



Application

# 無菌性腹膜炎モデルマウスの腹腔細胞から抽出したRNAを用いた逆転写酵素反応の比較検討

製品名

FastGene™ Scriptase II (NE-LS53, NE-LS63)

メーカー名

日本ジェネティクス株式会社

下記のデータは東京大学のお客様のご厚意により掲載させていただきました。

## はじめに

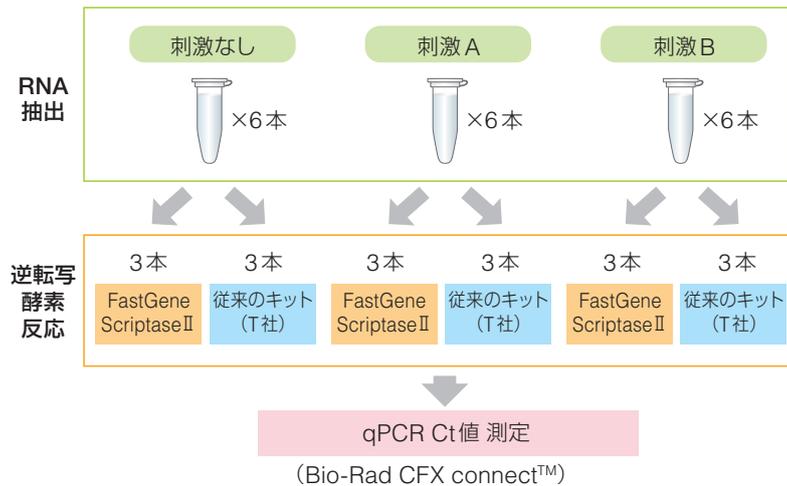
以前から、従来のキット (T社) を使用して逆転写酵素反応を行ってきましたが、コストダウンと逆転写反応の正確性を高めるため、当製品の使用を検討致しました。

無菌性腹膜炎モデルマウスの腹腔細胞から抽出したRNAを用いて、従来のキット (T社) と当製品で逆転写反応を行いました。得られたcDNAにてqPCRを行い、Ct値を確認することでキットの性能を比較しました。

## 検討方法

### マウス実験ワークフロー

同様の条件で実験を行う  
計2匹で検討



### RNA抽出

TRIzol®を使用してRNA抽出を行う。  
DNase処理：なし  
RNA溶出バッファー量：100μL DEPC水  
RNA測定：Thermo Fisher Scientific Nanodrop2000

### 逆転写酵素反応 (FastGene™ Scriptase II)

- 1) Oligo dT primer 1μLとテンプレートの total RNA 100ngを混合する
- 2) dNTP を2μL 加える
- 3) 計12.5μL となるように、DW(蒸留水、滅菌水)を加える
- 4) 65°Cで5分インキュベート後、直ちに氷上にて冷却を行う
- 5) コンポーネントを添加する

5x FastGene™ Scriptase II buffer	4 μL
0.1 M DTT	2 μL
RNase Inhibitor	0.5 μL
- 6) 42°Cで2分間インキュベート
- 7) 氷上でRNA懸濁液に、1μL FastGene™ Scriptase II を添加する
- 8) 42°Cで50分インキュベートする
- 9) 70°Cで15分インキュベートし酵素を完全に不活化させる



### FastGene™ Scriptase II

- より長いcDNAを得るための低活性RNaseH
- qPCRのために最適化された組み換え酵素

### qPCR (KAPA SYBR Fast qPCR Kit)

#### ● 反応組成

Component	Volume	最終濃度
KAPA SYBR Fast qPCR Master Mix (x2)	5 μL	1x
Forward Primer 10μM	0.2 μL	200nM
Reverse Primer 10μM	0.2 μL	200nM
テンプレートDNA	必要に応じて	<20ng
SDW	総量が10μLになるように加える	N/A

#### ● サイクルプログラム

Enzyme Activation	95°C	5min	40 cycles
↓			
Denaturation	95°C	10sec	
↓			40 cycles
Annealing/Extension	60°C	30sec	



## 結果

## インプットRNAの収量・純度測定結果 (TRIzolによる抽出)

## mouse No.1

	RNA量 (ng/μL)	純度 (A260/A280)
刺激なし	11.2	1.89
刺激A	30.9	1.84
刺激B	7.8	1.85

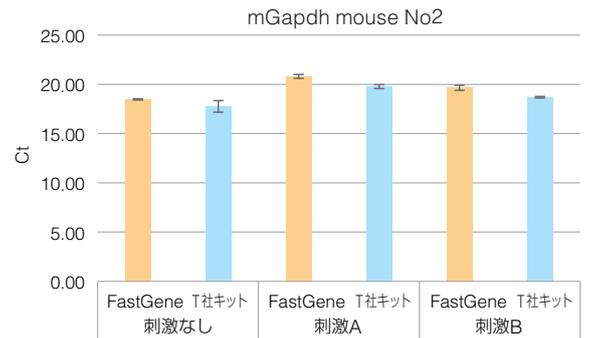
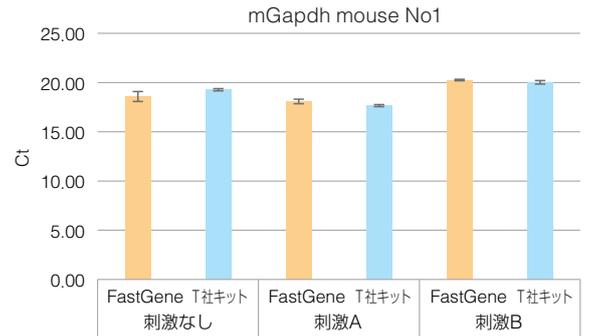
## mouse No.2

	RNA量 (ng/μL)	純度 (A260/A280)
刺激なし	57.1	1.66
刺激A	9.8	1.91
刺激B	19.1	1.71

## qPCRによる比較

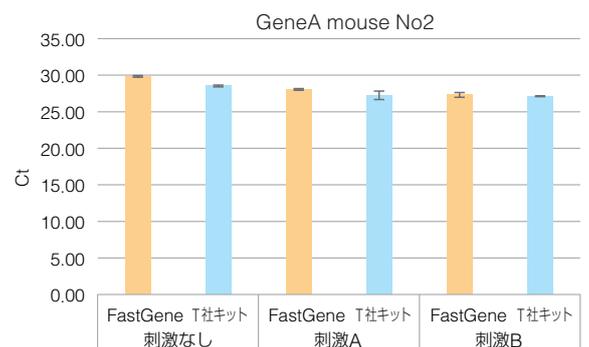
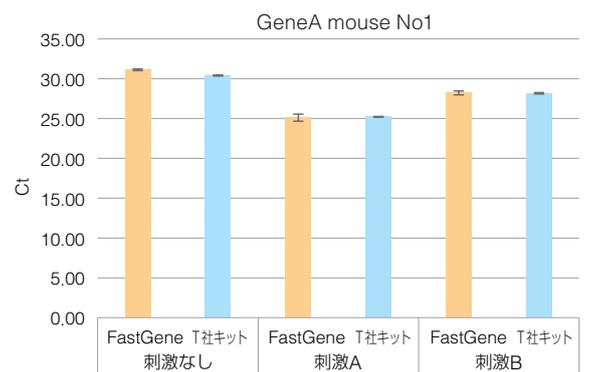
## mGapdh

Gene	逆転写キット	mouse	Ct	Mean	StdDev Ct			
mGapdh	FastGene	No.1	刺激なし	18.50	18.58	0.51		
				19.13				
				18.12				
			刺激A	18.32				
				17.87				
				18.04				
		刺激B	20.17	20.24	0.07			
			20.32					
			20.24					
		No.2	刺激なし			18.42	18.47	0.06
						18.46		
						18.54		
	刺激A		20.60	20.80	0.20			
			20.78					
			21.00					
	刺激B	19.79	19.64			0.26		
		19.35						
		19.79						
	T社キット	No.1		刺激なし	19.22		19.27	0.11
					19.18			
					19.40			
			刺激A	17.76	17.65	0.11		
				17.56				
				17.63				
刺激B		20.02	20.03	0.18				
		20.21						
		19.85						
No.2		刺激なし			17.40	17.76	0.59	
					18.44			
					17.44			
	刺激A	19.70	19.77	0.21				
		19.61						
		20.00						
刺激B	18.70	18.69			0.08			
	18.60							
	18.76							



## Gene A

Gene	逆転写キット	mouse	Ct	Mean Ct	StdDev Ct			
Gene A	FastGene	No.1	刺激なし	30.99	31.12	0.11		
				31.18				
				31.18				
			刺激A	24.70			25.11	0.45
				25.04				
				25.59				
		刺激B	27.98	28.23	0.25			
			28.23					
			28.47					
		No.2	刺激なし			29.95	29.83	0.11
						29.81		
						29.74		
	刺激A		28.19	28.06	0.12			
			28.02					
			27.97					
	刺激B	27.33	27.30			0.33		
		27.60						
		26.95						
	T社キット	No.1		刺激なし	30.35		30.40	0.06
					30.47			
					30.40			
			刺激A	25.22	25.22	0.06		
				25.17				
				25.28				
刺激B		28.14	28.18	0.09				
		28.11						
		28.27						
No.2		刺激なし			28.41	28.52	0.12	
					28.50			
					28.65			
	刺激A	26.96	27.24	0.57				
		26.86						
		27.90						
刺激B	27.07	27.13			0.06			
	27.13							
	27.18							





お客様のコメント

従来のキットとFastGene ScriptaseⅡ を使用して実験を行いました。リアルタイムPCRの結果は、ほぼ同等の結果を示していると考えました。  
操作の手間についても、ほぼ同等でした。  
価格は、FastGeneシリーズの方が安い傾向にあるので、その点はメリットだと思います。