



Application

ダイズから抽出したRNAを用いた イソフラボン生合成関連酵素の遺伝子クローニング

製品名

FastGene™ Scriptase II cDNA Synthesis Kit (NE-LS63)

メーカー名

日本ジェネティクス株式会社


下記のデータは、東北大学大学院 工学研究科 バイオ工学専攻 中山研究室 大田 亮 様のご厚意により掲載させていただきました。

概要

植物は特化代謝産物（二次代謝産物）を生合成することで環境の変化に適応しています。それらの物質の生理機能を研究するためには、それを生合成する代謝酵素の調査が欠かせません。今回はダイズイソフラボンに着目し、イソフラボン生合成関連酵素の遺伝子クローニングを目的として実験を行いました。

実験条件

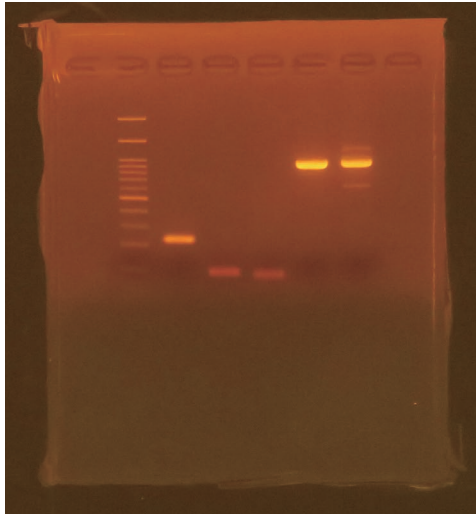
- 初発サンプル：ダイズ (Glycine max) 懸濁培養細胞 100 mg
- RNA 精製：RNAiso plus (TaKaRa)

フロー	プロトコル																																
<p>逆転写反応</p> <p>逆転写酵素： FastGene™ Scriptase II cDNA Synthesis Kit</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin: 10px 0;"> <p>■ 特徴</p> <ul style="list-style-type: none"> • より長い cDNA を得るための低活性 RNaseH • qPCR や NGS などのために最適化された組み換え酵素 </div> 	<ol style="list-style-type: none"> 1) oligo dT primer 1 μL とテンプレートの total RNA 1 μg を混合した 2) dNTP Mixture (2 mM each) を 2 μL を添加した 3) 合計 12.5 μL となるように D.W (蒸留水) を添加した 4) 65°C で 5 分間インキュベート後、直ちに氷上にて冷却した (変性) 5) 次のコンポーネントを添加した <table style="margin-left: 20px;"> <tr> <td>5x FastGene™ Scriptase II buffer</td> <td>4 μL</td> </tr> <tr> <td>0.1 M DTT</td> <td>2 μL</td> </tr> <tr> <td>RNase Inhibitor</td> <td>0.5 μL</td> </tr> </table> 6) 42°C で 2 分間インキュベートした (プライマーのアニーリング) 7) 氷上にて RNA 混合液に FastGene™ Scriptase II を 1 μL 添加した 8) 42°C で 50 分間インキュベートした (逆転写酵素活性化) 9) 70°C で 15 分間インキュベートした (逆転写酵素不活化) 	5x FastGene™ Scriptase II buffer	4 μ L	0.1 M DTT	2 μ L	RNase Inhibitor	0.5 μ L																										
5x FastGene™ Scriptase II buffer	4 μ L																																
0.1 M DTT	2 μ L																																
RNase Inhibitor	0.5 μ L																																
<p>PCR 反応</p> <p>PCR 酵素： KOD FX Neo (TOYOBO)</p> <p>PCR 装置： PCR Thermal Cycler Dice (TaKaRa)</p>	<ol style="list-style-type: none"> 10) 合成した cDNA を PCR 増幅した <ul style="list-style-type: none"> ● 反応組成 <table style="margin-left: 20px;"> <tr> <td>SDW</td> <td>10 μL</td> </tr> <tr> <td>2x PCR Buffer for KOD FX Neo</td> <td>25 μL</td> </tr> <tr> <td>2 mM dNTPs</td> <td>10 μL</td> </tr> <tr> <td>プライマー (10 μM each)</td> <td>1.5 μL</td> </tr> <tr> <td>テンプレート (合成した cDNA)</td> <td>1 μL</td> </tr> <tr> <td>KOD FX Neo (1 U/μL)</td> <td>1 μL</td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>50 μL</td> </tr> </table> ● PCR プログラム <table style="margin-left: 20px;"> <tr> <td>94°C</td> <td>2 min (初期変性)</td> <td rowspan="4" style="vertical-align: middle;">} 30 cycles</td> </tr> <tr> <td>↓</td> <td></td> </tr> <tr> <td>98°C</td> <td>10 sec (変性)</td> </tr> <tr> <td>↓</td> <td></td> </tr> <tr> <td>55°C</td> <td>30 sec (アニーリング)</td> <td></td> </tr> <tr> <td>↓</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>68°C</td> <td>1 min (伸長反応)</td> <td></td> </tr> </table> 	SDW	10 μ L	2x PCR Buffer for KOD FX Neo	25 μ L	2 mM dNTPs	10 μ L	プライマー (10 μ M each)	1.5 μ L	テンプレート (合成した cDNA)	1 μ L	KOD FX Neo (1 U/ μ L)	1 μ L	Total	50 μ L	94°C	2 min (初期変性)	} 30 cycles	↓		98°C	10 sec (変性)	↓		55°C	30 sec (アニーリング)		↓			68°C	1 min (伸長反応)	
SDW	10 μ L																																
2x PCR Buffer for KOD FX Neo	25 μ L																																
2 mM dNTPs	10 μ L																																
プライマー (10 μ M each)	1.5 μ L																																
テンプレート (合成した cDNA)	1 μ L																																
KOD FX Neo (1 U/ μ L)	1 μ L																																
Total	50 μ L																																
94°C	2 min (初期変性)	} 30 cycles																															
↓																																	
98°C	10 sec (変性)																																
↓																																	
55°C	30 sec (アニーリング)																																
↓																																	
68°C	1 min (伸長反応)																																
<p>クローニング</p> <p>電気泳動</p> <p>ゲル撮影装置： TF-20L (Vilber Lourmat)</p> <p>核酸染色試薬： エチジウムブロマイド</p> <p>シーケンス</p>	<ol style="list-style-type: none"> 11) 増幅した PCR 産物をフェノール・クロロホルム抽出およびエタノール沈殿にて精製を実施した 12) PCR 増幅した DNA 断片をベクターにクローニングした 13) 電気泳動にてバンドの確認をした <ul style="list-style-type: none"> ● 電気泳動条件 <table style="margin-left: 20px;"> <tr> <td>100 V, 20 min</td> </tr> <tr> <td>2% アガロースゲル</td> </tr> <tr> <td>1×TAE Buffer</td> </tr> </table> 14) シーケンスで配列確認をした 	100 V, 20 min	2% アガロースゲル	1×TAE Buffer																													
100 V, 20 min																																	
2% アガロースゲル																																	
1×TAE Buffer																																	



結果

M ① ② ③ ④ ⑤



← 1000 bp

← 250 bp

← 100 bp

100 (2種), 250, 1000 (2種) bp の計 5 種類の配列

M はマーカー

100 bp (②, ③) と 250 bp (①) の配列は遺伝子の UTR 領域

1000 bp (④, ⑤) の配列はコーディング配列



お客様のコメント

PCR増幅したDNA断片をベクターにクローニングし配列を確認したところ、変異の導入は1塩基もありませんでした。

また、貴製品のマニュアルも非常にわかりやすく、操作にストレスを感じませんでした。ぜひ次も使用したいと思える製品だったと感じております。