



Application

ラットの腸間膜脂肪組織から抽出したRNAを用いた発現定量解析のための逆転写酵素反応

製品カテゴリ

逆転写酵素

製品名

FastGene™ Scriptase II Master Mix (5X) (NE-LS64)

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、静岡県立大学 栄養生理学研究室 本間一江様のご厚意により掲載させていただきました。

FastGene™ Scriptase II Master Mix (5X) (NE-LS64) の特長 (日本ジェネティクス株式会社)

本資料で使用されている逆転写キットは、遺伝子の発現定量を目的とする qRT-PCR に特化した Master Mix タイプとなっており、逆転写プライマーとしてはランダムプライマーが含まれております。

qRT-PCR による遺伝子の発現定量では、多検体を処理しなければならないケースが多いため、Master Mix タイプを使用することで、分注操作の手間を減らすことができます。

また、ランダムプライマーで逆転写を行うため、RNA の立体構造を解く熱変性ステップ (65°C・5 min) を省略し、立体構造の下流にあるターゲット領域が効率的に逆転写されることが期待できます。

これらにより、逆転写反応における操作の簡略化と操作時間の短縮化を図ることができます。

本資料の末にあります『逆転写反応に用いるプライマー選択のポイント』もご参考ください。

検討の背景

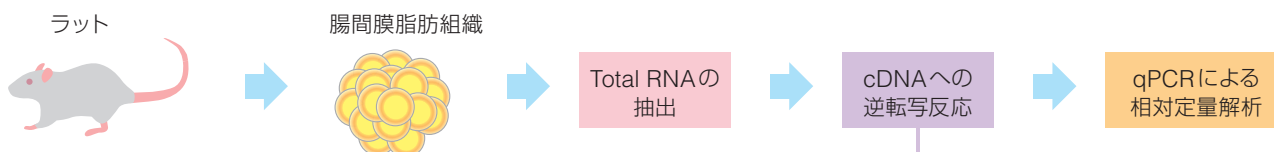
ラットの腸間膜脂肪組織から抽出した RNA を用いて発現定量解析を行ってきました。

FastGene™ Scriptase II cDNA Synthesis (NE-LS63) から cDNA の合成を行いました。酵素の添加ステップや、RNA の高次構造を解くステップに対して、若干操作上の手間を感じていました。

今回、qPCR 用に特化された FastGene™ Scriptase II Master Mix (5X) (NE-LS64) を使用したところ、必要な試薬類がすでに混合されており、また操作のステップも少ない分、簡便に使用することが出来ました。

実験

未処置の Control ラットと STZ (※) を投与した糖尿病モデルラットを用いた。



- A : Control 8 匹
- B : STZ を投与して 12 日後
随時血糖が 590 程度の
糖尿病モデル 7 匹

※ STZ : ストレプトゾシン
膵臓ランゲルハンス島の β 細胞の破壊

- RNA 抽出 : QIAGEN RNeasy (74104)
- 逆転写反応 : FastGene™ Scriptase II
Master Mix (5X) (NE-LS64)
- qPCR 試薬 : LightCycler480 用 SYBR Green I
マスターミックス (04707516001)
- qPCR 装置 : LightCycler480 (Roche) (05015278001)

逆転写反応	
FastGene™ Scriptase II DNA Master Mix (5x)	
5x FastGene™ Scriptase II ReadyMix	4 μL
High quality RNA-template	2~16 μL (400 ng)
Sterile Water	up to 20 μL
Total	20 μL

↓

25°C 10 min : アニーリングステップ

↓

42°C 60 min : 逆転写反応ステップ

↓

85°C 5 min : 酵素の失活化ステップ

↓

Store -20°C

サンプルによって RNA 濃度が違うため、400 ng となるように添加した。

実験結果

qPCR 結果

● Cq 値

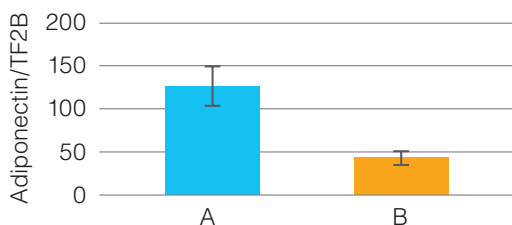
ターゲット遺伝子：Adiponectin

リファレンス遺伝子：TF2B

Rat		Cq 値	
		Adiponectin	TF2B
ラット A Control	A1	26.01	33.87
	A2	23.63	30.80
	A3	24.76	29.95
	A4	29.38	36.80
	A5	27.62	34.04
	A6	26.16	31.90
	A7	23.70	30.69
	A8	23.41	30.76

Rat		Cq 値	
		Adiponectin	TF2B
ラット B 糖尿病 モデル	B1	30.72	34.23
	B2	29.60	33.60
	B3	27.39	32.82
	B4	27.64	33.04
	B5	34.10	39.83
	B6	25.53	31.70
	B7	31.62	37.57

● Adiponectin の相対定量結果



糖尿病群の腸間膜脂肪組織における Adiponectin の mRNA 発現量が対照群よりも低かった。これまでに使用していた製品でも同様の結果が得られており、相対発現量が正しく測定できたと考えられる。

Rat	Adiponectin / TF2B
A1	232
A2	144
A3	37
A4	171
A5	86
A6	53
A7	127
A8	163
AVE	126
SEM	23

Rat	Adiponectin / TF2B
B1	11
B2	16
B3	43
B4	42
B5	53
B6	72
B7	62
AVE	43
SEM	8



お客様のコメント

感想としましては、Mixに全て準備されているのでとても楽でした。今回は60 minインキュベートさせましたが、短時間でも十分反応することが示されているので、今後使用する時には、より作業時間を短縮することができると期待しています。



参照：Technical Note 2017 (EU1)

超高速（～5分）逆転写反応の検討

逆転写反応に用いるプライマー選択のポイント（日本ジェネティクス株式会社）

逆転写反応に用いるプライマーは、主にランダムプライマー、oligo dT プライマー、ターゲット特異的プライマー（以下、特異的プライマー）の3種類があります。ダウンストリームアプリケーションに合わせて、適切なプライマーを選択してください。

⇒ 本資料使用の製品である Master Mix タイプは、ランダムプライマーが含まれています。

⇒ Scriptase II は、プライマーを選択できる、酵素のみ (NE-LS53)、cDNA 合成キット (NE-LS63) もございます。

（各プライマーの特長）

● ランダムプライマー：

ランダムな塩基配列を持った短鎖のプライマー。例えばランダムヘキサマーの場合、理論上4,096種類のプライマーが含まれる。反応液に含まれるRNAを様々な位置から網羅的に逆転写できるため、遺伝子の発現定量を目的とする場合に効果的である。この場合、ポリAテールを持たない原核生物由来のmRNAや、二次構造を持つRNAでも効果的に逆転写することが可能となる。一方、真核生物由来のmRNAにおいて、ポリAテール側から完全長cDNAをクローニングするような場合には適さない。

● oligo dT プライマー：

ポリA配列にアニーリングするプライマー。(例：真核生物由来のmRNAのポリAテールなど)

このため、主に真核生物由来のmRNAの完全長のcDNA合成に用いる。

また、真核生物の遺伝子の発現定量を目的とする場合に、ランダムプライマーに混合して使用すると、逆転写効率の向上が期待できる。

● 特異的プライマー：

ターゲットのRNA配列に基づいて、設計されたプライマー。

特定の遺伝子のみを検出する場合や、高い特異性が必要な場合に用いる。