



Application

FastGene™ Scriptase II と他社キットの RT-PCRによる比較評価

製品カテゴリ

逆転写酵素

製品名

FastGene™ Scriptase II (NE-LS53)

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、国内公的研究機関で所属の 田村 拓 様のご厚意により掲載させていただきました。

概要



FastGene™ Scriptase II (NE-LS53)

FastGene™ Scriptase IIの性能評価を行うため、HeLa細胞から抽出したRNAを、本製品と既存の逆転写酵素にて、それぞれ逆転写反応を行いました。

得られたcDNAは、PCRにてターゲット遺伝子を増幅し、電気泳動にて確認を行いました。バンドのシグナルを比較することで、FastGene™ Scriptase IIの性能評価を行いました。

実験

● RNA抽出

サンプル：HeLa細胞を35 mm dish で培養し 80-90% confluent の時点で使用した。

RNA抽出：Ribozol (エムエステクノシステムズ) (N580-100ML)

吸光度測定：U-3900 (HITACHI) (U-3900)

結果：A260/280=1.72, yield=41.5 µg

● 逆転写酵素反応

Total RNAを1, 10, 100 ng/1 µLとなるように希釈した。それぞれTemplate RNAとして1 µLずつ添加した。 ※ 0 ngは1 µL H₂O

● 逆転写反応 Primer

Gene specific primer (GAPDH) : CTCTTCCTCTTGTGCTCTTGC

FastGene™ Scriptase II

Template RNA (0, 1, 10, 100 ng/µL)	: 1 µL
Gene specific primer (GAPDH)	: 2 µL (2 pmol)
dNTP Mixture (2 mM each)	: 2 µL
Sterile water (RNase free)	: 7.5 µL
total	: 12.5 µL
↓	
65 °C 5 min	
↓	
4 °C 5 min	
↓	
add	
5X FastGene™ Scriptase II buffer	: 4 µL
0.1 M DTT (kit付属)	: 2 µL
FastGene™ Scriptase II	: 1 µL
↓	
42 °C 50 min	
↓	
70 °C 15 min	
↓	
keep at 22 °C	

参考：Template total RNA推奨量：1 ng-5 µg

T社逆転写反応キット

Template RNA (0, 1, 10, 100 ng/µL)	: 1 µL
Gene specific primer (GAPDH)	: 2 µL (2 pmol)
2 mM dNTP	: 5 µL
RNase free dH ₂ O	: 2 µL
total	: 10 µL
↓	
65 °C 5 min	
↓	
4 °C 5 min	
↓	
add	
5X buffer	: 4 µL
逆転写酵素	: 1 µL
RNase free dH ₂ O	: 5 µL
↓	
42 °C 50 min	
↓	
70 °C 15 min	
↓	
keep at 22 °C	

参考：Template total RNA推奨量：5 µg以下

**PCR条件**

● 反応組成

10 μM Forward Primer	: 2.5 μL
10 μM Reverse Primer	: 2.5 μL
2 mM dNTPs (TOYOBO)	: 5 μL
5X Phusion HF Buffer	: 10 μL
cDNA	: 2 μL
sterile water	: 27.5 μL
Phusion DNA Polymerase (NEB)	: 0.5 μL
total	: 50 μL

● プログラム

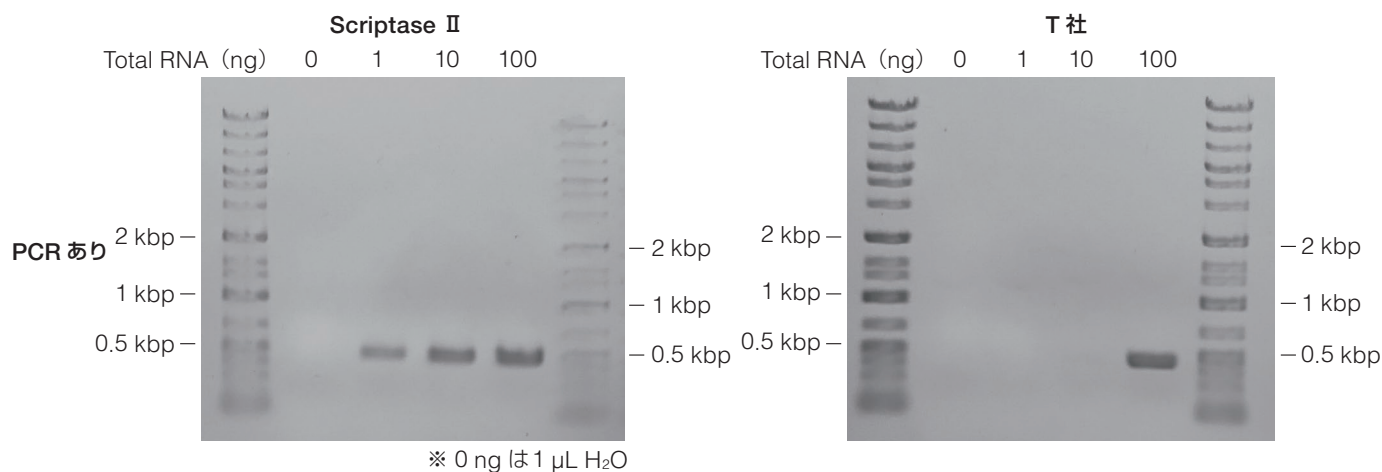
95 °C	2 min	
↓		
95 °C	10 sec	} 30 cycles
65 °C	30 sec	
72 °C	30 sec	
↓		
72 °C	3 min	
↓		
hold 22 °C		

● Primers配列-GAPDH

Forward Primer : CCACAGTCCATGCCATCAC
 Reverse Primer : CCATGAGGTCCACCACCC
 増幅産物サイズ : 500bp

電気泳動条件

アガロースゲル : 1% agarose gel
 サンプル : PCR 反応液 15 μL
 泳動バッファー : 1xTAE
 泳動条件 : 100 V, 30 min
 ラダーマーカー : 7 μL (Gene Ladder Wide 1) (日本ジーン) (313-06961)

結果

Scriptase IIでは、少ない total RNA 量で PCR のバンドを検出することができた。

**お客様のコメント**

培養細胞のmRNA発現量を解析する目的で、使い勝手がよく、大量のサンプルを解析できる逆転写酵素を探していました。

少ないtotal RNA量で逆転写ができ、満足しています。