

製品コード RR024A

研究用

TaKaRa

TaKaRa One Step RNA PCR Kit (AMV)

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。原理的に PCR 法は 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した。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、このように RNA を cDNA に変換し PCR を行う RT-PCR 反応を 1 本のチューブ内で連続的に行うためのキットです。必要な試薬を 1 本のチューブに調製するだけで、途中で試薬を添加することなく AMV (Avian Myeloblastosis Virus) 由来の Reverse Transcriptase による RNA からの cDNA 合成、および LA テクノロジーから生まれた *AMV-Optimized Taq* による cDNA 増幅を連続的に行うことができます。本製品は RNA からの cDNA 合成、および cDNA 増幅に必要な全ての試薬を含む研究用キットです。

I. 内容 (50 回分)

1. AMV Reverse Transcriptase XL	5 U/ μ l	50 μ l
2. RNase Free dH ₂ O		1 ml \times 2
3. RNase Inhibitor	40 U/ μ l	50 μ l
4. <i>AMV-Optimized Taq</i>	5 U/ μ l	50 μ l
5. 10 \times One Step RNA PCR Buffer		250 μ l
6. dNTP Mixture	各 10 mM	250 μ l
7. MgCl ₂	25 mM	500 μ l
8. Control F-1 Primer*1	20 μ M	25 μ l
9. Control R-1 Primer*2	20 μ M	25 μ l
10. Positive Control RNA	2 \times 10 ⁵ copies/ μ l	25 μ l

* 1 : Positive Control RNA 用上流 (センス) primer

* 2 : Positive Control RNA 用下流 (アンチセンス) primer

【各プライマーのシーケンス】

Control F-1 Primer 5'-CTGCTCGCTTCGCTACTTGGGA-3'
Control R-1 Primer 5'-CGGCACCTGTCTACGAGTTG-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。

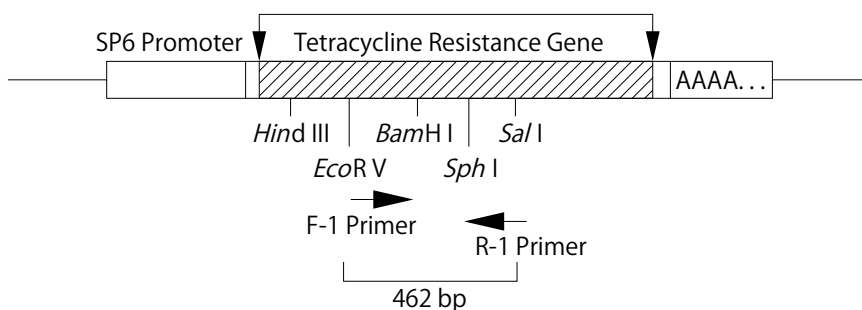


図 1. コントロール RNA : コントロール反応を行った際の増幅断片

【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® 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)
6. 上流 Primer と下流 Primer
本キットによる逆転写反応は特異的なプライマーを用いています。
Random Primer や Oligo dT Primer は使用できません。

タカラバイオでは、プライマーの合成サービスを行っております。
詳細は下記にお問い合わせください。

タカラバイオ (株) 受託窓口 TEL : 077-565-6999

II. 保存 -20℃

III. 原理

One Step RNA PCR Kit では、まず AMV RTase による RNA からの cDNA 合成を行い、引き続き同じ反応系のまま *AMV-Optimized Taq* による PCR 増幅を行います。

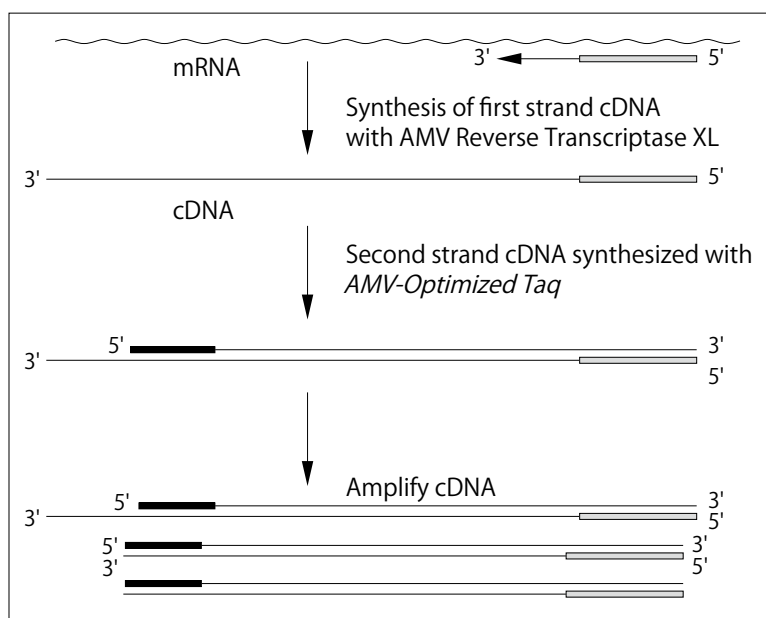


図 2. One Step RT-PCR の原理

IV. 特長

RNA テンプレート	全般
増幅サイズ	少なくとも 5.6 kb まで増幅可能
逆転写酵素	AMV Reverse Transcriptase XL (42 ~ 60°C で逆転写可能)
逆転写反应用プライマー	特異的下流プライマー (PCR 時のアンチセンスプライマー) (Oligo dT プライマーや Random プライマーは使用できない)
DNA Polymerase	AMV-Optimized Taq
RNase Inhibitor	必要 (キットに含まれる)
操作	一本のチューブ内で連続的に RT-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°C、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°C、12 時間処理する。
残っている DEPC を除去するために、オートクレーブ (120°C、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°C、60 分) あるいは DEPC 処理したガラス器具で調製し、用いる蒸留水はあらかじめ 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、蒸留水はすべて 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 法に用いる 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単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。

組織、細胞からの抽出には NucleoSpin RNA (製品コード 740955.10/.50/.250) や RNAiso Plus (製品コード 9108/9109) を用いると、短時間で高純度の total RNA を調製することができます。

1 回の反応に用いる RNA サンプル量は、One Step RNA PCR Kit の場合、total RNA として約 1 µg の量が最適です。また、total RNA からの mRNA の調製には、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) 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. 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. Reverse Transcriptase、RNase Inhibitor、*AMV-Optimized 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を避けてください。
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。
6. 本キットによる逆転写反応は、特異的なプライマーを用います。Random Primer や Oligo dT Primer は使用できません。

VII. 操作：一般的な RT-PCR 法 (例)

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]
10 × One Step RNA PCR Buffer	5 μ l	1 ×
25 mM MgCl ₂	10 μ l	5 mM
10 mM dNTP Mixture	5 μ l	1 mM
RNase Inhibitor (40 U/ μ l)	1 μ l	0.8 U/ μ l
AMV RTase XL (5 U/ μ l)	1 μ l	0.1 U/ μ l
AMV-Optimized Taq (5 U/ μ l)	1 μ l	0.1 U/ μ l
上流 specific primer (センス) (20 μ M) *1	1 μ l	0.4 μ M
下流 specific primer (アンチセンス) (20 μ M) *2	1 μ l	0.4 μ M
Positive Control RNA or Experimental Sample *3	1 μ l (total RNA の場合約 1 μ g)	
RNase Free dH ₂ O	24 μ l	
Total	50 μ l	

* 1：Positive Control RNA の場合；Control F-1 Primer

* 2：Positive Control RNA の場合；Control R-1 Primer

* 3：発現量の少ない RNA の場合、25 μ l までサンプル量を増やせます。

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、次のプログラムで反応を行う。

[一般的な反応条件]			[Positive Control RNAの場合]		
50°C	30 min.	RT 反応	50°C	15 min.	
94°C	2 min.	RTase の不活化	94°C	2 min.	
94°C	30 sec.	PCR 反応 25 ~ 30 cycles	94°C	30 sec.] 28 cycles
37 ~ 65°C	30 sec.		60°C	30 sec.	
72°C	1 ~ 10 min.		72°C	1.5 min.	

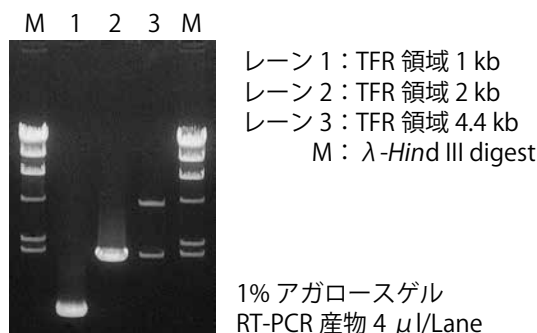
3. 反応終了後、反応液の一部 (5 ~ 10 μ l) をアガロースゲル電気泳動を行い、反応産物を確認する。PCR 増幅産物は解析するまで凍結保存する。コントロール反応の場合、462 bp が検出される。

VIII. 実験例：HL60 由来 total RNA より TFR (Transferrin Receptor) 領域 1 kb、2 kb、4.4 kb の増幅

1. 「VII. 操作」で記載している一般的な RT-PCR 法にしたがって反応液を調製した。
2. 調製後、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った。

50°C	30 min.	} 30 cycles
94°C	2 min.	
94°C	30 sec.	
60°C	30 sec.	
72°C	6 min.	

3. 反応終了後アガロースゲル電気泳動を行った。



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、ターゲットの鎖長にあわせて設定します。通常、AMV-Optimized Taq は 72°C で 1 kb 当たり 1～2 分を目安に設定してください。
- Cycle 数
cDNA 量が少ない場合は、40～50 cycles で行ってください。

PCR 産物について

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. 参考文献

- 1) Kawasaki, E. S. and Wang, A. M. *PCR Technology* (Erich, H. A. ed) *Stockton Press*. (1989) 89-97.
- 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.
- 4) Mallet, F., Oriol, G., Mary, C., Verrier, B., and Mandrand, B. *BioTechniques*. (1995) **18**: (4): 678-687.
- 5) 山本純子、向井博之 蛋白質・核酸・酵素 44 (1999) p189-193

X. 関連製品

Reverse Transcriptase XL (AMV) for RT-PCR Kit (製品コード 2630A)
Recombinant RNase Inhibitor (製品コード 2313A/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)
PrimeGel™ Agarose PCR-Sieve (製品コード 5810A)
PrimeGel™ Agarose LE 1-20K GAT (製品コード 5801A)
RNAiso Plus (製品コード 9108/9109)
NucleoSpin RNA (製品コード 740955.10/.50/.250)
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 Kit (製品コード 6028)
Mighty Cloning Reagent Set (Blunt End) (製品コード 6027)
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® Gradient (製品コード TP600)
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® *Touch* (製品コード TP350)
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)

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、PrimeScript 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