

製品コード RR023A

研究用

Takara

***Bca*BEST™ RNA PCR Kit**

Ver.1.1

説明書

v201712Da

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。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。

本製品は、*Bca*BEST Polymerase を利用して RT-PCR を行うためのキットです。

*Bca*BEST Polymerase は *Bacillus caldotenax* 由来の DNA Polymerase 活性と逆転写活性を合わせ持つ酵素であり、この逆転写活性による RNA からの cDNA 合成、LA PCR™テクノロジーより生まれた *Bca-Optimized™ 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。

*Bca*BEST Polymerase を用いた RT-PCR では反応至適温度が 65°C と高く、複雑な二次構造を持つ RNA から cDNA を合成するのに有効です。

I. 内容 (100 回用) *1

1. <i>Bca</i> BEST Polymerase	22 U/μl	50 μl
2. RNase Inhibitor	40 U/μl	25 μl
3. Random 9 mers	50 μM	50 μl
4. Oligo dT Primer	50 μM	50 μl
5. RNase Free dH ₂ O		1 ml
6. <i>Bca-Optimized Taq</i>	5 U/μl	25 μl
7. 2 × <i>Bca</i> 1st Buffer		1.25 ml × 2
8. 5 × <i>Bca</i> 2nd Buffer		800 μl
9. dNTP Mixture	各 10 mM	50 μl
10. MgSO ₄	25 mM	500 μl
11. Control F-1 Primer*2	20 μM	25 μl
12. Control R-1 Primer*3	20 μM	25 μl
13. Positive Control RNA	2 × 10 ⁵ copies/μl	25 μl

* 1 : 逆転写反応 (10 μl) → PCR 反応 (50 μl) で、100 回用

* 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

【各プライマーの配列】

プライマー名	シーケンス
Random 9 mers	5'-NNNNNNNNNN-3'
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'-CGGCACCTGTCCTACGAGTTG-3'

* 4 : 本配列は TaKaRa RNA PCR™ Kit (AMV) Ver.3.0 (製品コード RR019A/B) や TaKaRa RNA LA PCR Kit (AMV) Ver1.1 (製品コード RR012A) の Oligo dT-Adaptor Primer とは異なり、M13 Primer M4 配列を含まない。

【 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。

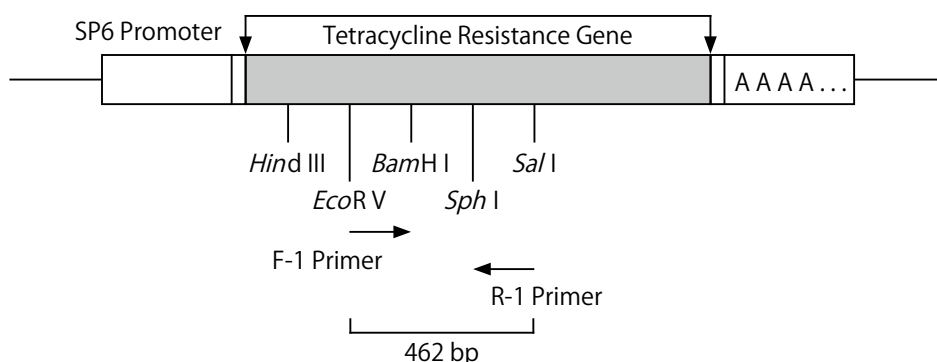


図 1. コントロール RNA：コントロール反応をした際の増幅断片

【キット以外に必要な試薬、機器（主なもの）】

1. 遺伝子増幅システム (authorized instruments)
 - TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® *Touch* (製品コード TP350)
 - TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Gradient (製品コード TP600) *5 など
 - * 5：本キットの使用にはスロープ機能が必要なため、TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice は Ver. 2 以降の機種のみ使用可能。
2. アガロース電気泳動装置及びアガロースゲル
 - Agarose L03「TAKARA」(製品コード 5003/B)
 - PrimeGel™ Agarose LE 1-20K GAT (製品コード 5801A)
 - PrimeGel Agarose PCR-Sieve (製品コード 5810A)
3. マイクロ遠心機
4. 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

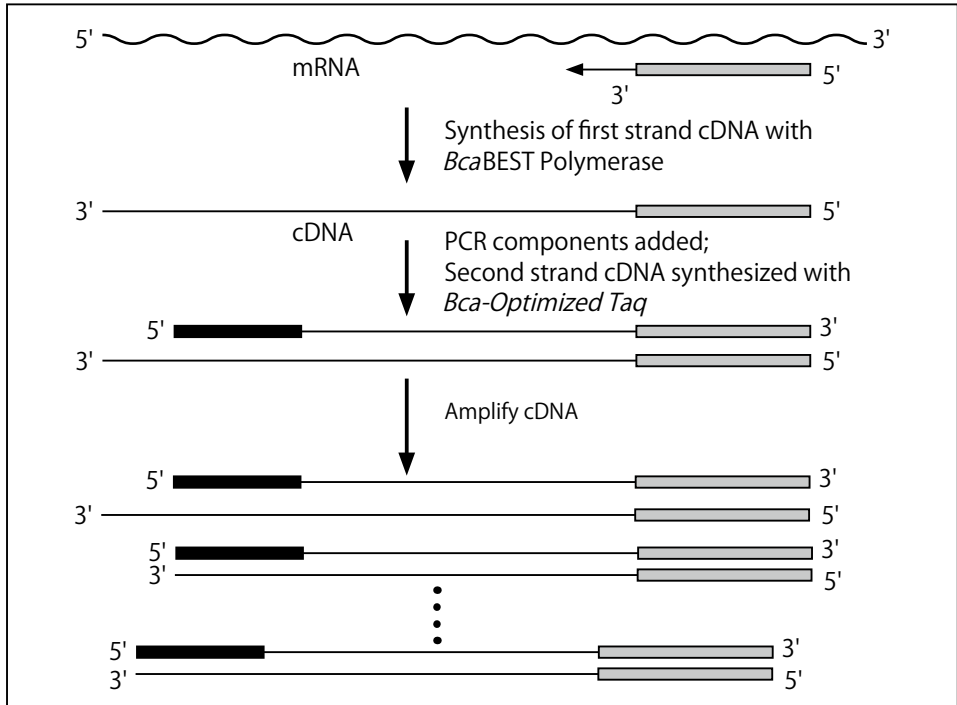


図 2. BcaBEST RNA PCR の原理

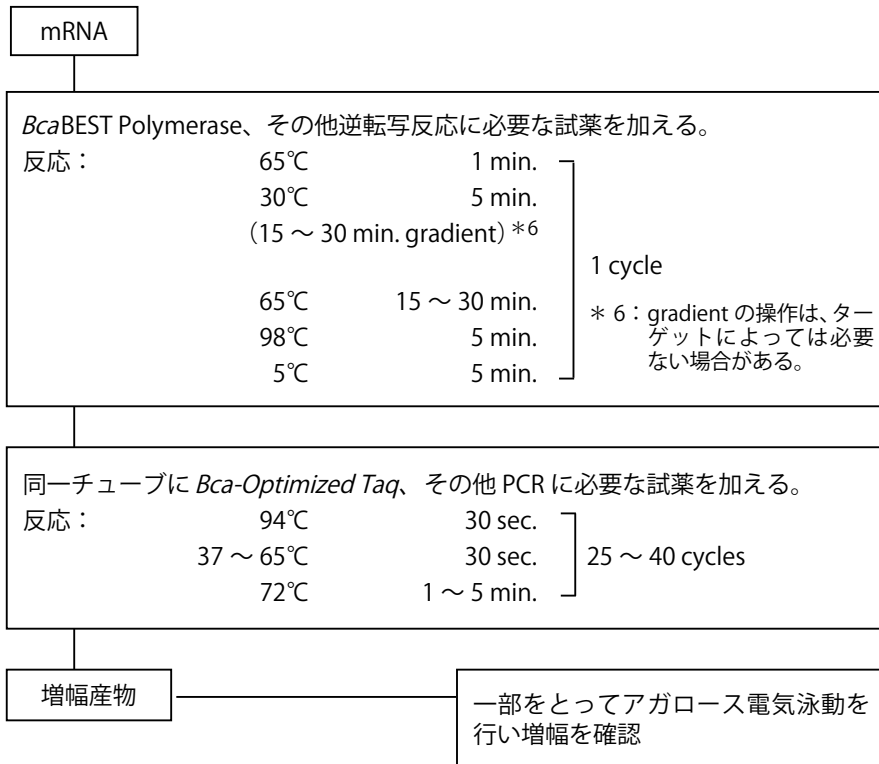


図 3. RNA PCR のフローチャート

IV. 特長

本キットは、*Bca*BEST Polymerase による RNA からの cDNA 合成を行い、続けて同一チューブ内で *Bca*-Optimized *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 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 アンチセンスプライマー）を用いることができます。

RNA テンプレート	全般（特に GC rich な mRNA および強固な二次構造をとる mRNA に有効）	
増幅サイズ	少なくとも 5 kb まで増幅可能	
逆転写酵素	<i>Bca</i> BEST Polymerase（至適温度 65°C）	
DNA Polymerase	<i>Bca</i> -Optimized <i>Taq</i>	
RNase Inhibitor	必要（キットに含まれる）	
1st strand cDNA 合成用プライマー	Random 9 mers Oligo dT Primer 特異的下流プライマー（PCR 時のアンチセンスプライマー）	より選択可
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™ (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 専用として用いることをお勧めします。

【RNA サンプルの調製法】

BcaBEST RNA PCR Kit で 1 回の反応に用いる RNA サンプル量は、total RNA として約 500 ng が最適です。

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。

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。

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、MgSO₄ 等の混液) 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) *BcaBEST Polymerase*、RNase Inhibitor、*Bca-Optimized Taq* 等、酵素類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】

逆転写反応に用い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 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せんが、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。
効率よく cDNA 合成が行えるよう工夫されています。

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 9 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の
で、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。

VII. 操作

(例) 一般的な RT-PCR

A. 逆転写反応

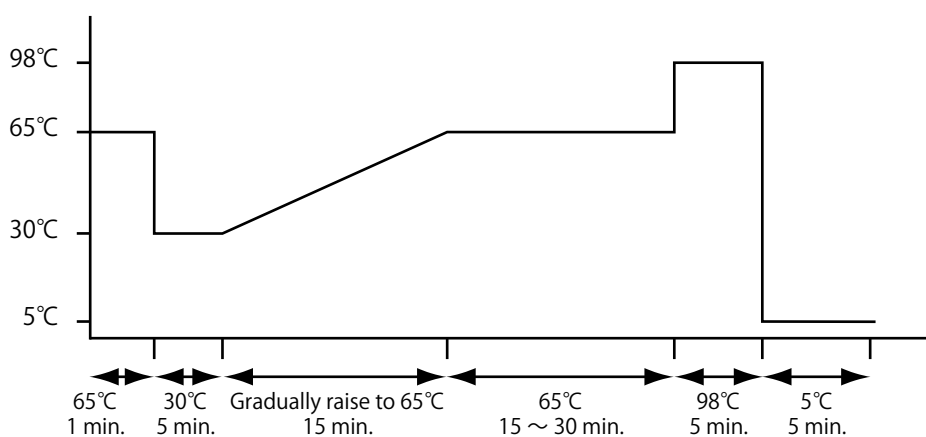
1. 下記に示す反応液を調製する。

試薬	使用量	最終濃度 [または反応系に加える量]
2 × <i>Bca</i> 1st Buffer	5 μl	1 ×
MgSO ₄ (25 mM)	2 μl	5 mM
dNTP Mixture	0.5 μl	0.5 mM
RNase Inhibitor (40 U/μl)	0.25 μl	1 U/μl
<i>Bca</i> BEST Polymerase (22 U/μl)	0.5 μl	1.1 U/μl
Oligo dT Primer or Random 9 mers or 特異的下流プライマー	0.5 μl	
Positive Control RNA or Experimental Sample*7	0.5 μl	[1 × 10 ⁵ copies] or [≦ 500 ng total RNA]
RNase Free dH ₂ O	0.75 μl	
Total	10 μl/Sample	

* 7 : Experimental Sample は、発現量の少ない RNA の場合 1.25 μl まで持ち込むことができる。

2. 反応に用いるプライマーは、Random 9 mers、Oligo dT Primer、特異的下流プライマー (Control RNA の場合は R-1 Primer) のいずれかを選ぶ。(選択基準については 7 ページをご参照ください。) 調製済みのチューブをサーマルサイクラーにセットし、次のプログラムで反応を行う。

【 Positive Control RNA の場合 】



B. PCR 反応

1. 下記に示す反応液を調製する。(常法)

試薬	使用量	最終濃度
MgSO ₄ (25 mM)	3 μ l	2.5 mM
5 \times Bca 2nd Buffer	8 μ l	1 \times
Bca-Optimized Taq	0.25 μ l	1.25 U/50 μ l
上流 Primer (20 μ M) *8 (センス)	0.5 μ l	0.2 μ M
下流 Primer (20 μ M) *9 (アンチセンス)	0.5 μ l	0.2 μ M
滅菌精製水	27.75 μ l	
Total	40 μ l/Sample	

* 8 : Control RNA の場合 F-1 Primer

* 9 : Control RNA の場合 R-1 Primer

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 加える。

- 1'. 上記反応液で増幅産物が得られないサンプルの場合 (変法)

以下の反応液組成をお試しください。改善される場合があります。

試薬	使用量	最終濃度
MgSO ₄ (25 mM)	3 μ l	2.5 mM
2 \times Bca 1st Buffer	20 μ l	1 \times
Bca-Optimized Taq	0.25 μ l	1.25 U/50 μ l
上流 Primer (20 μ M) *8	0.5 μ l	0.2 μ M
下流 Primer (20 μ M) *9	0.5 μ l	0.2 μ M
滅菌精製水	15.75 μ l	
Total	40 μ l/Sample	

2. 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。
3. マイクロ遠心機で約 10 秒間、遠心する。
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。

一般的な反応条件

94°C	30 sec.] 25 ~ 30 cycles
37 ~ 65°C	30 sec.	
72°C	1 ~ 10 min.	
72°C	5 min.	

Positive Control RNA の場合

94°C	30 sec.] 28 cycles
60°C	30 sec.	
72°C	1 min.	

5. 反応終了後、反応液の一部について (5 ~ 10 μ l) をアガロースゲル電気泳動を行い、反応産物を確認する。ただちに電気泳動を行わない場合は、PCR 増幅産物は解析するまで凍結保存する。

【 Positive Control RNA の場合 】

逆転写反応 Primer	PCR Primers	増幅断片
Oligo dT Primer	F-1、R-1	462 bp
Random 9 mers	F-1、R-1	462 bp
R-1 Primer	F-1、R-1	462 bp

PCRの条件について

- ・アニーリング温度
コントロール RNA の場合、60°Cで行っていますが、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、ターゲットのシーケンスの長さに影響されます。
通常、*Bca-Optimized Taq* は72°Cで1 kb あたり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、30～50 cycles 行ってください。

VIII. 参考文献

- 1) Kawasaki E S and Wang A M. *PCR Technology*, (Erich H A ed). (1989) 89-97. Stockton Press, New York.
- 2) Lynas C, Cook S D, Laycock K 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.

IX. 関連製品

TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® *Touch* (製品コード TP350)
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® *Gradient* (製品コード TP600)
NucleoSpin RNA (製品コード 740955.10/.50/.250)
RNAiso Plus (製品コード 9108/9109)
RNase-OFF™ (RNase コンタミネーション除去溶液) (製品コード 9037)
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)
Agarose L03「TAKARA」(製品コード 5003/B)

X. 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 はタカラバイオ株式会社の登録商標です。PrimeGel、*Bca*BEST、LA PCR、*Bca-Optimized*、TaKaRa RNA PCR、RNase-OFF 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