



<微量RNAから完全な5'末端／3'末端cDNAを合成するメリット>

- ✓ 転写開始点の同定
- ✓ プロモーター領域の解析
- ✓ 抗体可変領域の解析
- ✓ 完全長ORF (Open Reading Frame)によるタンパク質解析
- ✓ lncRNA (Long non-coding RNA) 解析



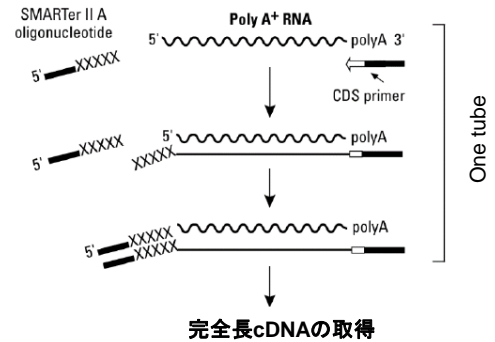
“RACE”は、未知領域の配列解析を可能にする技術

RACE (rapid amplification of cDNA ends) は、既知の部分配列を基にPCRを行うことで、cDNAライブラリーを作製することなく簡便にcDNA末端までの未知領域をクローニングする方法です。クローニング後にシーケンスを行うことで、遺伝子を解析することができます。ターゲット遺伝子数が多くない場合は、次世代シーケンス (NGS) 解析よりもRACEによる解析の方が効率的、経済的な場合があります。

“SMARTer”は、高感度に完全長cDNAの合成を行う技術

SMART法 (Switching Mechanism At 5'end of RNA Template) は、逆転写酵素の持つcDNA末端でのターミナルトランスフェラーゼ活性と、鑄型を切り替えてさらにDNA複製を続ける性質を利用して、効率よく完全長cDNA合成を行なう技術です。アダプターライゲーション法などの従来技術と比較して、高い付加効率が得られます。

LCMサンプルや生検サンプルなどの微量total RNAからも、十分量のSMARTer cDNAが得られ、さまざまな下流アプリケーションに使用することができます。



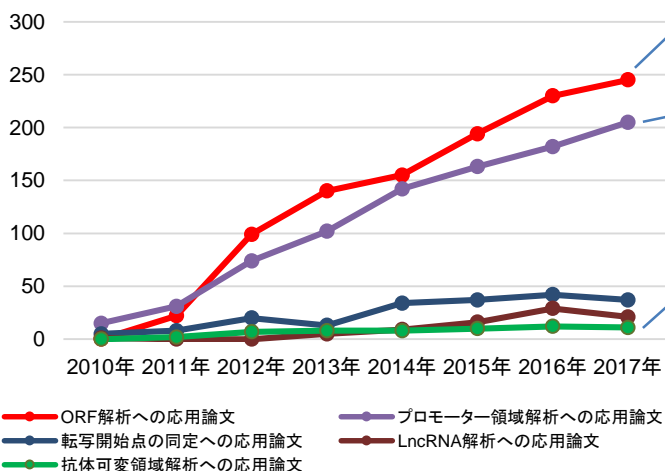
SMARTer® RACE 5'/3' Kit

※キットの詳細は中面をご覧ください。

従来のRACE法を改良し、タカラバイオ独自のSMART法を利用したSMARTer® RACE 5'/3' Kitを使った文献は、毎年増え続けています。

● SMARTer® RACE 5'/3' Kit の掲載文献数 ※

※ Google Scholarにより集計



ORF解析

◆ Lv S. *et al.*, (2018) Genetic control of seed shattering during African rice domestication. *Nat Plants*. 4(6):331-337.

プロモーター解析

◆ Ushijima T. *et al.*, (2017) Light Controls Protein Localization through Phytochrome-Mediated Alternative Promoter Selection. *Cell*. 171(6):1316-1325.

CAR-T細胞構築

◆ Arai Y. *et al.*, (2018) Myeloid Conditioning with c-kit-Targeted CAR-T Cells Enables Donor Stem Cell Engraftment. *Mol Ther*. 26(5):1181-1197.

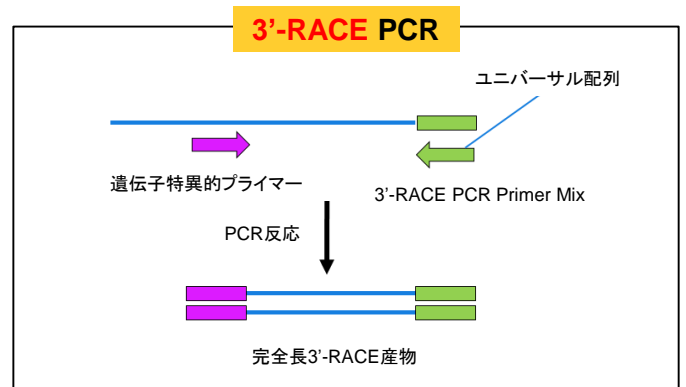
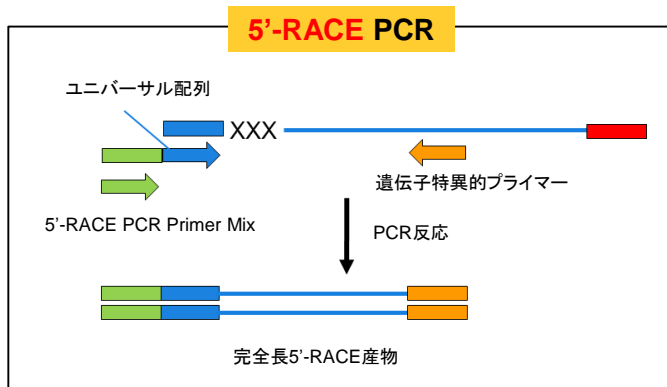
今注目のキメラ抗原受容体発現T細胞 (CAR-T細胞) の“抗体可変領域”のクローニングに、本キットが使用されています！

SMARTer® RACE 5'/3' Kit (製品コード 634858 ほか)

- ✓ SMART技術を利用して、微量RNAからでも**完全な5'末端あるいは3'末端 cDNA**を取得
- ✓ わずか**10 ng**の**total RNA**からスタート可能
- ✓ **アダプターライゲーションなし**で1st strand cDNAの**直接RACE PCR**が可能
- ✓ **長い配列やGCリッチ領域にも強い反応系**
- ✓ **必要なコンポーネントをすべて含む「ワンストップクローニングキット」**(遺伝子特異的プライマーを除く)
 - ・In-Fusion® HD Cloning Kit ・SeqAmp™ DNA Polymerase ・線状化クローニングベクター
 - ・Stellar™ Competent Cells ・NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (精製キット)

● SMARTer® RACE 5'/3' Kitのフロー

- ・ RNAの前処理は不要：ゲノムDNAが混入している場合でも、DNaseIによる前処理なしで使用可能
- ・ 1st strand cDNA合成からRACE フラグメントのクローニングまで8時間で完了。2 日目にDNAクローンの回収が可能

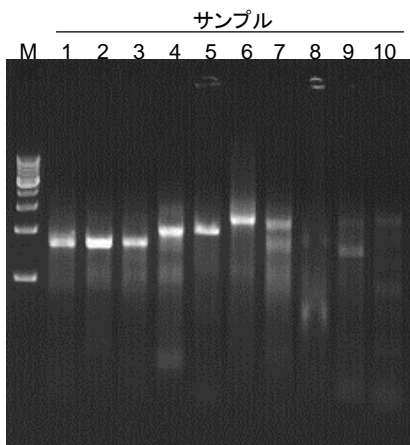


目的遺伝子の特異的プライマーをご用意いただくだけで、キット付属の5'/3'-RACE PCR Primer Mix (UPM)※とのPCR反応より、完全長RACE産物を取得することが可能です。

※SMARTer Oligoに組み込まれているユニバーサル配列をもつLong PrimerとShort Primerの混合物

● 長鎖やGCリッチなど増幅が難しい配列に対しても、高いPCR性能を実現

10種のサンプル(ターゲット遺伝子のmRNAはすべて**10 kb**以上)について、SMARTer® RACE 5'/3' Kitのユーザーマニュアルに従ってプライマーを設計し、RACE PCRを行いました。その後、本キットを使用して増幅産物をクローニングし、サンガー法で配列を決定しました。(赤字: 未登録配列の塩基数)



| サンプル | ターゲット遺伝子 | 転写産物長 (bp) | GC含量 (%) | RACE産物サイズ (bp) | PCR産物 (有/無) | 新規配列 (bp) |
|------|----------|------------|----------|------------------|-------------|-----------|
| 1 | MAP1A | 10,537 | 54.56 | 1,591 | 有 | 13 |
| 2 | MAP1B | 11,996 | 42.35 | 1,795 | 有 | 0 |
| 3 | SPTBN1 | 10,238 | 42.8 | 1,633 | 有 | 32 |
| 4 | SLC1A2 | 12,021 | 42.2 | 2,014 | 有 | 73 |
| 5 | DYNC1H1 | 14,361 | 47.06 | 1,999 | 有 | 36 |
| 6 | PKD1 | 14,135 | 63.16 | 2,329 | 有 | 21 |
| 7 | PLEC | 14,668 | 63.68 | 1,516; >2,000 | 有 | 16 |
| 8 | NRXN1 | 10,626 | 35.78 | 2,110 | 無 | N/A |
| 9 | PCLO | 22,288 | 33.82 | 2,269 | 有 | 59 |
| 10 | HOOK3 | 14,460 | 40.55 | 2,318 | 有 | 0 |

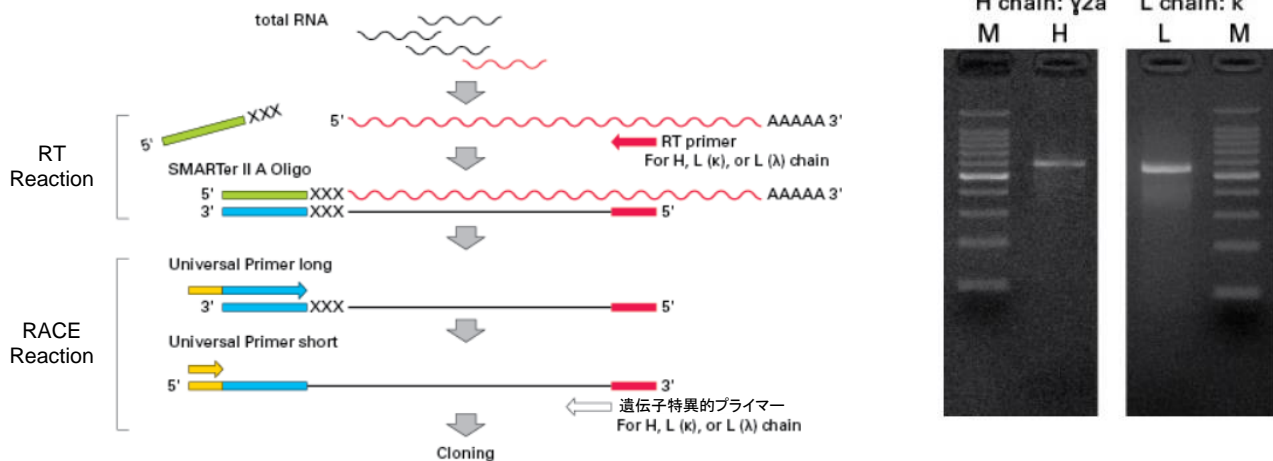
● SMARTer® RACE 5'/3' Kitによるマウスハイブリドーマ由来IgG抗体遺伝子の高速クローニング

NCBIのデータベースに登録されたマウスIgG塩基配列より、H鎖、L(κ)鎖、L(λ)鎖に対する逆転写プライマー(RT Primer)と遺伝子特異的プライマーを設計しました。Total RNAからSMARTer RACE技術により1st strand cDNAを調製した後、5'-RACE PCRにより5'末端の配列に加え抗体可変領域の完全長cDNA断片を取得しました。続いて、抗体IgG H鎖(γ2a)とL鎖(κ)を増幅し、PCR増幅産物をアガロース電気泳動で確認しました。

また、増幅産物をpUC118にクローニングしたのちシーケンス解析を行ったところ、H鎖およびL鎖のアミノ酸配列のORFが確認できました。

<抗体可変領域の5'-RACE PCR実験フロー>

<5'-RACE PCR増幅した抗体遺伝子の電気泳動>



★ SMARTer® RACE 5'/3' Kitを使用いただいた方のユーザーズボイスをご紹介します！

Q1. SMARTer RACE 5'/3' Kitを使おうと思った理由は何ですか？

- ・配列登録時に、完全長配列の方が良いかと思ったため。(T大学 T様)
- ・抗体遺伝子取得のため。(T社 M様)
- ・配列未知の花成関連遺伝子の完全長cDNAからリアルタイムによる発現解析を行うため。(T大学 H様)
- ・NGS RNA-Seqに比べてリーズナブルに解析できる。(H大学 T様)
- ・哺乳動物・ウイルスmRNAの全長配列の決定。(K大学 H様)
- ・3'末端側の配列を知りたかったため。(T大学 K様)

Q2. 使用された感想やまだ使っていない方へのお勧めコメントなどをお書きください。

- ・Protocol通りにやれば良い結果となります。(T大学 T様)
- ・N末端の配列が未知な抗体遺伝子の取得に便利です。(T社 M様)
- ・とても簡単で使いやすかった。(T大学 H様)
- ・タカラは性能よく大変満足。(H大学 T様)
- ・他社のRACEキットよりも効率がよいと思います。(K大学 H様)
- ・PCR後、バンドがきれいに得られました。(T大学 K様)

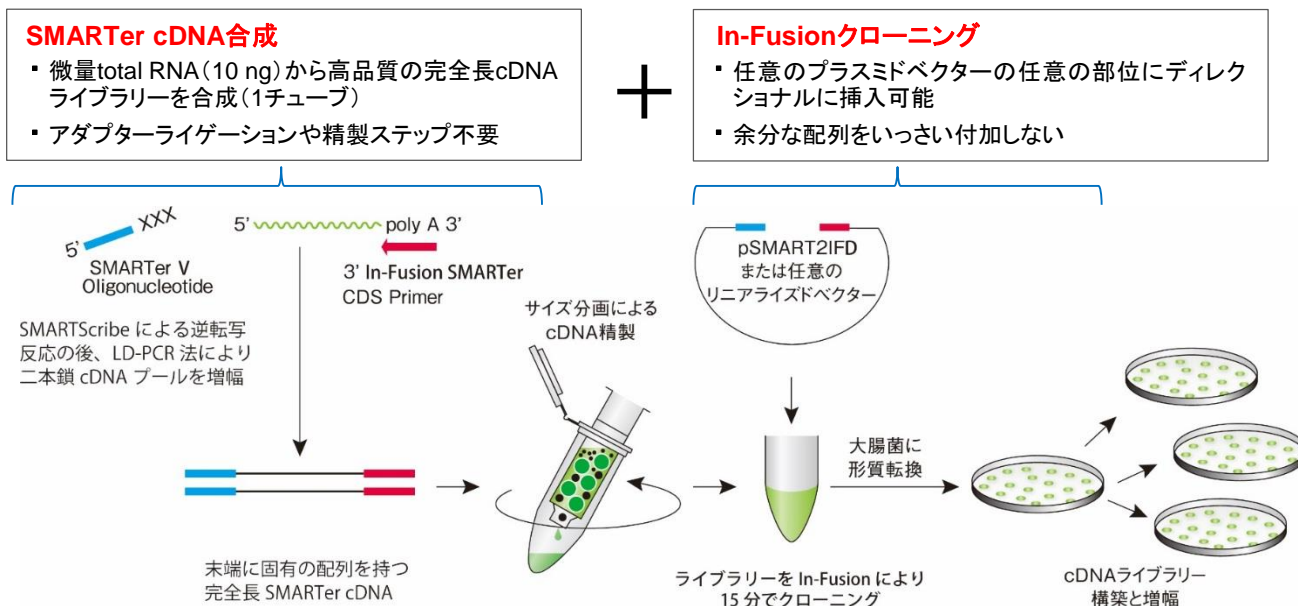
★ SMARTer® RACE 5'/3' Kitの使用文献

- ◆ Dossa RG. *et al.*, (2018) Development of T-cell immunotherapy for hematopoietic stem cell transplantation recipients at risk of leukemia relapse. *Blood*. **131**(1):108-120.
- ◆ Zemmour D. *et al.*, (2017) Flicr, a long noncoding RNA, modulates Foxp3. *Proc Natl Acad Sci USA*. **114**(17):E3472-E3480.
- ◆ Lagarde J. *et al.*, (2016) Extension of human lncRNA transcripts by RACE coupled with long-read high-throughput sequencing (RACE-Seq). *Nat Commun*. **7**:12339.
- ◆ Yang Y. *et al.*, (2014) A Zinc Finger Protein Regulates Flowering Time and Abiotic Stress Tolerance in Chrysanthemum by Modulating Gibberellin Biosynthesis. *Plant Cell*. **26**(5):2038-2054.

ライブラリー構築キット

In-Fusion® SMARTer® Directional cDNA Library Construction Kit

SMARTer cDNA合成とIn-Fusionクローニングを組み合わせたcDNAライブラリー構築キットで、任意のプラスミドベクター上の任意の部位に高品質完全長cDNAライブラリーを構築可能



★ In-Fusionクローニングの使用文献

- ◆ Arnold CD. *et al.*, (2018) A high-throughput method to identify trans-activation domains within transcription factor sequences. *EMBO J.* e98896.
- ◆ Zemmour D. *et al.*, (2016) MMEJ-assisted gene knock-in using TALENs and CRISPR-Cas9 with the PITCh systems. *Nat Protoc.* 11(1):118-33.
- ◆ Dossa RG. *et al.*, (2015) High-throughput and quantitative assessment of enhancer activity in mammals by CapStarr-seq. *Nat Commun.* 6:6905.

◆ SMART法によるcDNA合成関連製品リスト

| 製品名 | 概要 | 容量 | 製品コード | 価格 |
|--|--|-------|--------|----------|
| SMARTer® RACE 5'/3' Kit | 5'および3'-RACE用キット。PCR酵素やIn-Fusion試薬を含むオールインワンキット | 10回 | 634858 | ¥165,000 |
| | | 20回 | 634859 | ¥265,000 |
| SMARTer® PCR cDNA Synthesis Kit | 微量 (2~1,000 ng) のtotal RNAから完全長cDNA合成が可能 | 10回 | 634925 | ¥196,700 |
| | | 20回 | 634926 | ¥315,200 |
| In-Fusion® SMARTer® Directional cDNA Library Construction Kit (線状化済みプラスミドDNA添付) ※1 | SMARTer cDNA合成とIn-Fusion PCRクローニングを組み合わせたcDNAライブラリー構築キット | 10回 | 634933 | ¥250,300 |
| SMART® cDNA Library Construction Kit ※2 | 50 ngのtotal RNAあるいはpoly A ⁺ RNAから高品質cDNAライブラリーをλTriplEx2ファージライブラリーとして構築 | 1 Set | 634901 | ¥215,300 |

※1：別途PCR酵素が必要です。(ユーザーマニュアルでは、Advantage 2 PCR Kit(製品コード 639207)を用いたプロトコルをご紹介します)

※2：別途PCR酵素とλパッケージングキットが必要です。

・本パンフレットで紹介した製品はすべて研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用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。

・ライセンス情報については弊社ウェブサイトにてご確認ください。・本パンフレットに記載された社名および製品名は、特に記載がなくても各社の商標または登録商標です。

・本パンフレット記載の価格は2018年8月1日現在の希望小売価格です。価格に消費税は含まれておりません。

2018年8月作成G

タカラバイオ株式会社

東京支店 TEL 03-3271-8553 FAX 03-3271-7282

関西支店 TEL 077-565-6969 FAX 077-565-6995

テクニカルサポートライン

TEL 077-565-6999 FAX 077-565-6995

Website <http://www.takara-bio.co.jp>

Facebook <http://www.facebook.com/takarabio.jp>

取扱店