効率が向上します。

3. 以下の反応液を加え、全量を 20 μ l にする。

試薬	使用量
2. の変性済み混合液	10 μ l
5 × PrimeScript II Buffer	4 μ l
RNase Inhibitor (40 U/ μ l)	0.5 μ l (20 units)
PrimeScript II RTase (200 U/ μ l)	1 μ l (200 units)
RNase Free dH ₂ O	up to 20 μ l

4. 穏やかに攪拌する。
5. 速やかに以下の条件で反応を行う。
30°C 10 min. (Random 6 mers 使用時のみ)
42°C (~ 50°C) *3 30 ~ 60 min.
6. 95°Cで5分間保温*4 (酵素失活) した後、氷上で冷却する。

* 2 : ランダムプライマーで 2 kb 未満の鎖長の cDNA を合成する場合は 1 ~ 2 μ l、2 kb 以上の鎖長の cDNA を合成する場合は 0.4 ~ 1 μ l を使用することをお勧めします。Gene Specific Primer も使用可能です。その場合、最終濃度 0.1 μ M となるように反応系に加えてください。

* 3 : PrimeScript II 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 を推奨します。RT-PCR において、PCR 下流プライマーを逆転写プライマーとして使用するとミスプライミングによる非特異的な増幅産物が生じる場合がありますが、そのような場合には逆転写反応温度を 45 ~ 50°C にすることで改善が見られることがあります。

* 4 : 長鎖を増幅する場合は、1st strand cDNA にニックなどのダメージを与えないように、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 PCR 酵素もありますので、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り増幅産物が得られない場合、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]

成功率、特異性を求める PCR に ; Tks Gflex™ DNA Polymerase

正確な PCR に ; PrimeSTAR® Max DNA polymerase、PrimeSTAR HS DNA polymerase、PrimeSTAR GXL DNA polymerase

増幅効率の良い PCR に ; TaKaRa Ex Taq®, TaKaRa Ex Taq HS、PrimeSTAR GXL DNA polymerase

長鎖の PCR に ; TaKaRa LA Taq®, TaKaRa LA Taq HS、PrimeSTAR GXL DNA polymerase

VI. RNA サンプルの調製について

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の (1) あるいは (2) を行ってから使用してください。

(1) 乾熱滅菌 (180℃、60 分)

(2) 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。残留 DEPC を除去するためにオートクレーブ処理 (120℃、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]

実験に用いる試薬溶液は、上記の条件で乾熱滅菌 (180℃、60 分) あるいは DEPC 処理したガラス器具で調製し、用いる精製水はあらかじめ 0.1% DEPC 処理を行いオートクレーブしてください。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。

RNAiso Plus (製品コード 9108/9109) や NucleoSpin RNA (製品コード 740955.10/50/.250) などの 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。

VII. 関連製品

- 高効率、高感度、長鎖の2ステップ RT-PCR に；
PrimeScript™ RT-PCR Kit (製品コード RR014A/B)
- 究極の正確性が要求される RT-PCR に；
PrimeScript™ High Fidelity RT-PCR Kit (製品コード R022A/B)
- 長鎖 RNA や GC リッチな RNA からの正確性の高い RT-PCR に；
PrimeScript™ II High Fidelity RT-PCR Kit (製品コード R023A/B)
- 高感度、長鎖の1ステップ RT-PCR に；
PrimeScript™ One Step RT-PCR Kit Ver.2 (製品コード RR055A/B)
- 高速度と正確性を求める1ステップ RT-PCR に；
PrimeScript™ II High Fidelity One Step RT-PCR Kit (製品コード R026A/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)
PrimeSTAR® GXL DNA polymerase (製品コード R050A/B)

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* はタカラバイオ株式会社の登録商標です。PrimeScript、PrimeGel、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