

製品コード RR065

研究用

---

**TaKaRa**

**small RNA Cloning Kit**

---

説明書

v202008Da

---

# 目次

I.	製品説明.....	3
II.	内容.....	5
III.	保存.....	5
IV.	キット以外に必要な試薬、器具類（主なもの）.....	6
V.	キットを使用する前の準備、注意点.....	7
VI.	プロトコール.....	9
VII.	トラブルシューティング.....	15
XIII.	補足資料.....	16
IX.	参考文献.....	16
X.	関連製品.....	17
XI.	注意.....	17

---

## I. 製品説明

細胞内で発現している RNA の中には、タンパク質をコードしていないものが多く存在し、それらが重要な機能を持つことが明らかになっています。これらは機能性 RNA という名称で分類されていますが、その中でも特に 18～26 塩基程度の低分子 RNA の機能が注目されています。これら低分子 RNA の機能としては、

(1) 遺伝子発現を mRNA レベルで抑制する

(2) 遺伝子発現を翻訳レベルで抑制する

ことがこれまでに示されています<sup>1,2)</sup>。

低分子 RNA の発現解析を行う手段の一つとして、クローニングによる解析があります。低分子 RNA は mRNA のような polyA tail を持たないため、分離した低分子 RNA 画分に対し、その 5'側および 3'側に RNA または RNA/DNA キメラのアダプターを結合させて逆転写し、PCR で増幅した後クローニングを行う方法が用いられています。

本キットは、上記原理をもとにした低分子 RNA のクローニング用 cDNA 増幅キットです。このキットでは、マグネットビーズの利用により、アダプター結合後のゲル抜きなどの煩雑な操作をできる限り除き、簡便な操作で低分子 RNA 由来 cDNA を増幅できるよう工夫しています。増幅した cDNA はそのまま TA クローニングに用いることが可能です。また、アダプター配列中にある制限酵素サイトを利用したクローニングも可能になっています。

total RNA を電気泳動してゲル抜きを行うなどの操作で調製した低分子 RNA (small RNA) を、本キットを用いてクローニングする場合の流れを図 1 に示します。

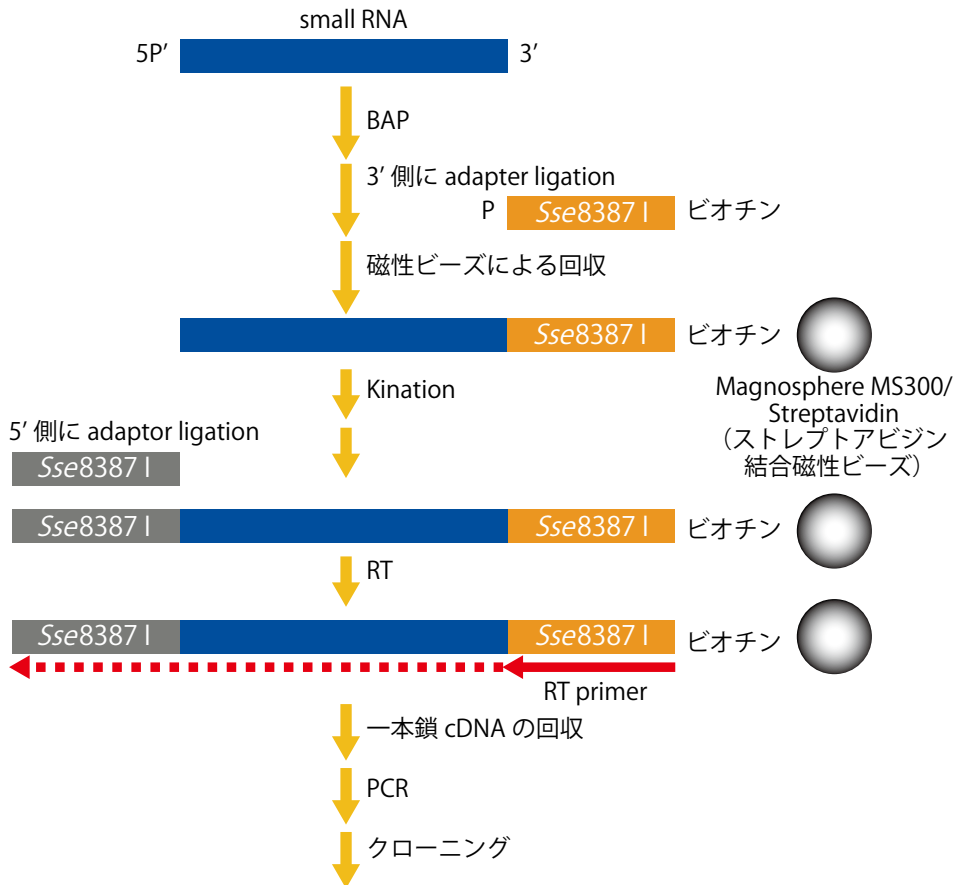


図 1. 本キットを用いた small RNA クローニングの流れ

1. 調製した small RNA を BAP 処理して、5' 側のリン酸基を外す。
2. BAP 処理した RNA の 3' 側に、ビオチン化 RNA/DNA キメラアダプターを結合させる。
3. ストレプトアビジン結合磁性ビーズを用いてビオチン化アダプター結合 small RNA を回収し、kination により 5' 側にリン酸基を付与する。
4. 5' 側に、RNA/DNA キメラアダプターを結合させた後、RT-primer を用いて逆転写酵素 M-MLV<sup>3)</sup> により逆転写反応を行う。
5. cDNA をビーズから回収し、PCR を行う。
6. PCR フラグメントまたは制限酵素処理したフラグメントを回収し、クローニングを行う。

---

## II. 内容 (10 回分)

### Package 1

1.	RNase Inhibitor (40 U/ $\mu$ l)	50 $\mu$ l
2.	10 $\times$ BAP Buffer	200 $\mu$ l
3.	Alkaline Phosphatase (BAP) (0.4 U/ $\mu$ l)	20 $\mu$ l
4.	0.1% BSA	60 $\mu$ l
5.	3' adaptor*1,2	10 $\mu$ l
6.	T4 RNA Ligation Buffer	600 $\mu$ l
7.	T4 RNA Ligase (40 U/ $\mu$ l)	20 $\mu$ l
8.	5 $\times$ T4 PNK Buffer	100 $\mu$ l
9.	T4 Polynucleotide Kinase (T4 PNK) (10 U/ $\mu$ l)	10 $\mu$ l
10.	5' adaptor*1	10 $\mu$ l
11.	5 $\times$ RT Buffer	40 $\mu$ l
12.	dNTP Mixture (2.5 mM each)	90 $\mu$ l
13.	PCR-R & RT-Primer (50 pmol/ $\mu$ l) *1,3	20 $\mu$ l
14.	RTase (RNase H free) (200 U/ $\mu$ l)	10 $\mu$ l
15.	2 $\times$ PCR Buffer	250 $\mu$ l
16.	PCR Primer F (50 pmol/ $\mu$ l) *1	10 $\mu$ l
17.	TaKaRa Ex Taq <sup>®</sup> HS (5 U/ $\mu$ l)	10 $\mu$ l
18.	Control RNA (5 pmol/ $\mu$ l) *4	10 $\mu$ l

### Package 2

19.	3 M Sodium Acetate (pH5.2)	200 $\mu$ l
20.	Dr. GenTLE Precipitation Carrier*5	80 $\mu$ l
21.	2 $\times$ B/W Buffer	2.7 ml
22.	Magnosphere MS300/Streptavidin	100 $\mu$ l
23.	RNase-free dH <sub>2</sub> O	10 ml

\* 1 : 3' adaptor、5' adaptor、PCR Primer F および PCR-R & RT-Primer には、Sse8387 I のサイトが付加されています (VII. 補足資料参照)。PCR 産物を Sse8387 I で消化することにより、Pst I で切断したベクターに組み込むことが出来ます。なお、本キットには制限酵素やクローニング用ベクターなどは含まれていませんので、別途ご用意ください。

\* 2 : 3' adaptor はビオチン化されています。

\* 3 : PCR 用の reverse primer。逆転写プライマーとしても使用します。

\* 4 : 本キットに添付されている Control RNA は 5' 末端がリン酸化された 21 mer の合成 RNA です (VII. 補足資料参照)。

\* 5 : Gen とるくん<sup>™</sup>エタ沈キャリア (製品コード 9094) と同じものです。

## III. 保存

Package 1 ; - 20°C

Package 2 ; 4°C

---

#### IV. キット以外に必要な試薬、器具類 (主なもの)

##### < 試薬 >

フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25 : 24 : 1、v/v/v)  
クロロホルム/イソアミルアルコール (24:1、v/v)  
エタノール  
TE バッファー (10 mM Tris-HCl/1 mM EDTA、pH8.0)  
0.1 N NaOH  
DNA サイズマーカー  
    20 bp DNA Ladder (製品コード 3409A/B) など  
RNA サイズマーカー  
    14-30 ssRNA Ladder Marker (製品コード 3416) など  
10% ポリアクリルアミドゲル (未変性)  
15% ポリアクリルアミドゲル (変性)  
制限酵素  
    Sse8387I (製品コード 1183A/B)  
クローニング用ベクター  
コンピテントセル  
Ligation 用試薬  
    DNA Ligation Kit <Mighty Mix> (製品コード 6023) など  
RNA 精製試薬  
    RNAiso Plus (製品コード 9108/9109) など

##### < 器具 >

微量遠心機 (マイクロ遠心機)  
恒温水槽 (次の各温度設定で使用; ヒートブロックも可)  
    15°C、25°C、37°C、42°C、70°C  
マイクロピペット  
マイクロ遠心チューブ  
サーマルサイクラー  
PCR 用 0.2 ml チューブ  
フィルター付きピペットチップ  
アガロースゲル電気泳動装置一式  
ポリアクリルアミドゲル電気泳動装置一式  
マグネットスタンド  
    Magnetic Stand (6 tubes) (製品コード 5328) など

---

## V. キットを使用する前の準備、注意点

### 1. 器具類の滅菌法

市販の滅菌済ディスポーザブルプラスチック器具類は通常 RNase フリーと考えてよく、そのまま実験に用いても差し支えありませんが、マイクロ遠心チューブやマイクロピペット用チップなどはオートクレーブ処理を行った後で使用ください。ガラス器具、スパーテルなどを使用する場合は、160℃で少なくとも2時間以上乾熱滅菌を行ってください。乾熱滅菌できないものは、0.1% ジエチルピロカーボネート (DEPC) 溶液で 37℃、12 時間処理した後、オートクレーブ処理 (DEPC による RNA のカルボキシメチル化を防ぐため) を行ってからご使用ください。RNA 実験用の器具類は他と明確に区別しておく必要があります。また、RNase が混入する最も大きな要因は、素手からの持ち込みですので、RNA を用いた実験を行う際には必ずプラスチック手袋とマスクを着用してください。

### 2. 試薬類の調製法

試薬類は可能な限り 0.1% DEPC で処理し、オートクレーブにかけてから使用します。オートクレーブできない試薬が含まれている場合には、あらかじめ滅菌操作を行った器具類、精製水などを用いて溶液を調製した後、ろ過滅菌の操作を行ってからご使用ください。用いる溶液、精製水はすべて RNA 実験専用としてお使いください。

### 3. RNA サンプルの調製について

small RNA のクローニングを行うためには、できる限り分解を抑えた total RNA の調製を行う必要があります。細胞や組織など対象サンプルからの RNA 調製は、できる限り早く行ってください。不可能な時は、使用するまで -80℃の冷凍庫もしくは液体窒素中で保存してください。

#### (1) total RNA の調製

塩化セシウム密度勾配遠心法やチオシアン酸グアニジンフェノールクロロホルム法 (AGPC 法)、あるいは市販の RNA 分離精製の試薬、キットを用います。市販の試薬やキットを利用する場合、低分子の RNA が回収できることをご確認の上、ご利用ください。

NucleoSpin miRNA (製品コード 740971.10/.50/.250)、NucleoSpin miRNA Plasma (製品コード 740981.10/.50/.250)、RNAiso Plus (製品コード 9108/9109) などが使用できます。

#### (2) small RNA 画分の精製

small RNA 画分の分離・精製には変性ポリアクリルアミドゲル (15% アクリルアミド：ビスアクリルアミド (19:1) / 7 M Urea / 0.5 × TBE ゲルなど) がよく用いられます。

目的の大きさの RNA 画分が分かるように 14-30 ssRNA Ladder Marker (製品コード 3416) の利用をお勧めします。

ゲルからの低分子 RNA の抽出には、破碎浸漬法 (crush and soak) などがよく用いられます。エタノール沈殿などにより濃縮した場合は、RNase-free dH<sub>2</sub>O 10 μl 程度に溶解してください。(共沈剤として、Gen とるくんエタ沈キャリア (製品コード 9094) の使用をお勧めします。)

#### (3) RNA の純度検定

本キットでは、一回の反応に small RNA として約 1 ~ 100 ng (0.1 ~ 10 pmole 程度) を使用します。精製した small RNA の量を正確に検定することは難しいですが、例えばアジレント 2100 バイオアナライザ (アジレント・テクノロジー) および RNA6000 Pico LabChip キット (アジレント・テクノロジー) を用いることにより、ある程度正確に精製した small RNA の大きさの分布や量を測定できます (図 2 参照)。または、分光光度計などで OD<sub>260</sub> 測定により定量する方法もあります。

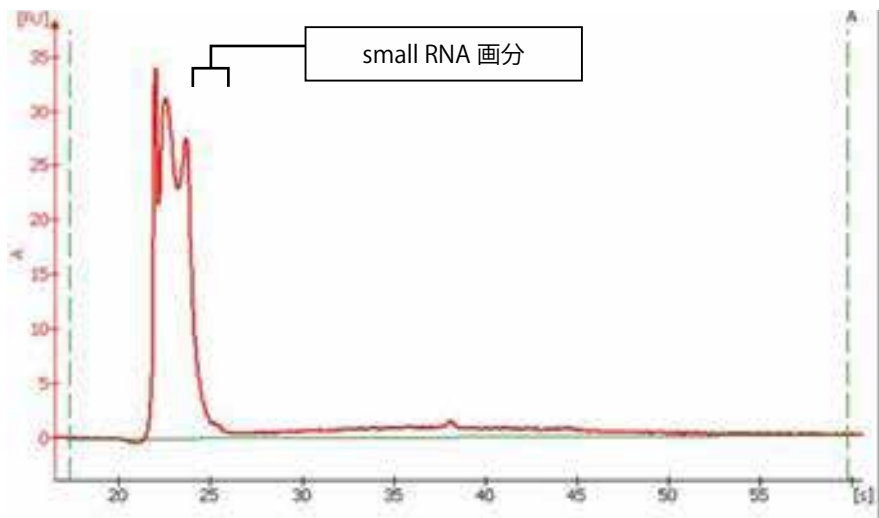


図 2. small RNA の Agilent Bioanalyzer による解析例



## VI. プロトコール

### VI-1. small RNA の BAP 処理

- 1) small RNA 1 ~ 100 ng (RNase-free dH<sub>2</sub>O に溶解したもの) に [23] RNase-free dH<sub>2</sub>O を加えて全量を 42  $\mu$ l にする。
- 2) マイクロ遠心チューブ内で以下の反応液を調製する。

試薬	使用量
small RNA	42 $\mu$ l
[1] RNase Inhibitor	1 $\mu$ l
[2] 10 × BAP Buffer	5 $\mu$ l
[3] Alkaline Phosphatase (BAP)	2 $\mu$ l
Total	50 $\mu$ l

- 3) ピペッティングまたはタッピングで穏やかに混合した後、37°C で 1 時間反応する。
- 4) [23] RNase-free dH<sub>2</sub>O を 50  $\mu$ l 加えて total volume を 100  $\mu$ l にした後、フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコールを等量加え、ボルテックスミキサーで 5 ~ 10 秒間よく混合する。
- 5) 4°C で 15,000 rpm、5 分間遠心し、分離した 2 層のうち上層 (水層) を新しいチューブに移す。(中間層を取らないように注意する。)
- 6) 再度、フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコールを等量加え混合した後、遠心により上層を回収する。
- 7) クロロホルム/イソアミルアルコールを等量加え、ボルテックスミキサーで 5 ~ 10 秒間混合する。
- 8) 4°C で 15,000 rpm、5 分間遠心し、分離した 2 層のうち上層 (水層) を新しいチューブに移す。
- 9) 上清に 1/10 量の [19] 3 M Sodium Acetate、4  $\mu$ l の [20] Dr. GenTLE Precipitation Carrier、2.5 倍量のエタノールを添加し、よく混合する。
- 10) -80°C で 1 時間冷却した後、4°C で 15,000 rpm、1 時間遠心し、沈殿に注意して上清を除く。
- 11) 80% エタノールでリンスする。
- 12) 風乾後、沈殿を 14  $\mu$ l の [23] RNase-free dH<sub>2</sub>O に溶解する。(乾燥させすぎないように注意する。)

### VI-2. 3' adaptor のライゲーション

- 1) マイクロ遠心チューブ内で以下の反応液を調製する。

試薬	使用量
[4] 0.1% BSA	3 $\mu$ l
[1] RNase Inhibitor	1 $\mu$ l
[5] 3' adaptor	1 $\mu$ l
BAP 処理済 small RNA	14 $\mu$ l
Total	19 $\mu$ l

- 2) [6] T4 RNA Ligation Buffer を 30  $\mu$ l 加え、ピペッティングにより均一になるまで混合する (この Buffer は粘度がありますので、注意してください)。
- 3) [7] T4 RNA Ligase を 1  $\mu$ l 加え、ピペッティングにより良く混合する。
- 4) 15°C で 1 時間反応させる。

---

### VI-3. マグネットビーズへの吸着

- 1) [21] 2 × B/W Buffer を 210  $\mu$ l マイクロ遠心チューブに移し、[23] RNase-free dH<sub>2</sub>O を 210  $\mu$ l 加えて 1 × B/W Buffer を調製する。
- 2) [22] Magnosphere MS300/Streptavidin(マグネットビーズ)溶液をよく混合し、新しいマイクロ遠心チューブに 10  $\mu$ l を分注する。
- 3) マグネットスタンドにチューブを立て、30 秒間静置後、上清を除く。
- 4) [21] 2 × B/W Buffer を 10  $\mu$ l 加え、軽くボルテックス後、スピンドウンし、マグネットスタンドに 30 秒間静置する。(注意：B/W Buffer には Triton X-100 が含まれているためボルテックスをかけると泡立ちますが、反応には影響しないことを確認しています。)
- 5) 上清を除き、[21] 2 × B/W Buffer を 50  $\mu$ l 加える。
- 6) VI-2-4) の ligation 反応が終了した後、VI-3-5) で調製したマグネットビーズ 50  $\mu$ l を反応液に加え、ピペティングにより混合する。
- 7) 25°C で 1 時間静置する。
- 8) 反応終了後、チューブをマグネットスタンドに 30 秒間静置する。
- 9) 上清を除いた後、1 × B/W Buffer を 100  $\mu$ l 加え、ビーズがほぐれるように短時間のボルテックスで混合する。
- 10) チューブをマグネットスタンドに 30 秒間静置する。
- 11) 上清を除いた後、[23] RNase-free dH<sub>2</sub>O を 100  $\mu$ l 加え軽く混ぜる。(次の反応液の準備ができるまで液を除かない。)

### VI-4. 5' 末端のリン酸化

- 1) マイクロ遠心チューブ内で以下の反応液を氷上で調製する。

試薬	使用量
[23] RNase-free dH <sub>2</sub> O	38 $\mu$ l
[1] RNase Inhibitor	1 $\mu$ l
[8] 5 × T4 PNK Buffer	10 $\mu$ l
[9] T4 Polynucleotide Kinase	1 $\mu$ l
Total	50 $\mu$ l

- 2) VI-3-11) で調製したビーズから、チューブをマグネットスタンドに 30 秒間静置して上清を除き、VI-4-1) で調製した反応液を 50  $\mu$ l 加えピペティングもしくはタッピングにより穏やかに混合する。
- 3) 37°C で 30 分反応させる。
- 4) マグネットスタンドに 30 秒間静置する。
- 5) 上清を除き、1 × B/W Buffer を 100  $\mu$ l 加え、ビーズがほぐれるように短時間のボルテックスで混合する。
- 6) チューブをマグネットスタンドに 30 秒間静置する。
- 7) 上清を除いた後、[23] RNase-free dH<sub>2</sub>O を 100  $\mu$ l 加え軽く混ぜる。(次の反応液の準備ができるまで液を除かない。)

## VI-5. 5' adaptor のライゲーション

- 1) マイクロ遠心チューブ内で以下の反応液を氷上で調製し、よく混合する。

試薬	使用量
[ 23 ] RNase-free dH <sub>2</sub> O	14 $\mu$ l
[ 6 ] T4 RNA Ligation Buffer*	30 $\mu$ l
[ 4 ] 0.1% BSA	3 $\mu$ l
[ 10 ] 5' adaptor	1 $\mu$ l
[ 1 ] RNase Inhibitor	1 $\mu$ l
[ 7 ] T4 RNA Ligase	1 $\mu$ l
Total	50 $\mu$ l

\*：粘度がありますので、注意してご使用ください。

- 2) VI-4-7) で調製したビーズから、チューブをマグネットスタンドに 30 秒間静置して上清を除き、V-5-1) の反応液を加え、ピペティングにより均一になるまで穏やかに混合する。
- 3) 15°C で 1 時間反応させる。
- 4) [ 23 ] RNase-free dH<sub>2</sub>O を 50  $\mu$ l 加えよく混合した後、マグネットスタンドに 30 秒間静置する。
- 5) 上清を除き、1 × B/W Buffer を 100  $\mu$ l 加え、ビーズがほぐれるように短時間のボルテックスで混合する。
- 6) チューブをマグネットスタンドに 30 秒間静置する。
- 7) 上清を除いた後、[ 23 ] RNase-free dH<sub>2</sub>O を 100  $\mu$ l 加え軽く混ぜる。(次の反応液の準備ができるまで液を除かない。)

## VI-6. 逆転写反応

- 1) マイクロ遠心チューブで以下の反応液を氷上で作製する。

試薬	使用量
[ 11 ] 5 × RT Buffer	4 $\mu$ l
[ 12 ] dNTP Mixture	4 $\mu$ l
[ 1 ] RNase Inhibitor	1 $\mu$ l
[ 13 ] PCR-R & RT-Primer	1 $\mu$ l
[ 14 ] RTase (RNase H free)	1 $\mu$ l
Total	11 $\mu$ l

- 2) VI-5-7) で調製したビーズから、チューブをマグネットスタンドに 30 秒間静置して上清を除き、[ 23 ] RNase-free dH<sub>2</sub>O を 9  $\mu$ l 加え、70°C で 5 分処理した後、氷上に 1 ~ 2 分静置する。
- 3) VI-6-1) で調製した反応液を 11  $\mu$ l 加え total 20  $\mu$ l にして混合した後、42°C で 1 時間反応させる。
- 4) マグネットスタンドに 30 秒間静置する。
- 5) 上清を除き、1 × B/W Buffer を 100  $\mu$ l 加え、ビーズがほぐれるように短時間のボルテックスで混合する。
- 6) チューブをマグネットスタンドに 30 秒間静置する。
- 7) 上清を除いた後、[ 23 ] RNase-free H<sub>2</sub>O を 100  $\mu$ l 加え軽く混ぜる。(次の反応液の準備ができるまで液を除かない。)

## VI-7. PCR

- 1) マイクロ遠心チューブ内で以下の反応液を氷上で調製する。

試薬	使用量
[ 23 ] RNase-free dH <sub>2</sub> O	12 $\mu$ l
[ 15 ] 2 × PCR Buffer	25 $\mu$ l
[ 12 ] dNTP Mixture	5 $\mu$ l
[ 16 ] PCR Primer F	1 $\mu$ l
[ 13 ] PCR-R & RT Primer	1 $\mu$ l
[ 17 ] <i>TaKaRa Ex Taq</i> HS	1 $\mu$ l
Total	45 $\mu$ l

- 2) VI-6-7) で調製したビーズから、チューブをマグネットスタンドに 30 秒間静置して上清を除き、0.1 N NaOH を 5  $\mu$ l 加え、タッピングで混合する(注意:ビーズがチップに付着してしまうのでピペティングは行わないでください。)
- 3) 25°C で 5 分間静置後、マグネットスタンドに 30 秒静置する。
- 4) 上清を回収し、0.2 ml の PCR チューブに移す。
- 5) VI-7-1) で調製した反応液を 45  $\mu$ l 加え、よく混合する。
- 6) サーマルサイクラーに設置し、以下の条件で PCR を行う。

94°C 2分  
94°C 30秒  
60°C 30秒  
72°C 30秒  
72°C 3分  
4°C

15回

- 7) 5  $\mu$ l を 10% ポリアクリルアミドゲル(未変性)にてチェックする(図3;参考例)。

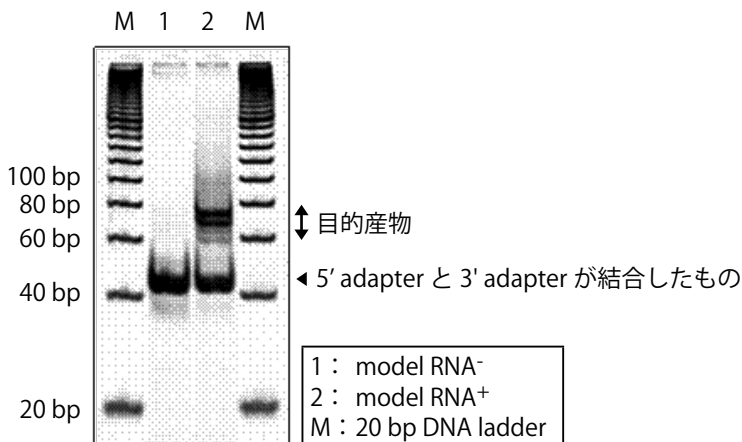


図3. 10 種類のモデル RNA (16 nt ~ 30 nt) を用いて反応を行った結果 (FMBIO II Multi-View で検出)

PCR 反応液の 1/10 量を 10% ポリアクリルアミドゲル(未変性)で泳動し、SYBR® Green I で染色後、FMBIO II Multi-View を用いて検出した。レーン 1 はモデル RNA を加えずに反応を行ったもの。

- 
- 8) 残りの PCR 溶液に TE を加え 100  $\mu$ l にした後、フェノール／クロロホルム／イソアミルアルコールを等量加え、ボルテックスミキサーで 5 ～ 10 秒間よく混合する。
  - 9) 4°C で 15,000 rpm、5 分間遠心し、分離した 2 層のうち上層（水層）を新しいチューブに移す。（中間層を取らないように注意する。）
  - 10) クロロホルム／イソアミルアルコールを等量加え、ボルテックスミキサーで 5 ～ 10 秒間混合する。
  - 11) 4°C で 15,000 rpm、5 分間遠心し、分離した 2 層のうち上層（水層）を新しいチューブに移す。
  - 12) 上清に 1/10 量の [19] 3 M Sodium Acetate、4  $\mu$ l の [20] Dr. GenTLE Precipitation Carrier、2.5 倍量のエタノールを添加し、よく混合する。
  - 13) - 80°C で 30 分冷却した後、4°C で 15,000 rpm、15 分間遠心し、沈殿に注意して上清を除く。
  - 14) 80% エタノールでリンスする。
  - 15) 風乾後、沈殿を 5  $\mu$ l の TE に溶解する。（乾燥させすぎないように注意する。）

## 【 Option 】

### Option-1 ; TA クローニング用フラグメントの精製

- 1) VI-7. で調製した PCR フラグメント溶液に 6  $\times$  Loading Buffer (36% glycerol、30 mM EDTA、0.05% BPB、0.035% XC) を 1  $\mu$ l 加え、10% ポリアクリルアミドゲル(未変性)で泳動する。（マーカーとして 20 bp DNA ladder(製品コード 3409) の使用をお勧めします。）
- 2) BPB が 4/5 程度まで移動したら、泳動を止め、ゲルを新しく調製した染色液 (EtBr、SYBR Green I 等) で染色する。
- 3) きれいなカミソリ刃などで、目的の大きさのフラグメント部分を切り取る。（反応に用いた RNA 鎖長に PCR Primer F と PCR-R & RT-Primer の長さを加えたものが目的の PCR 産物に相当します。例えば 21 mer の Control RNA を使用した場合、目的の PCR 産物は 65 bp になります。）
- 4) 切り出したフラグメントを、破碎浸漬法 (crush and soak) などを用いて精製する。

---

### Option-2 ; PCR フラグメントの *Sse8387* I 消化および精製

- 1) マイクロ遠心チューブ内で以下の反応液を調製する。

試薬	使用量
滅菌精製水	34 $\mu$ l
10 × M Buffer	5 $\mu$ l
0.1% BSA	5 $\mu$ l
V-7. で調製した PCR フラグメント <i>Sse8387</i> I (10 U/ $\mu$ l)	5 $\mu$ l 1 $\mu$ l
Total	50 $\mu$ l

- 2) 37°Cで一晩反応させる。
- 3) 3 M NaOAc (pH5.2) を 5  $\mu$ l、100% エタノールを 125  $\mu$ l 加え、- 80°Cで 30 分冷却した後、15,000 rpm、4°Cで 15 分遠心する。
- 4) 沈殿に注意して上清を除き、80% エタノールでリンスする。
- 5) 風乾後、5  $\mu$ l の TE に溶解する。
- 6) 6 × Loading Buffer を 1  $\mu$ l 加え、15% ポリアクリルアミドゲル (未変性) で泳動する。(マーカーとして 20 bp DNA ladder (製品コード 3409) の使用をお勧めします。)
- 7) BPB が 4/5 程度まで移動したら、泳動を止め、ゲルを新しく調製した染色液 (EtBr、SYBR Green I 等) で染色する。
- 8) きれいなカミソリ刃などで、目的の大きさのフラグメント部分を切り取る。(反応に用いた RNA 鎖長に PCR Primer F と PCR-R & RT-Primer の長さを加えたものが目的の PCR 産物に相当します。*Sse8387* I で消化した場合、この長さから 22 bp 短くなったものが目的のフラグメントになります。例えば 21 mer の Control RNA を使用した場合、目的の PCR 産物は 65 bp で、*Sse8387* I で消化した場合 43 bp になります。)
- 9) Option-1 の 4) と同様にフラグメントを精製する。

### Option-3 ; ベクターライゲーションおよびトランスフォーメーション

- 1) 精製した TA クローニング用フラグメントは T-Vector (T-Vector pMD20 ; 製品コード 3270、T-Vector pMD19 (Simple); 製品コード 3271 など) 50 ng と、*Sse8387* I 消化フラグメントは *Pst* I で消化・調製したベクター (pUC118 *Pst* I / BAP ; 製品コード 3323 など) 50 ng と適当量混合し、それと等量の Ligation Mix (DNA Ligation Kit <Mighty Mix> に含まれる) を加え 16°Cで 30 分反応させる。
- 2) ライゲーション液の一部を用いて、ケミカルコンピテントセル (*E. coli* JM109 Competent Cells; 製品コード 9052 など) にトランスフォーメーションを行う。(エレクトロポレーションによりトランスフォーメーションを行う場合は、ライゲーション液をエタノール沈殿後、滅菌精製水に溶解したものをを用いることをお勧めします。)
- 3) 適当量を、使用したベクターに適した抗生物質入りの寒天培地にプレーティングし、37°Cでインキュベートする。

## VII. トラブルシューティング

製品の品質管理には万全を期しておりますが、万一実験が正しく行えない場合には、以下の点についてもご検討ください。

### 1. Control RNA の利用

このキットには、Control RNA として 5' 末端がリン酸化された 21 mer の合成 RNA オリゴが含まれておりますので、これを用いて反応を行い、PCR 産物が正しく得られることをご確認ください (図 4; Lane 1、2)。Lane 3、4 のように 2 本のバンドが出現したときは、反応に用いた RNA の BAP 処理が不十分な可能性が高いため、再度 BAP 処理を行ってみてください。Control RNA で問題なく目的産物が得られるようでしたら、反応に用いる small RNA の量を増やして試すことをお勧めします。

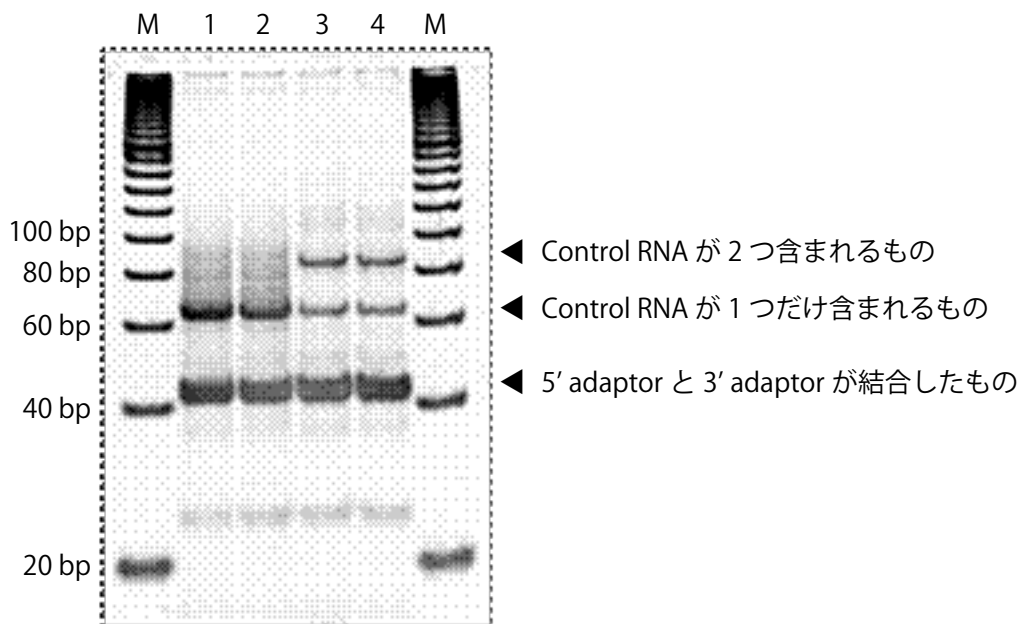


図 4. Control RNA を用いた場合の PCR 産物の泳動パターン  
(FMBIO II Multi-view で検出)

Lane 1、2: Control RNA を用いて BAP 処理から作業を行った場合

Lane 3、4: BAP 処理をせずに 3' adaptor ライゲーションから作業を行った場合。  
RNA の 5' 末端のリン酸基が残っていると、RNA 同士が結合した PCR 産物が出現する。

M: 20 bp DNA Ladder

### 2. RNase の混入

RNA への RNase の混入を避けるよう細心の注意を払うことが大切です。用いる器具、試薬類はできるだけ乾熱滅菌、オートクレーブを行い、必ずプラスチック手袋を装着して実験を行うようにしてください。

---

### 3. T4 RNA Ligation Buffer の混合について

本キットでは、反応効率を上げるため Ligation 反応系に PEG を使用しています。このバッファーをピペットマン等で吸い上げるときは、液が十分に上がるまでしばらくチップの先端を液につけておく必要があります。(チップを液から上げたときに、チップの先端に空気が入ってこないことをご確認ください。) また、バッファーを反応液に加えるときには、泡立てないように十分に注意してください。この液を十分に混合するためには 10 回程度のピペッティングが必要です。

注意：T4 RNA Ligase は、末端塩基の種類により Ligation 反応に差が見られます。また、Ligation 反応時に末端配列が 1 塩基以上削られる場合があります。

### 4. PCR 後のゲル抜きについて

1 ウェルにアプライする DNA の量が多い場合や泳動を短時間で行った時などに、図 3 に見られるようにウェルの両端を流れる DNA が上に尾を引く場合があります。このような時は、ウェルにアプライする量を減らすか、大き目のウェルを使用してください。また、泳動をゆっくりと行うことにより改善される場合があります。なお、ゲル抜きを行うときには、下のバンド (アダプター同士が結合したもの) を含まないように気をつけてください。(バンドの両端が尾を引いている場合は、両端を含まないようにゲル抜きすることをお勧めします。)

### 5. その他

多サンプルを同時に作業する場合は、マグネットビーズを用いての溶液の除去および添加作業に気をつけてください。溶液を除去した後、次の溶液を加えるまでに時間がかかりすぎるとマグネットビーズが乾燥してしまい、反応が上手くいかない場合があります。このような場合、溶液を除去した後すぐに次の溶液を加えることをお勧めします。

## VIII. 補足資料

### プライマーの塩基配列

- PCR-R & RT-Primer

5' -GTCTCTAG**CCTGCAGG**ATCGATG-3'

本プライマーは逆転写用プライマーおよび PCR の reverse primer として使用します。本プライマーには Sse8387 I の認識配列が含まれていません (太字部分)。

- PCR-Primer F

5' -AAAGAT**CCTGCAGG**TGCGTCA-3'

本プライマーには Sse8387 I の認識配列が含まれています (太字部分)。

- Control RNA

5' p-AGAUGACGGCAACUACAAGAC-3'

## IX. 参考文献

- 1) Bartel D P. *Cell*. (2004) **116**: 281.
- 2) Aravin A, et al. *FEBS Lett*. (2005) **579**: 5830.
- 3) Roth M J, et al. *J Biol Chem*. (1985) **260**: 9326.
- 4) BIO VIEW No.51 P18-20.  
[https://catalog.takara-bio.co.jp/PDF5/51\\_18-20.pdf](https://catalog.takara-bio.co.jp/PDF5/51_18-20.pdf)



## X. 関連製品

RNAiso Plus (製品コード 9108/9109)  
NucleoSpin miRNA (製品コード 740971.10/.50/.250)  
NucleoSpin miRNA Plasma (製品コード 740981.10/.50/.250)  
14-30 ssRNA Ladder Marker (製品コード 3416)  
Gen とるくん™エタ沈キャリア (製品コード 9094)  
Alkaline Phosphatase (*E. coli* C75) (製品コード 2120A/B)  
T4 RNA Ligase (製品コード 2050A/B)  
Magnetic Stand (6 tubes) (製品コード 5328)  
T4 Polynucleotide Kinase (製品コード 2021/A/B/S)  
ATP (製品コード 4041)  
PrimeScript™ Reverse Transcriptase (製品コード 2680A/B)  
*TaKaRa Ex Taq*® Hot Start Version (製品コード RR006A/B)  
dNTP Mixture (各 2.5 mM) (製品コード 4030)  
20 bp DNA Ladder (製品コード 3409A/B)  
DNA Ligation Kit < Mighty Mix > (製品コード 6023)  
*Sse8387* I (製品コード 1183A/B)  
T-Vector pMD20 (製品コード 3270)  
T-Vector pMD19 (Simple) (製品コード 3271)  
pUC118 *Pst* I/BAP (製品コード 3323)  
*E. coli* JM109 Competent Cells (製品コード 9052) など

## 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* はタカラバイオ株式会社の、SYBR は Life Technologies Corporation の登録商標です。Gen とるくん、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 <https://www.takara-bio.co.jp>

**タカラバイオ株式会社**