

製品コード RR012A

研究用

TaKaRa

**TaKaRa RNA LA PCR™ Kit
(AMV) Ver.1.1**

説明書

v202006Da

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 を合成することにより、PCR 法を RNA の解析に応用することが可能となります。現在までにこの方法により 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。

本製品は、RNA を cDNA に変換した後に PCR を行う RT-PCR のためのキットであり、AMV (Avian Myeloblastosis Virus) 由来の Reverse Transcriptase による RNA からの cDNA 合成、および *TaKaRa LA Taq*[®] による cDNA 増幅を 1 本のチューブ内で行うことができます。

本製品の Oligo dT-Adaptor Primer は、polyA⁺ RNA の 3' 末端からの cDNA 合成をさらに効率よく行えるよう工夫されています。これにより、3'-RACE System による未知の 3' 末端の増幅を効率よく行うことが可能です。さらに本製品は、LA PCR テクノロジーを加味した RNA PCR Kit であり、より長くより正確な RT-PCR を可能にします。

I. 内容 (100 回分) *

1.	AMV Reverse Transcriptase XL	5 U/μl	50 μl
2.	RNase Inhibitor	40 U/μl	25 μl
3.	Random 9 mers	50 pmol/μl	50 μl
4.	Oligo dT-Adaptor Primer	2.5 pmol/μl	50 μl
5.	RNase Free dH ₂ O		1 ml
6.	<i>TaKaRa LA Taq</i>	5 U/μl	25 μl
7.	M13 Primer M4	20 pmol/μl	50 μl
8.	10 × RNA PCR Buffer		120 μl
9.	10 × LA PCR Buffer II (Mg ²⁺ free)		500 μl
10.	dNTP Mixture	各 10 mM	150 μl
11.	MgCl ₂	25 mM	1 ml
12.	Control R-1 Primer (Positive Control RNA 用下流 Primer)	20 pmol/μl	25 μl
13.	Control F-1 Primer (Positive Control RNA 用上流 Primer)	20 pmol/μl	25 μl
14.	Positive Control RNA (pSPTet3 プラスミドの転写 polyA ⁺ RNA)	2 × 10 ⁵ copies/μl	25 μl

* : 逆転写反応 (10 μl) → PCR 反応 (50 μl) で 100 回分です。

【各プライマーのシーケンス】

- Random 9 mers 5' - NNNNNNNNN - 3'
- Oligo dT-Adaptor Primer 弊社独自の設計による dT 領域と M13 Primer M4 配列を含む。
- Control F-1 Primer 5' - CTGCTCGCTTCGCTACTTGGA - 3'
- Control R-1 Primer 5' - CGGCACCTGTCCTACGAGTTG - 3'
- M13 Primer M4 5' - GTTTTCCCAGTCACGAC - 3'

【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ある。この Control RNA は、30 個のアデニン塩基よりなる polyA tail を持つ鎖長約 1.4 kb の polyA⁺ RNA で、この RNA を鋳型に二本鎖 cDNA を合成して、適当なプラスミドに挿入した際、この二本鎖 cDNA が full-length のものであれば、このプラスミドはテトラサイクリン耐性になる。

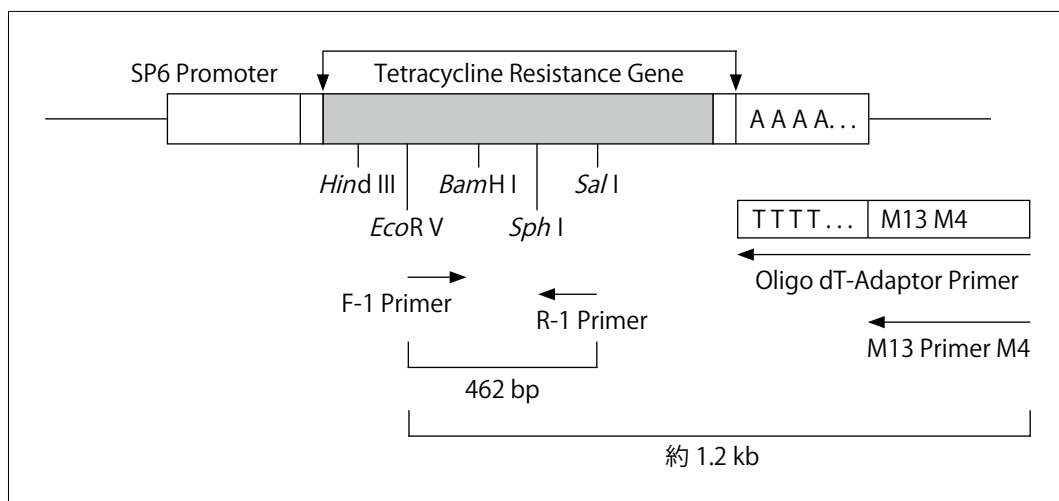


図 1. Positive Control RNA：各プライマーを用いた際の増幅断片

【キット以外に必要な試薬、機器（主なもの）】

1. 遺伝子増幅装置 (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
 - PrimeGel™ Agarose PCR-Sieve (製品コード 5810A)
 - PrimeGel Agarose LE 1-20K GAT (製品コード 5801A) 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)
 - Mupid-One (製品コード O1-01)
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

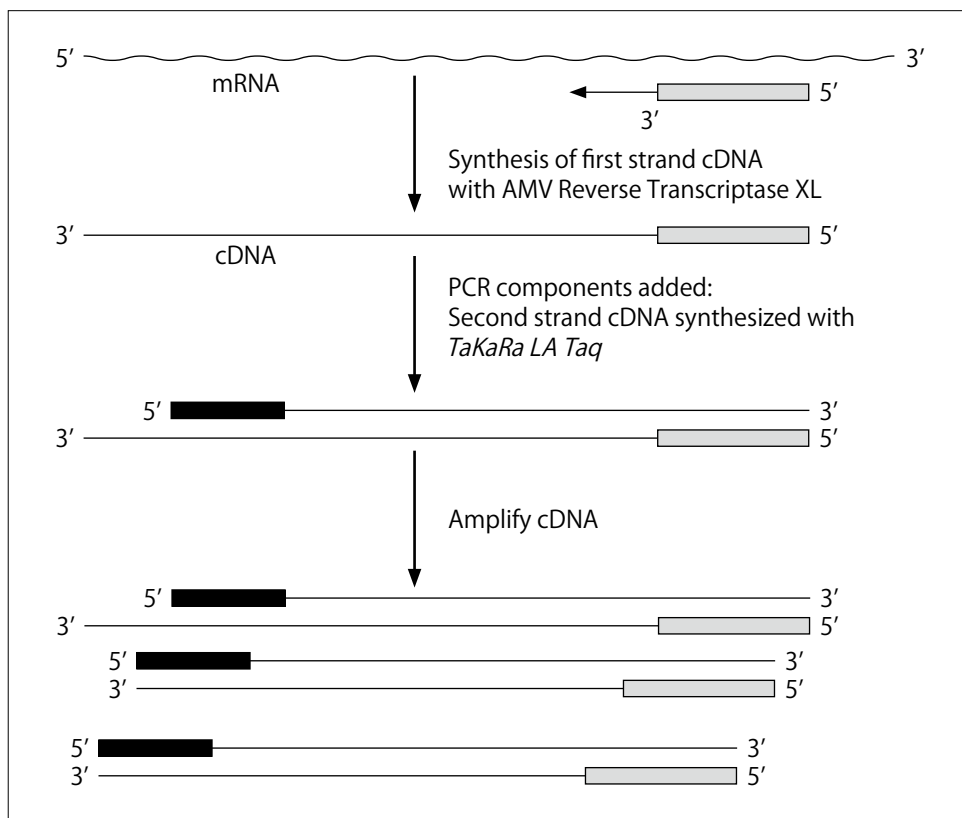


図 2. RNA LA PCR の原理

mRNA

AMV RTase XL ほか逆転写反応に必要な試薬を加える。

反応：	(30°C	10 min.)*] 1 cycle
	42 ~ 60°C	15 ~ 30 min.	
	95°C	5 min.	
	5°C	5 min.	

*： Random 9 mers を使用する場合、Random 9 mers がサンプル RNA と 42 ~ 60°C で充分アニーリングできるような長さになるまで伸長するように、あらかじめ 30°C で 10 分間逆転写反応を行う。

同一チューブに TaKaRa LA Taq ほか PCR に必要な試薬を加える。

Condition of thermal cycling:

94°C	2 min.] 1 cycle
94°C	0.5 min.	
60°C	0.5 min.] 28 cycles
72°C	1 ~ 2 min./kb	

増幅産物

一部をとってアガロースゲル電気泳動を行い、増幅を確認する。

TaKaRa RNA LA PCR Kit Ver.1.1 は、AMV Reverse Transcriptase XL による RNA からの cDNA 合成を行い、続けて同一チューブ内で *TaKaRa LA Taq* 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 9 mers、Oligo dT-Adaptor Primer あるいは PCR の際のアンチセンスプライマーに相当する cDNA の下流部分の配列を有する特異的なプライマー（特異的下流 PCR プライマー）を用いることができます。3'-RACE 法を行う際は、Oligo dT-Adaptor Primer を用います。

IV. 特長

RNA テンプレート	全般
増幅サイズ	少なくとも 12 kb までは増幅可能
逆転写酵素	AMV Reverse Transcriptase XL (42 ~ 60°C で逆転写可能)
DNA Polymerase	<i>TaKaRa LA Taq</i>
RNase Inhibitor	必要 (キットに含まれる)
1st ストランド cDNA 合成用プライマー	Random 9 mers Oligo dT- Adaptor Primer 特異的下流 PCR プライマー } より選択可
3'-RACE 法	RT 時に Oligo dT-Adaptor Primer、そして PCR 時に M13 Primer M4 を使用することにより 3'-RACE 法に対応
操作	1 本のチューブ内で反応可。熱処理により逆転写酵素活性を失活させた後、PCR 反応を行う。

V. 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) 残っている DEPC を除去するために、オートクレーブ (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】

実験に用いる溶液は、乾熱滅菌 (180℃、60 分) あるいは上記の条件で DEPC 処理を行ったガラス器具で調製し、可能ならば 0.1% DEPC 処理を行いオートクレーブしたものを用います。反応に用いる滅菌精製水も上記のように処理することをお勧めします。用いる溶液、滅菌精製水はすべて RNA 実験専用としてお使いください。

【RNA サンプルの調製法】

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 (グアニジンチオシアネート法) 等が高純度に精製した 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。

1 回の反応に用いる RNA サンプル量は、本キットの場合、total RNA として約 500 ng が最適です。

VI. 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、Master mix (RNase Free dH₂O、バッファー、dNTP Mixture、MgCl₂ 等の混合液) を数回～10 回分ぐらいまとめて調製すると便利です。Master mix を作ることにより、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. Reverse Transcriptase、RNase Inhibitor、*TaKaRa LA Taq* 等、酵素類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。
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℃ 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。また、deep freezer をお持ちの場合は、-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。

【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 9 mers、Oligo dT-Adaptor Primer、特異的下流 PCR 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。

Random 9 mers :

長い RNA の逆転写反応の場合、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。
Random 9 mers を用いて cDNA 合成を行った後の PCR では、どんなペアの PCR プライマーでも用いることが可能です。

特異的下流 PCR 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、あらかじ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。

Oligo dT-Adaptor 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。)

効率よく cDNA 合成が行えるよう工夫されています。
逆転写反応後、Adaptor 領域に相補的な M13 Primer M4 を利用した 3'-RACE 法が行えます。

VII. 操作

< A. 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	最終濃度 [または反応系に加える量]
MgCl ₂	2 μl	5 mM
10 × RNA PCR Buffer	1 μl	1 ×
RNase Free dH ₂ O	4.25 μl	
dNTP Mixture	1 μl	1 mM
RNase Inhibitor	0.25 μl	1 U/μl
AMV Reverse Transcriptase XL *1	0.5 μl	0.25 U/μl
Random 9 mers or Oligo dT-Adaptor Primer or 特異的下流 PCR プライマー (Control R-1 Primer)	0.5 μl	2.5 μM or 0.125 μM or 1.0 μM
Positive Control RNA or Experimental Sample	0.5 μl	[1 × 10 ⁵ copies] or [≤ 500 ng total RNA]
Total	10 μl/sample	

A-2. 反応に用いるプライマーは、Random 9 mers、Oligo dT-Adaptor Primer、特異的下流 PCR プライマー (Control RNA の場合は Control R-1 Primer) のいずれかを選ぶ。
(選択基準については「VI. 操作上の注意」をご参照ください。)

調製済のチューブをサーマルサイクラーにセットし、次のプログラムで反応を行う。

(30°C	10 min.)*2	} 1 cycle
42 ~ 60°C *3	15 ~ 30 min.	
99°C	5 min.*4	
5°C	5 min.	

* 1 : Reverse Transcriptase は cDNA に結合しているため、そのまま PCR を行うと反応を阻害します。A-1. の反応液の場合、99°C、5 分で Reverse Transcriptase は失活し、PCR に対する阻害もなくなります。Reverse Transcriptase の濃度を増やせば不活性化が難しくなりますので、長鎖の RNA の場合は Reverse Transcriptase の量を増やすよりも、42°C 付近で反応時間を長くすることをお勧めします。

* 2 : プライマーに Random 9 mers を用いる場合は、Random 9 mers がサンプル RNA と 42 ~ 60°C で充分アニーリングできるような長さになるまで伸長するように、あらかじめ 30°C で 10 分間逆転写反応を行ってください。

* 3 : AMV 由来 Reverse Transcriptase は 60°C でも逆転写反応を行うことができます。ただし、高温で反応性の悪い場合は 42°C 付近での反応をお勧めします。また、Positive Control RNA を鋳型に逆転写反応を行う場合、50°C をお勧めします。

* 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 分の失活操作を行ってください。

< B. PCR >

B-1. 下記に示す反応液を調製する

試薬	使用量	最終濃度 (反応液 50 μ l 時)
TaKaRa LA Taq	0.25 μ l	1.25 U/50 μ l
10 \times LA PCR Buffer II (Mg ²⁺ free)	4 μ l	1 \times
MgCl ₂	3 μ l	2.5 mM
上流 PCR プライマー (Control RNA の場合 F-1 Primer)	0.5 μ l	0.2 μ M
下流 PCR プライマー*5 [Control RNA の場合 R-1 Primer、 または M13 Primer M4 (逆転写の際 Oligo dT-Adapter Primer を用いた場合)]	0.5 μ l	0.2 μ M
滅菌精製水	31.75 μ l	
Total	40 μ l/sample	

* 5 : 逆転写反応で下流 PCR プライマーを用いた場合は、下流 PCR プライマーの代わりに滅菌精製水を 0.5 μ l 加えてください。なお、逆転写反応時のプライマーと PCR 反応時の下流プライマーは変えたほうが効率がよくなります。

B-2. B-1. の反応液 40 μ l を A-1. で逆転写反応を終了したチューブに添加する。

B-3. マイクロ遠心機で約 10 秒間遠心する。

B-4. 調製したチューブをサーマルサイクラーにセットし、至適プログラムで増幅させる。

94°C	2 min.	1 cycle	
↓			
94°C	30 sec.	} 28 cycles	
60°C	30 sec.		
72°C	1 ~ 2 min./kb		

B-5. 反応終了後、反応液の一部 (5 ~ 10 μ l) でアガロースゲル電気泳動を行い、反応産物を確認する。

[注意] PCR 増幅産物は解析するまで凍結保存してください。

Positive Control RNA の場合 (図 1 参照)

逆転写反応 primer	PCR primers	増幅断片
Oligo dT-Adaptor Primer	F-1 と M13 Primer M4 または F-1 と R-1	約 1.2 kb 462 bp
Random 9 mers	F-1 と R-1	462 bp
Control R-1 Primer	F-1 と R-1	462 bp

VIII. PCR 条件について

- アニーリング温度
Positive Control RNA の場合は 60°C で行いますが、実際のサンプルの場合は条件が変わりますので、37 ~ 65°C の範囲で至適温度を調べてください。
- 伸長時間
伸長時間はターゲットの鎖長の長さにあわせて変更します。TaKaRa LA Taq では、72°C で 1 kb 当り 1 ~ 2 分を目安に設定してください。
- サイクル数
cDNA 量が少ない場合は、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。

IX. 実験例 1：長鎖 mRNA (約 12 kb) の増幅

- ・ サンプル RNA：ヒト心臓由来 mRNA
- ・ ターゲット：ジストロフィン
- ・ 増幅サイズ：12 kb

< A. 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	最終濃度
MgCl ₂	2 μl	5 mM
10 × RNA PCR Buffer	1 μl	1 ×
dNTP Mixture	1 μl	1 mM
RNase Inhibitor	0.25 μl	1 U/μl
AMV Reverse Transcriptase XL	0.5 μl	0.25 U/μl
Random 9 mers	0.5 μl	2.5 μM
ヒト心臓由来 mRNA	0.25 μl	0.25 μg/10 μl RT
RNase Free dH ₂ O	4.5 μl	
Total	10 μl	

A-2. 調製済のチューブをサーマルサイクラーにセットし、次のプログラムで反応を行う。

30°C	10 min.	} 1 cycle
42°C	50 min.	
70°C	15 min.*	

*：99°C、5 分の失活処理は、合成した 1st ストランド cDNA にニックなどのダメージを与える可能性があり、長鎖を増幅する場合にはお勧めできません。70°C、15 分程度の失活操作を行ってください。

< B. PCR >

B-1. 下記に示す反応液を調製する。

試薬	使用量	最終濃度 (反応液 50 μ l 時)
MgCl ₂	3 μ l	2.5 mM
10 × LA PCR Buffer II (Mg ²⁺ free)	4 μ l	1 ×
TaKaRa LA Taq	0.25 μ l	1.25 U/50 μ l
Primers	1 μ l	各 0.2 μ M
滅菌精製水	31.75 μ l	
Total	40 μ l	

B-2. B-1. の反応液 40 μ l を A. で逆転写反応を終了したチューブに添加する。

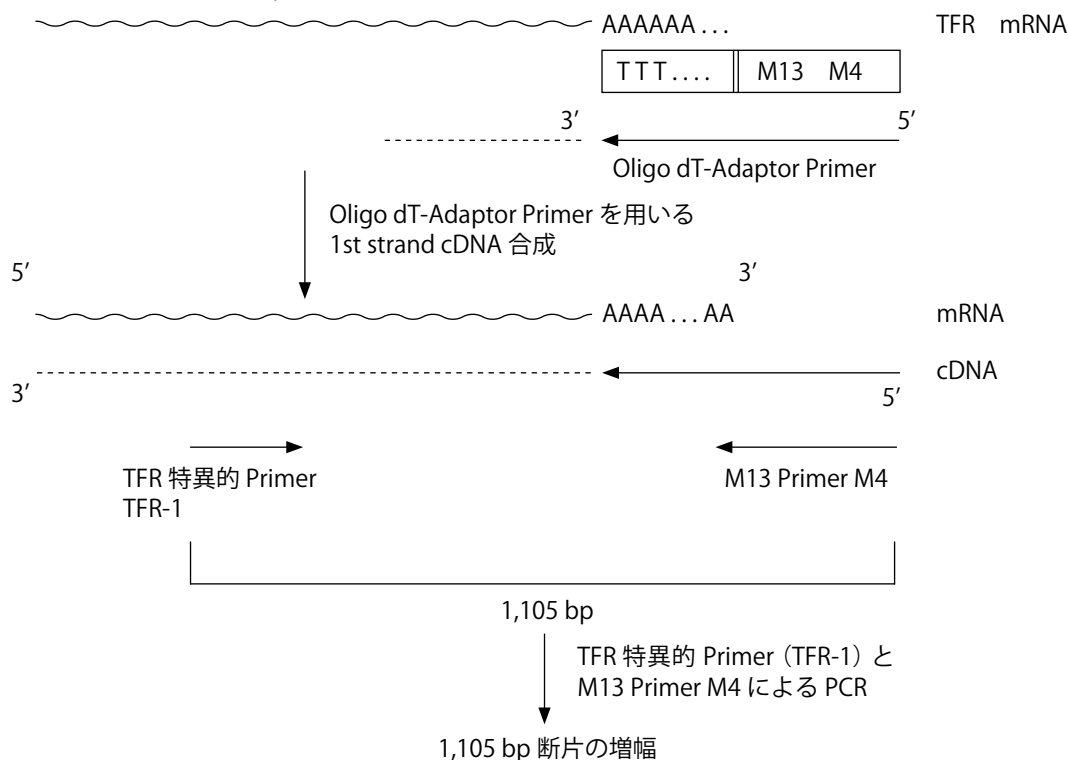
B-3. 調製したチューブをサーマルサイクラーにセットし、次のプログラムで反応を行う。

94°C 30 sec.] 30 cycles
65°C 15 min.]

B-4. 反応終了後、反応液の一部 (5 μ l) をアガロースゲル電気泳動で確認する。目的の増幅ラグメント (12 kb) が確認できる。

X. 実験例 2 : 3'-RACE 法の場合

- ・ サンプル RNA : ヒト培養細胞 HL60 由来 total RNA
- ・ ターゲット : トランスフェリンレセプター (TFR)
- ・ 増幅サイズ : 1,105 bp



< A. 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	最終濃度
MgCl ₂	2 μ l	5 mM
10 \times RNA PCR Buffer	1 μ l	1 \times
dNTP Mixture	1 μ l	1 mM
RNase Inhibitor	0.25 μ l	1 U/ μ l
AMV Reverse Transcriptase XL	0.5 μ l	0.25 U/ μ l
Oligo dT-Adaptor Primer	0.5 μ l	0.125 μ M
HL60 由来 total RNA (1 μ g/ μ l)	0.5 μ l	0.5 μ g/10 μ l RT
RNase Free dH ₂ O	4.25 μ l	
Total	10 μ l	

A-2. 調製済のチューブをサーマルサイクラーにセットし、次のプログラムで反応を行う。

30°C	10 min.	} 1 cycle
50°C	30 min.	
99°C	5 min.	
5°C	5 min.	

< B. PCR >

B-1. 下記に示す反応液を調製する。

試薬	使用量	最終濃度 (反応液 50 μ l 時)
MgCl ₂	3 μ l	2.5 mM
10 \times LA PCR Buffer II (Mg ²⁺ free)	4 μ l	1 \times
<i>TaKaRa LA Taq</i>	0.25 μ l	1.25 U/50 μ l
TFR-1 Primer	0.5 μ l	0.2 μ M
M13 Primer M4	0.5 μ l	0.2 μ M
滅菌精製水	31.75 μ l	
Total	40 μ l	

B-2. B-1. の反応液 40 μ l を A. で逆転写反応を終了したチューブに添加する。

B-3. 調製したチューブをサーマルサイクラーにセットし、次のプログラムで反応を行う。

94°C	30 sec.	} 30 cycles
55°C	30 sec.	
72°C	5 min.	

B-4. 反応終了後、反応液の一部 (5 μ l) をアガロースゲル電気泳動で確認する。目的の増幅フラグメント (1,105 bp) が確認できる。

XI. 参考文献

- 1) Kawasaki E S and Wang A M.
PCR Technology. (Erlich, H. A. ed). *Stockton Press*. (1989) 89-97.
- 2) Lynas C, Cook S D, Laycock A, Bradfield J W B, and Maitland N J.
J Pathology. (1989) **157**: 285-289.
- 3) Frohman M A, Dush M K, and Martin G R.
Proc Natl Acad Sci USA. (1988) **85**: 8998-9002.

XII. 関連製品

TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® Gradient (製品コード TP600)
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® *Touch* (製品コード TP350)
Reverse Transcriptase XL (AMV) for RT-PCR Kit (製品コード 2630A)
Ribonuclease Inhibitor (ブタ肝臓由来) (製品コード 2311A/B)
Recombinant RNase Inhibitor (製品コード 2313A/B)
TaKaRa LA Taq® (製品コード RR002A/B)
PrimeGel™ Agarose PCR-Sieve (製品コード 5810A)
PrimeGel™ Agarose LE 1-20K GAT (製品コード 5801A)
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)
Mupid-2plus (製品コード M-2P)
Mupid-exU (製品コード EXU-1)
Mupid-One (製品コード O1-01)

XIII. 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。
- ・*TaKaRa LA Taq*、Thermal Cycler Dice はタカラバイオ株式会社の登録商標です。LA 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 <http://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社