



Application

マウスリンパ節から抽出したRNAを用いた 逆転写酵素反応の比較検討

製品名

FastGene™ ScriptaseII cDNA 合成キット (NE-LS63S)

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、近畿大学 理工学部 生命科学科 免疫分子機能研究室 早坂 晴子様のご厚意により掲載させて頂きました。

概要

当研究室では、マウスリンパ節由来RNAからの逆転写反応により、全長cDNAのクローニングを行ってきました。既存のキット (T社) では、比較的短いサイズのcDNAが優先的に合成されるため、目的遺伝子 (390bp) のシグナルを検出できませんでした。FastGene™ ScriptaseIIでは、目的遺伝子のシグナルを検出でき、結果が改善できました。

実験方法

サンプル：マウス1匹よりリンパ節 (鼠径、腸間膜) を抽出
Qiagen：RNeasy Mini Kit で total RNAを精製



マウスからリンパ節 (鼠径、腸間膜) を抽出する。
サンプル量：23 mg

FastGene™ ScriptaseII cDNA 合成キット (NE-LS63S)

RNAのインプット量：1µg

sample RNA	8	µL
oligo dT primer	1	µL
random hexamer	1	µL
dNTP	2	µL
H ₂ O	0.5	µL

↓ 65°C 5min

コンポーネントの追加

5x FastGene™ ScriptaseII buffer	4	µL
0.1 M DTT	2	µL
RNase Inhibitor	0.5	µL

↓ 42°C 2min

氷上でRNA懸濁液に、FastGene™ ScriptaseIIを1µL添加する

↓ 42°C 50min

↓ 72°C 15分間 インキュベート

4°Cで保管

FastGene™ ScriptaseII (CatNo.NE-LS63)



- ・少量のRNAから、cDNAを合成できる
- ・低活性RNaseHのため、より長いcDNAを得ることができる

これ以外にも、RT-qPCRやNGSなど様々なアプリケーションでご使用になれます。

qPCRでの使用に便利な MasterMix (5X) タイプ (CatNo.NE-LS64) もございます。

● PCRプログラム

Initial denaturation	98°C	2min	} 35 cycles
Denaturation	95°C	15sec	
Annealing	57°C	30sec	
Extension	68°C	2min	

KAPA2G Robust (CatNo.KK5004)



- ・テンプレートの精製具合に影響を受けにくくPCR阻害物質に耐性を持っている
- ・独自の酵素安定化剤により、凍結融解の影響が非常に少ない

電気泳動に便利なwith dyeのタイプもあります。(CatNo.KK5706)

KAPA2G RobustにてPCR

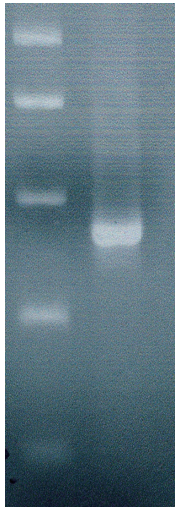
↓
電気泳動

● 電気泳動条件

電気泳動装置	: Mupid-exU (ADV EXU-1)
核酸染色試薬	: RedSafe (INB-21141)
泳動buffer	: TBE buffer
アガロースゲルの濃度	: 2 %
電圧と泳動時間	: 100 V / 30 min

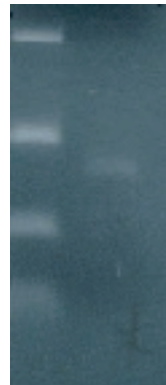


結果



← 390bp
目的遺伝子の明瞭なシグナルが確認できた

参考データ



← 390bp
他社のRT 酵素 + oligo dT primerを用いた場合はシグナルが弱かった
※同時比較は行っていません



お客様のコメント

リンパ節由来のRNAを用いてRT-PCRを行った結果、目的遺伝子（他の逆転写試薬を用いた逆転写反応ではPCR増幅が不安定であった遺伝子）の発現を検出できました。
また、全長cDNAも電気移動でバンドを確認することが出来ました。
キットとしては良い製品だと思います。