

製品コード RR055A

研究用

Takara

PrimeScript™

One Step RT-PCR Kit Ver.2

説明書

v201509Da

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 One Step RT-PCR Kit Ver. 2 は、RT-PCR を 1 本のチューブ内で連続的に行う 1 step RT-PCR 用のキットです。反応途中で試薬を添加する必要がないため、コンタミネーションの心配がありません。逆転写反応には、M-MLV 由来の RTase をベースにしてタカラバイオが独自に開発した逆転写酵素 PrimeScript RTase を採用しています。本酵素は高次構造をとりうる鋳型 RNA に対しても優れた伸長性を示します。また、PCR には増幅効率に優れた Hot Start PCR 用酵素 *TaKaRa Ex Taq*[®] HS を用いています。Ver. 2 では、PrimeScript RTase と *TaKaRa Ex Taq* HS および RNase Inhibitor を One Step RT-PCR 用に高度に至適化し安定化剤とともにプレミックス化した PrimeScript 1 step Enzyme Mix と、反応バッファーと dNTP Mixture および 1 step Enhancer Solution をプレミックス化した 2 × 1 step Buffer を使用することで反応液の調製を大幅に簡便化しています。さらにタカラバイオの RT-PCR テクノロジーを組み合わせることにより、本キットは次のような特長を示します。

- ・非常に効率よく RT-PCR 増幅産物が得られる。
- ・簡便な操作で反応を行うことができる。
- ・非特異的な増幅を最小限に抑えるため、50°C で効率よく逆転写反応が進むように反応系を工夫している。
- ・反応液調製時などサイクル前のミスプライミングやプライマーダイマーに由来する非特異的増幅を抑制する。

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ます。

I. キットの内容 (50 回用)

1. PrimeScript 1 step Enzyme Mix	100 μ l
2. 2 × 1 step Buffer	625 μ l × 2
3. Control F-1 Primer* ¹ (20 μ M)	20 μ l
4. Control R-1 Primer* ² (20 μ M)	20 μ l
5. Positive Control RNA (2 × 10 ⁵ copies/ μ l)	20 μ l
6. RNase Free dH ₂ O	625 μ l × 2

* 1 : Positive Control RNA 用上流センスプライマー

* 2 : 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
Control F-1 Primer	5'-CTGCTCGCTTCGCTACTTGGA-3'
Control R-1 Primer	5'-CGGCACCTGTCCTACGAGTTG-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。

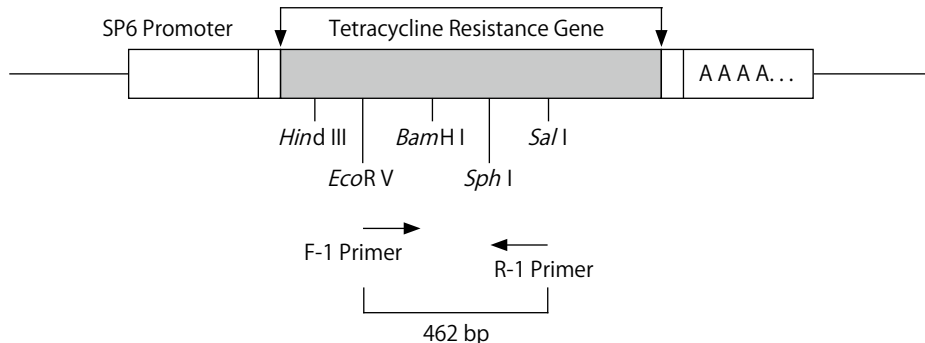


図 1. コントロール RNA : Control Primer を用いた場合の増幅断片

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/Standard (製品コード TP600/TP650)
 - 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-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°C

III. 原理

本キットでは、まず PrimeScript 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 *TaKaRa Ex Taq HS* による PCR 増幅を行います。

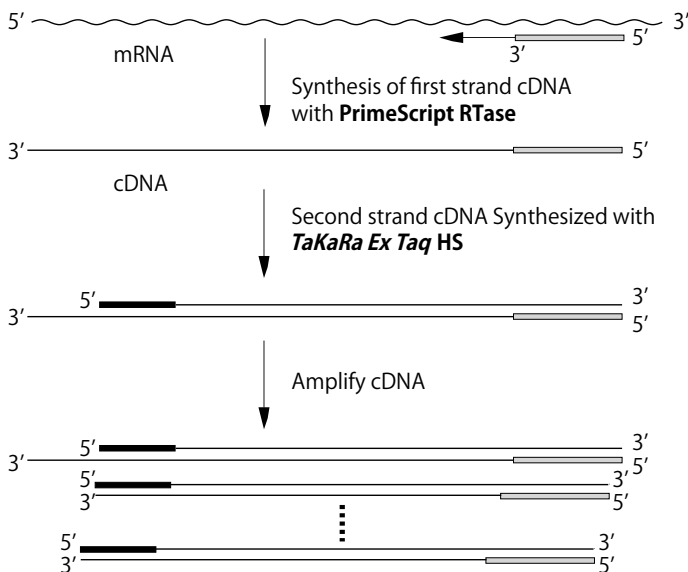


図 2. PrimeScript One Step RT-PCR Kit Ver. 2 の原理

IV. 特長

RNA テンプレート	全般
増幅サイズ	8 kb の増幅を確認
PrimeScript 1 step Enzyme Mix	逆転写酵素 (PrimeScript RTase) DNA Polymerase (TaKaRa Ex Taq HS) RNase Inhibitor を含む
2 × 1 step Buffer	反応バッファー dNTP Mixture (最終濃度 400 μM) 1 step Enhancer Solution を含む
1st strand cDNA 合成用プライマー	特異的下流プライマー (Oligo dT プライマーやランダムプライマーは使用不可)
操作	1 本のチューブ内で連続的に RT-PCR を行う

V. 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、数回～10回分ぐらいを 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 1 step Enzyme Mix は使用前に軽く遠心して、チューブの底に落としてください。また、50%グリセロール溶液形状であり粘度が高くなっていますので、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. 2 × 1 step Buffer は使用前によく vortex をした後、軽く遠心してから使用してください。
4. PrimeScript 1 step Enzyme Mix 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。
5. 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。
6. 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。
7. 本キットによる逆転写反応には、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。

VI. 操作

1. 下記に示す反応液を調製する。

試薬	使用量	最終濃度
PrimeScript 1 step Enzyme Mix	2 μ l	
2 \times 1 step Buffer	25 μ l	
上流 Primer (20 μ M) *1 (センス)	1 μ l	0.4 μ M
下流 Primer (20 μ M) *2 (アンチセンス)	1 μ l	0.4 μ M
Template RNA (or Positive Control RNA)	X μ l*3 1 μ l)	
RNase Free dH ₂ O	up to 50 μ 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 1 μ g 以下を推奨

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

(A) PCR を 3 step で行う場合

50°C	30 min.	} 25 ~ 30 cycles
94°C	2 min.	
↓		
94°C	30 sec.	
55 ~ 65°C	30 sec.	}
72°C	1 min./kb	

(B) PCR を 2 step で行う場合

50°C	30 min.	} 25 ~ 30 cycles
94°C	2 min.	
↓		
98°C	10 sec.	
68°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.	} 30 cycles
94°C	2 min.	
↓		
94°C	30 sec.	
60°C	30 sec.	}
72°C	1 min.	

VII. PCR 条件について

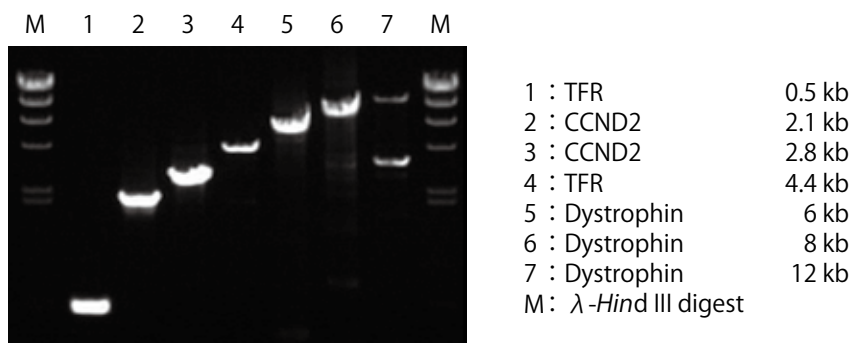
- アニーリング温度
コントロール RNA の場合、60°C に設定して PCR を行いますが、実際のサンプルでは最適条件が変わります。55 ~ 65°C で至適条件を検討してください。必要があれば、範囲を広げて (45 ~ 65°C) 検討してください。
- 伸長時間
伸長時間は、ターゲットの鎖長にあわせて変更します。TaKaRa Ex Taq HS では、72°C で 1 kb あたり 1 分を目安に設定してください。
- サイクル数
cDNA が少ない場合は、40 ~ 50 cycles で行ってください。
- 本キットを用いて増幅した PCR 産物のほとんどは、3' 末端に A が 1 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。

VIII. 実施例

- ヒト心臓由来 total RNA、または HL60 細胞由来 total RNA を鋳型として、様々な長さのターゲット遺伝子を本キットのプロトコールに従い 1 step RT-PCR で増幅しました。

Target gene	使用 total RNA
Dystrophin	ヒト心臓由来
トランスフェリンレセプター (TFR)	HL60 細胞由来
サイクリン D2 (CCND2)	HL60 細胞由来

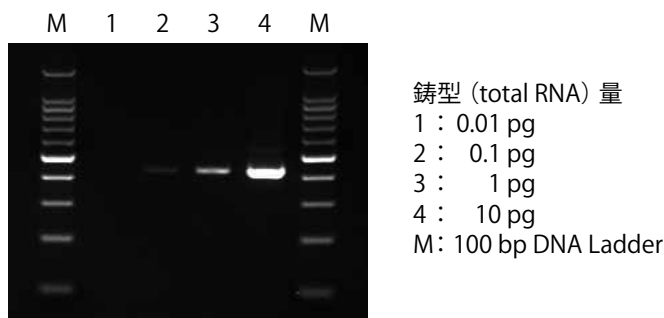
RT-PCR 条件 : 0.5 ~ 6 kb				8 ~ 12 kb			
50°C	30 min.			50°C	30 min.		
94°C	2 min.			94°C	2 min.		
		↓				↓	
94°C	30 sec.] 28 cycles		98°C	10 sec.] 28 cycles	
55°C	30 sec.			68°C	8 min.		
72°C	1 min./kb			or 12 min.			



0.5 ~ 8 kb で、良好な伸長と増幅が確認できました。

- HL60 細胞由来の total RNA を鋳型として、本キットのプロトコールに従い 1 step RT-PCR で GAPDH 遺伝子の検出感度を測定しました。

ターゲット : GAPDH	428 bp	
RT-PCR 条件 : 50°C	30 min.	
94°C	2 min.	
	↓	
94°C	30 sec.] 40 cycles
55°C	30 sec.	
72°C	1 min.	



total RNA 量 0.1 pg から検出が可能でした。

IX. 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°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。

X. 関連製品

PrimeScript™ Reverse Transcriptase (製品コード 2680A/B/C)
PrimeScript™ One Step RT-PCR Kit Ver.2 (Dye Plus) (製品コード RR057A/B)
PrimeScript™ RT-PCR Kit (製品コード RR014A/B)
PrimeScript™ High Fidelity RT-PCR Kit (製品コード R022A/B)
PrimeScript™ II High Fidelity RT-PCR Kit (製品コード R023A/B)
PrimeScript™ II High Fidelity One Step RT-PCR Kit (製品コード R026A/B)
PrimeScript™ 1st strand cDNA Synthesis Kit (製品コード 6110A/B)
PrimeScript™ II 1st strand cDNA Synthesis Kit (製品コード 6210A/B)
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® Gradient/Standard (製品コード TP600/TP650)
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 W9021)
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)

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。
- *TaKaRa Ex Taq*, *Thermal Cycler Dice* はタカラバイオ株式会社の登録商標です。*PrimeScript*、*RNase-OFF*、*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

TaKaRa テクニカルサポートライン

Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995

ホームページアドレス <http://www.takara-bio.co.jp/>

タカラバイオ株式会社