

製品コード R022A

研究用

---

**Takara**

**PrimeScript™  
High Fidelity RT-PCR Kit**

---

説明書

v202107Da

---

# 目次

I.	内容.....	3
II.	保存.....	4
III.	PrimeSTAR® Max DNA Polymerase の正確性について.....	4
IV.	RNA サンプルの調製について.....	5
V.	原理.....	6
VI.	特長.....	6
VII.	操作上の注意.....	7
VIII.	操作 (2 ステップ RT-PCR) .....	8
IX.	実施例 (2 ステップ RT-PCR) .....	11
X.	オプション操作 (1 ステップ RT-PCR) .....	12
XI.	実施例 (1 ステップ RT-PCR) .....	14
XII.	増幅産物の電気泳動、クローニング、シーケンスについて.....	16
XIII.	関連製品.....	17
XIV.	注意.....	17

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 は直接の鋳型とはなりませんが、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 High Fidelity RT-PCR Kit は、total RNA あるいは mRNA から高い正確性で cDNA を合成するための RT-PCR 用キットです。

本キットの逆転写反応には、M-MLV 由来の RTase をベースにタカラバイオが独自に開発した逆転写酵素 PrimeScript RTase を、また PCR には、High Fidelity PCR 酵素の決定版、PrimeSTAR Max DNA Polymerase を用いています。PrimeSTAR Max は最高レベルの正確性と Taq DNA Polymerase に優る増幅効率を併せ持つプレミックスタイプの酵素で、鋳型量に対する適応性が改良されており、cDNA クローニングなど正確性が要求される重要な反応に安心してご使用いただけます。

本キットの標準プロトコールである 2 ステップ RT-PCR では、次の様な特長を示します。

- ・ 効率よく正確性の高い 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。
- ・ 反応に使用できる total RNA 量の許容範囲が非常に広く、使いやすい。

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ています。

また、プロトコールの一部を変更することで、1 ステップ RT-PCR にも利用可能です (12 ページ参照)。

## I. 内容 (50 回用) \*1

1. PrimeScript RTase (for 2 step)	25 $\mu$ l
2. 5 $\times$ PrimeScript Buffer	200 $\mu$ l
3. RNase Inhibitor (40 U/ $\mu$ l)	25 $\mu$ l
4. dNTP Mixture (10 mM each)	50 $\mu$ l
5. Oligo dT Primer (2.5 $\mu$ M)	50 $\mu$ l
6. Random 6 mers (20 $\mu$ M)	50 $\mu$ l
7. PrimeSTAR Max Premix (2 $\times$ )	625 $\mu$ l $\times$ 2
8. Control F-1 Primer*2 (20 $\mu$ M)	10 $\mu$ l
9. Control R-1 Primer*3 (20 $\mu$ M)	10 $\mu$ l
10. Positive Control RNA (2 $\times$ 10 <sup>5</sup> copies/ $\mu$ l)	20 $\mu$ l
11. RNase Free dH <sub>2</sub> O	1 ml

\* 1 : 逆転写反応系 20  $\mu$ l  $\rightarrow$  PCR 反応系 50  $\mu$ l の 2 ステップ RT-PCR 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
Control F-1 Primer	5'-CTGCTCGCTTCGCTACTTGG-3'
Control R-1 Primer	5'-CGGCACCTGTCCTACGAGTTG-3'

### 【 Positive Control RNA 】

本キットに添付されている 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。

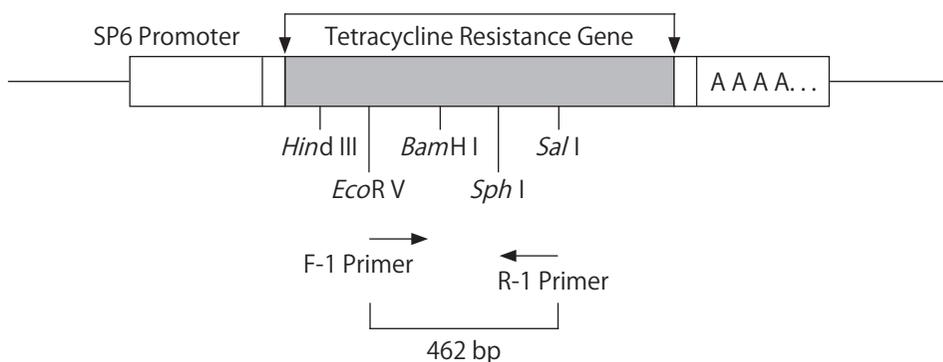


図 1. コントロール RNA : Control Primer を用いた場合の増幅断片

### 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-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)

## II. 保存 — 20℃

【注意】 PrimeSTAR Max Premix (2 ×) は 25 回の凍結融解では活性低下が見られないことを確認していますが、過度の凍結融解は行わないよう注意してください。

## III. PrimeSTAR Max DNA Polymerase の正確性について

GC リッチで変異が入りやすい *Thermus thermophilus* HB8 ゲノム DNA を鋳型として、任意に選択した 10 領域 (増幅サイズはそれぞれ約 500 bp) を PCR 増幅後、ベクターにクローニングし、各配列について複数クローンをピックアップしてシーケンシングにより塩基配列を確認しました。解析した総塩基数に対するエラー塩基数から、mutant frequency を求めました。

PrimeSTAR Max では、解析した総塩基数 542,580 に対し、エラーはわずかに 12 塩基でした。この方法は、実際の PCR に最も即した Fidelity の求め方です。正確性が重要な反応に安心してご使用いただけます。

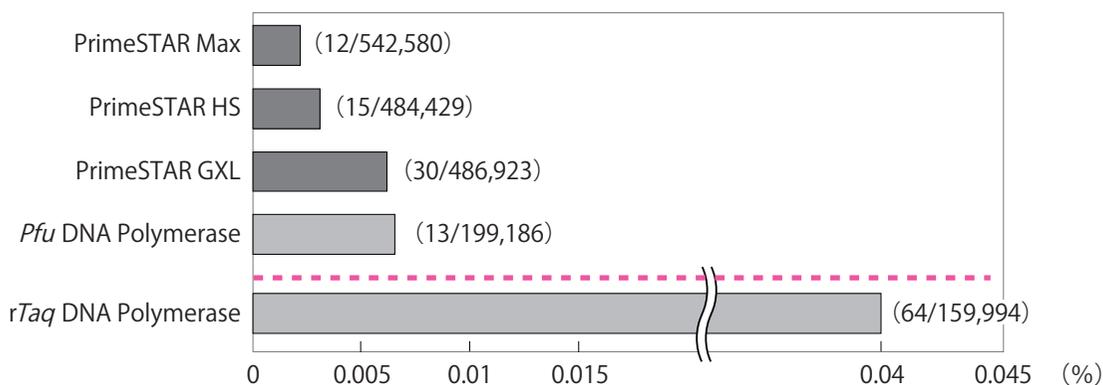


図 2. 各酵素の Fidelity の比較

#### IV. 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 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°C、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°C、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® (RNase コンタミネーション除去溶液) (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、スピンカラムタイプの 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。

total RNA からの mRNA の調製には、*Oligotex-dT30 < Super >* (製品コード W9021) または、*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. 原理

PrimeScript High Fidelity RT-PCR Kit の標準プロトコール (2 ステップ RT-PCR) 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 PrimeSTAR Max DNA Polymerase 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プライマーを用いることができます。

オプションプロトコールで行う 1 ステップ RT-PCR の場合は、PrimeScript RTase と PrimeSTAR Max DNA Polymerase が共存する同一反応系で、RNA からの cDNA 合成反応を行い、引き続き、PCR 増幅を行います。  
RNA からの cDNA 合成には、PCR 時のアンチセンスプライマーを利用します。

## VI. 特長

### ■ 2 ステップ RT-PCR (標準プロトコール) の場合

RNA テンプレート	全般
増幅サイズ	6 kb の良好な増幅を確認
逆転写酵素	PrimeScript RTase (至適温度 42°C)
DNA Polymerase	PrimeSTAR Max DNA Polymerase (2 × プレミックスタイプ)
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

} 選択

### ■ 1 ステップ RT-PCR (オプションプロトコール) の場合

RNA テンプレート	全般
増幅サイズ	6 kb の増幅を確認
逆転写酵素	PrimeScript RTase (50°C で使用)
DNA Polymerase	PrimeSTAR Max DNA Polymerase (2 × プレミックスタイプ)
RNase Inhibitor	必要 (キットに含まれる)
1st strand cDNA 合成用プライマー	特異的下流プライマー (PCR 時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

---

## VII. 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. 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 RTase、RNase Inhibitor、PrimeSTAR Max Premix (2 ×) 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。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. 酵素類は使用前まで -20℃で保存し、使用後は直ちに -20℃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℃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。

### 【2ステップ RT-PCR におけるプライマーの選択について】

逆転写反応の際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

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。

なお、1ステップ RT-PCR (オプションプロトコール) の場合は、特異的下流プライマー (PCR 時のアンチセンスプライマー) のみが使用可能です。Oligo dT Primer や Random 6 mers は使用できませんのでご注意ください。

## VIII. 操作 (2 ステップ RT-PCR)

本キットでは2ステップ RT-PCR を標準プロトコールとして推奨しています。ここでは2ステップ RT-PCR の操作方法を紹介します。1ステップ RT-PCR を行いたい場合は12ページのオプション操作 (1ステップ RT-PCR) をご参照ください。

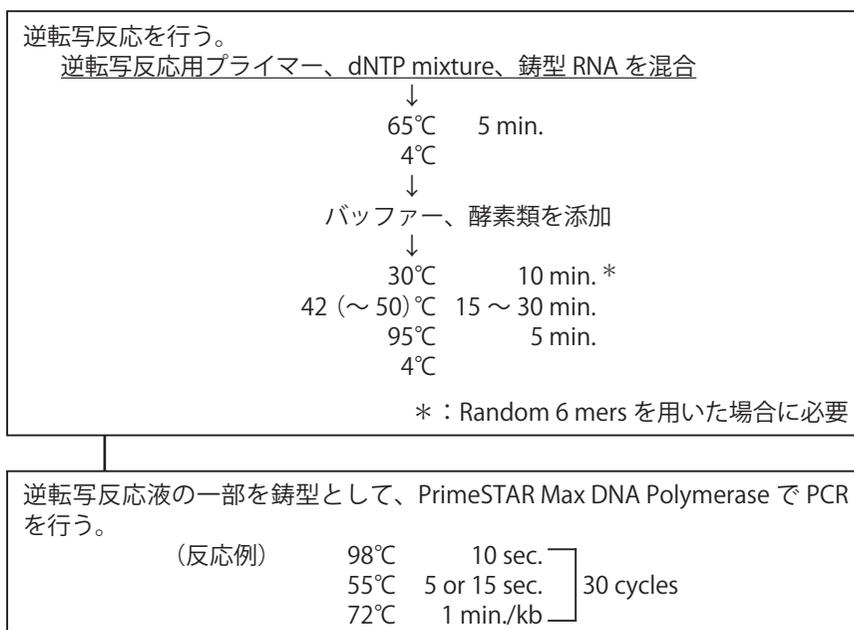


図 3. PrimeScript High Fidelity RT-PCR Kit を用いた 2 ステップ RT-PCR のフローチャート

### 【2 ステップ RT-PCR (標準プロトコール)】

#### 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 $\mu$ l
Oligo dT Primer (2.5 $\mu$ M) or Random 6 mers (20 $\mu$ M) or Specific Primer (2 $\mu$ M) *1	1 $\mu$ l
Template RNA *2 (or Positive Control RNA)	
RNase Free dH <sub>2</sub> O	2 $\mu$ l [ 4 $\times$ 10 <sup>5</sup> copies ] up to 10 $\mu$ 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7項をご参照ください。)

\* 2 : Template RNA は、8  $\mu$ l まで持ち込むことができます。total RNA の場合、3  $\mu$ g まで使用可能です (推奨使用量 : 100 ng ~ 1  $\mu$ 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 $\mu$ l
5 × PrimeScript Buffer	4 $\mu$ l
RNase Inhibitor (40 U/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l
PrimeScript RTase (for 2 step)	0.5 $\mu$ l
RNase Free dH <sub>2</sub> O	5 $\mu$ l
Total	20 $\mu$ 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.)\*<sup>3</sup>  
42°C (~ 50°C) 15 ~ 30 min.  
95°C            5 min.\*<sup>4</sup>  
4°C

\* 3：逆転写反応に Random 6 mers を用いる場合に行ってください。この操作により Random 6 mers が鋳型 RNA と 42°C (~ 50°C) で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
PrimeSTAR Max Premix (2 ×)	25 μl	1 ×
上流 Primer (20 μM) *5 (センス)	0.5 μl	0.2 μM
下流 Primer (20 μM) *6 (アンチセンス)	0.5 μl	0.2 μM
A-4. の逆転写反応液	≤ 5 μl	
滅菌精製水	up to 50 μl	

\* 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	Positive Control RNA の場合* 7
98°C 10 sec.	98°C 10 sec.
55°C 5 or 15 sec.	55°C 5 sec.
72°C 1 min./kb	72°C 30 sec.
30 cycles	30 cycles

\* 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。

### 【PCR 条件について】

- 変性条件 98°C 5 ~ 10 sec. を推奨します。94°C で行う場合は 10 ~ 15 sec. に設定してください。
- アニーリング温度 まず 55°C で試してください。
- アニーリング時間 プライマーの Tm 値 (下記の式で計算) が 55°C 以上の場合 → 5 sec. に設定  
プライマーの Tm 値 (下記の式で計算) が 55°C 未満の場合 → 15 sec. に設定

※ Tm 値計算方法

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

プライマーの長さが 25 mer 以下の場合に適用してください。25 mer を超える場合は、アニーリング時間を 5 sec. に設定してください。

【重要】 PrimeSTAR Max DNA Polymerase はプライミング効率が非常に高い酵素ですので、アニーリング時間は 5 sec. もしくは 15 sec. に設定して反応を行ってください。アニーリング時間が長くなると、スミアが生じる場合があります。

上記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。なお、Tm 値が 70°C 以上のプライマーを使用する場合には、2 step PCR (シャトル PCR) での反応をお試しください。

< スマア、エキストラバンドが生じる場合 >

- (1) アニーリング時間を短くする。15 sec. で行っている場合は 5 sec. に設定する。
- (2) 既に 5 sec. に設定している場合は、アニーリング温度を 58 ~ 63°C に上げる。
- (3) 2 step PCR にする。

< 目的産物が増幅しない (少ない) 場合 >

- (1) アニーリング時間を長くする。5 sec. で行っている場合は 15 sec. に設定する。
- (2) アニーリング温度を 50 ~ 53°C に下げる。

※ PrimeSTAR Max Premix 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。

## IX. 実施例 (2 ステップ RT-PCR)

### 1. 増幅鎖長の確認

ヒト心臓由来 total RNA を鋳型として、Dystrophin 遺伝子の様々な長さの領域を 2 ステップ RT-PCR で増幅しました。

#### 【方法】

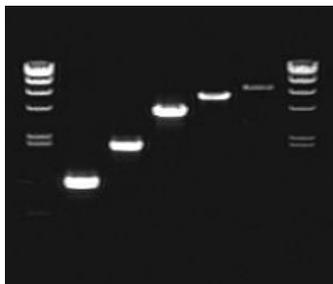
total RNA 800 ng/20  $\mu$ l 反応系で逆転写反応 (oligo dT Primer を使用) を行い、そのうち 5  $\mu$ l を鋳型として 50  $\mu$ l 反応系 (total RNA 200 ng 相当 /50  $\mu$ l PCR 反応系) で下記条件の PCR を行った。

PCR 条件： 98°C 10 sec.    ┌  
          55°C 15 sec.   ├ 30 cycles  
          72°C 1 min./kb └

#### 【結果】

~ 6 kb で良好な伸長と増幅が確認できました。

M 1 2 4 6 8 M (kb)



M :  $\lambda$ -Hind III digest

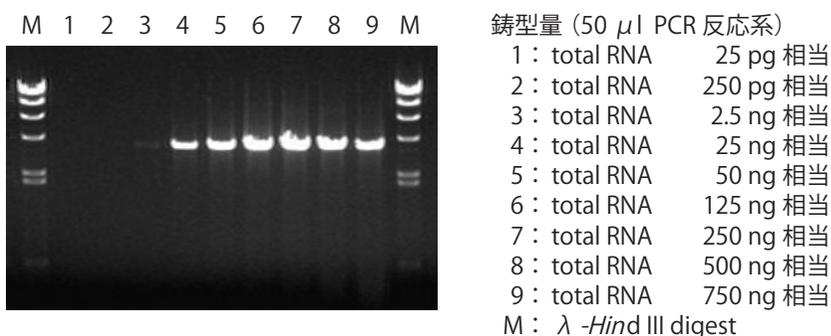
## 2. 鋳型量の許容範囲の検討

### 【方法】

HL60 細胞由来の total RNA (100 pg, 1 ng, 10 ng, 100 ng, 200 ng, 500 ng, 1  $\mu$ g, 2  $\mu$ g, 3  $\mu$ g) を鋳型として用い、本キットのプロトコールにより Oligo dT Primer を用いた逆転写反応を 20  $\mu$ l 反応系で行った。その一部 (5  $\mu$ l) を PCR に使用し、トランスフェリンレセプター (TFR) 4 kb を増幅した。

PCR 条件： 98°C 10 sec. }  
55°C 15 sec. } 30 cycles  
72°C 4 min. }

### 【結果】



RT 反応時の total RNA 量を 3  $\mu$ g/20  $\mu$ l まで増やしても、問題なく良好な TFR 遺伝子の増幅が確認できました。

なお、PCR の伸長時間を 2 min./kb に設定することで、RT 反応時の total RNA の使用量をさらに 6  $\mu$ g/20  $\mu$ l まで増やすことも可能です。

## X. オプション操作 (1 ステップ RT-PCR)

本キットは標準プロトコールを一部変更することで 1 ステップ RT-PCR にも利用できます。ここでは 1 ステップ RT-PCR の操作方法を紹介します。

### 【1 ステップ RT-PCR (オプションプロトコール)】

1. 下記に示す反応液を調製する。

試薬	使用量	最終濃度
PrimeSTAR Max Premix (2 $\times$ )	25 $\mu$ l	1 $\times$
PrimeScript RTase (for 2 step)	0.5 $\mu$ l	
RNase Inhibitor (40 U/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l	
上流 Primer (20 $\mu$ M) *1 (センス)	1 $\mu$ l	0.4 $\mu$ M
下流 Primer (20 $\mu$ M) *2 (アンチセンス)	1 $\mu$ l	0.4 $\mu$ M
Template RNA *3		
RNase Free dH <sub>2</sub> O	up to 50 $\mu$ 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 20 ~ 200 ng の使用を推奨。

なお、Positive Control RNA の場合は 1  $\mu$ 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

50°C	30 min.	
94°C	2 min.	
↓		
98°C	10 sec.	} 30 cycles
55°C	5 or 15 sec.	
72°C	1 min./kb	

Positive Control RNA の場合

コントロール反応では、462 bp が検出される。

50°C	30 min.	
94°C	2 min.	
↓		
98°C	10 sec.	} 30 cycles
55°C	5 sec.	
72°C	30 sec.	

【1 ステップ RT-PCR での PCR 条件について】

- 変性条件 98°C、5 ~ 10 sec. を推奨します。  
94°Cで行う場合は 10 ~ 15 sec. に設定してください。
- アニーリング温度 まず 55°Cで試してください。
- アニーリング時間 プライマーの Tm 値 (下記の式で計算) が 55°C以上の場合  
→ 5 sec. に設定  
プライマーの Tm 値 (下記の式で計算) が 55°C未満の場合  
→ 15 sec. に設定

※ Tm 値計算方法

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

プライマーの長さが 25 mer 以下の場合に適用してください。25 mer を超える場合は、アニーリング時間を 5 sec. に設定してください。

【重要】PrimeSTAR Max DNA Polymerase はプライミング効率が非常に高い酵素ですので、アニーリング時間は 5 sec. もしくは 15 sec. に設定して反応を行ってください。アニーリング時間が長くなると、スミアが生じる場合があります。

上記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) アニーリング時間を短くする。15 sec. で行っている場合は 5 sec. に設定する。
- (2) 既に 5 sec. に設定している場合は、アニーリング温度を 58 ~ 63°Cに上げる。

< 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 サイクルを増やして反応を行う。
- (3) アニーリング時間を長くする。5 sec. で行っている場合は 15 sec. に設定する。
- (4) アニーリング温度を 50 ~ 53°Cに下げる。

※ PrimeSTAR Max Premix 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。

## XI. 実施例 (1 ステップ RT-PCR)

### 1. 増幅鎖長の確認

#### 【方法】

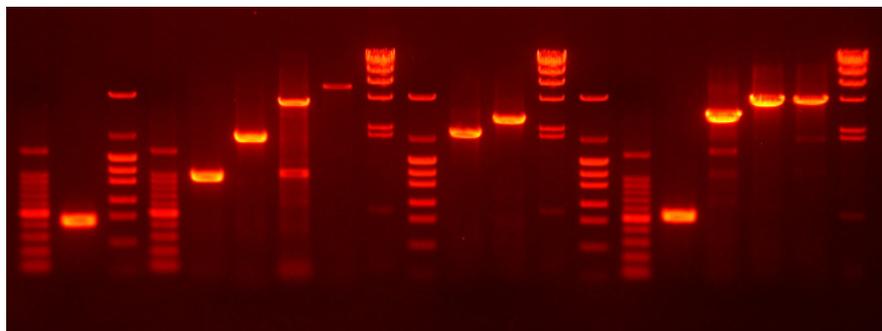
ヒト心臓由来の total RNA、または HL60 細胞由来の total RNA を鋳型として (100 ng/50  $\mu$ l 反応系)、ターゲット遺伝子の様々な長さの領域を 1 ステップ RT-PCR で増幅した。

反応条件： 50°C      30 min.  
              94°C      2 min.  
              ↓  
              98°C      10 sec.    ]  
              55°C      5 or 15 sec. ] 30 cycles  
              72°C      1 min./kb ]

#### 【結果】

0.5 ~ 6 kb で、増幅が確認できました。

M1 1 M2 M1 2 3 4 5 M3 M2 6 7 M3 M2 M1 8 9 10 11 M3



1 : GAPDH	428 bp	7 : CCND2	2.8 kb	M2 : pHY Marker
2 : Dystrophin	1 kb *	8 : TFR	500 bp	M3 : $\lambda$ -Hind III digest
3 : Dystrophin	2 kb *	9 : TFR	3 kb	
4 : Dystrophin	4 kb *	10 : TFR	4 kb	* : ヒト心臓由来の total RNA を鋳型
5 : Dystrophin	6 kb *	11 : TFR	4.4 kb	として使用。他のターゲットは
6 : CCND2	2.1 kb	M1 : 100 bp DNA Ladder		HL60 由来 total RNA を使用。

## 2. 検出感度の測定

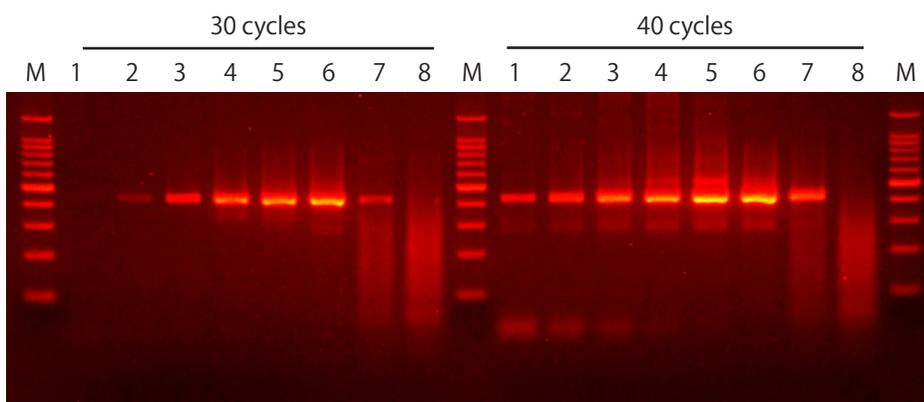
### 【方法】

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： 50°C 30 min.  
94°C 2 min.  
↓  
98°C 10 sec. } 30 または 40 cycles  
55°C 15 sec. }  
72°C 30 sec. }

### 【結果】

total RNA 量 10 pg (30 cycles) または 1 pg (40 cycles) から検出が可能でした。



鋳型 (total RNA) 量	5 : 10 ng
1 : 1 pg	6 : 100 ng
2 : 10 pg	7 : 1 $\mu$ g
3 : 100 pg	8 : 2 $\mu$ g
4 : 1 ng	M : 100 bp DNA Ladder

---

## XII. 増幅産物の電気泳動、クローニング、シーケンスについて

### 1. 増幅産物の電気泳動

本キット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

本キット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。したがって、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。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、NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (製品コード 740609.10/.50/.250) を用いる PCR Clean-up 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 Max DNA Polymerase 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。

### 4. ダイレクトシーケンスを行う場合

本酵素は 3'→5' exonuclease 活性を有するため、ダイレクトシーケンシングを行う前にフェノール/クロロホルム処理、NucleoSpin Gel and PCR Clean-up を用いる PCR Clean-up などのタンパク質除去操作を行うことをお勧めします。

### XIII. 関連製品

PrimeScript™ Reverse Transcriptase (製品コード 2680A/B/C)  
PrimeSTAR® Max DNA Polymerase (製品コード R045A/B)  
PrimeScript™ II High Fidelity RT-PCR Kit (製品コード R023A/B)  
PrimeScript™ RT-PCR Kit (製品コード RR014A/B)  
PrimeScript™ II High Fidelity One Step RT-PCR Kit (製品コード R026A/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)  
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)  
*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)  
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)  
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (製品コード 740609.10/.50/.250)

### XIV. 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**