



Application

## 培養細胞における対象遺伝子の発現解析を目的とした逆転写酵素製品の比較評価

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、京都大学のお客様のご厚意により掲載させて頂きました。

### 概要

培養細胞における対象遺伝子の発現解析を目的とした逆転写酵素製品について、マスターミックスタイプのFastGene™ Scriptase II Master Mix (5X) (NE-LS64) を評価するため、現状品の他社「ツーステップRT-qPCR用cDNA合成キット」と比較検討を行った。逆転写反応条件は現状のプログラムをそのまま使用し、得られたcDNAを用いて、ダウンストリームアプリケーションとしてqPCRで評価を行った。

### 方法 (逆転写反応)

- 用いたRNAサンプル：MEF細胞（マウス胎児線維芽細胞）より回収したRNA、または同RNAを水で10000倍希釈したもの
- 比較した逆転写キット：① FastGene™ Scriptase II Master Mix (random primer 含有)  
② Th社 cDNA合成キット（現状品）※ツーステップRT-qPCR用キット（random primer 含有）

#### ● 反応組成：

##### ① FastGene™ Scriptase II Master Mix

Sample RNA	14 $\mu$ L
FastGene™ Scriptase II Master Mix	4 $\mu$ L
dH <sub>2</sub> O	2 $\mu$ L *
total	20 $\mu$ L

※今回の検討では、現状品のキット②の反応組成に使用したものと同一Sample RNA溶液を用いたため、dH<sub>2</sub>Oを別途で添加した。

##### ② Th社 cDNA合成キット（現状品）

Sample RNA	14 $\mu$ L
5 x reaction mix	4 $\mu$ L
10 x enzyme mix	2 $\mu$ L
total	20 $\mu$ L

#### ● 反応条件

25°C	10 min
42°C	60 min
85°C	5 min
4°C	hold

※ 両キットとも、Th社 cDNA合成キット（現状品）の反応条件を用いた。

#### ● ダウンストリームアプリケーション：

SYBR Green Iマスターミックス（試薬）を用いたqPCR  
使用装置：StepOnePlus™ (Thermo Fisher Scientific社)

## FastGene™ Scriptase II シリーズ



逆転写酵素MMuLVに変異を加え、「熱安定性を向上」し、「RNaseH活性を抑制」したFastGene™ Scriptase II逆転写酵素が採用されています。これにより、クローニングを目的とした長鎖cDNA合成や、RT-qPCR、NGSなど、より複雑なアプリケーションに適用可能です。以下の3つのタイプからお選びいただけます。

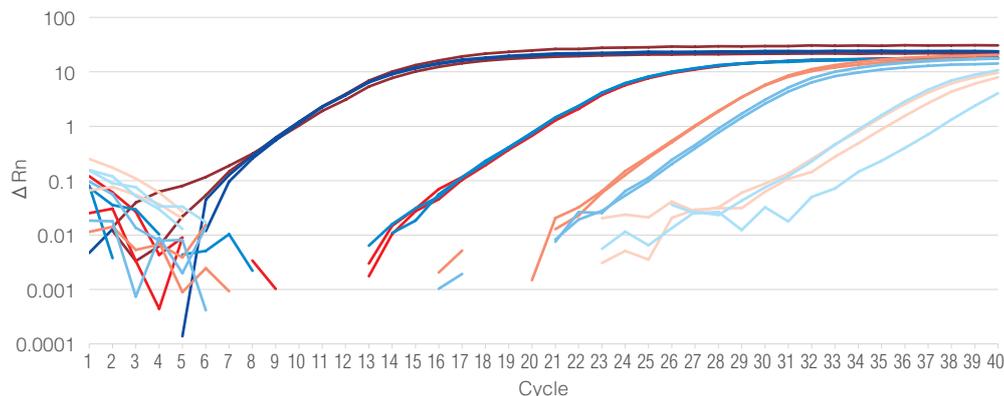
- FastGene™ Scriptase II逆転写酵素 (NE-LS53)
- FastGene™ Scriptase II cDNA合成キット (NE-LS63)、
- FastGene™ Scriptase II Master Mix (NE-LS64) 注：RT-qPCR用

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

「qPCRによる遺伝子の発現定量」用にリリースされた「ランダムプライマーを含む逆転写反応Master Mix」です。特に「qPCR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くなりますが、本製品はMaster Mixタイプなので、多検体の分注操作の手間を減らすことができます。



## 結果



サンプル	遺伝子発現量	逆転写キット
1	High	Scriptase II
2		Th社キット
1	Middle	Scriptase II
2		Th社キット
1	Low	Scriptase II
2		Th社キット
1	Middle 10000倍希釈	Scriptase II
2		Th社キット

遺伝子発現量	逆転写キット	サンプル	CT	CT Mean	CT SD	Tm1
High	Scriptase II	1	8.35	8.36	0.01	85.26
		2	8.37			85.26
	Th社キット	1	8.54	8.45		85.26
		2	8.37			85.26
Middle	Scriptase II	1	20.14	20.11	0.05	86.45
		2	20.07			86.45
	Th社キット	1	19.81	19.84		86.60
		2	19.86			86.45
Low	Scriptase II	1	28.38	28.40	0.03	83.49
		2	28.42			83.49
	Th社キット	1	29.90	29.75		83.49
		2	29.60			83.49
Middle 10000倍希釈	Scriptase II	1	34.66	34.22	0.63	86.60
		2	33.78			86.45
	Th社キット	1	33.71	35.36		76.47
		2	37.01			80.79

- 対象遺伝子の説明：  
 High：高発現する遺伝子  
 Middle：中程度発現する遺伝子  
 Low：低発現の遺伝子
- qPCRの各測定は同一サンプルをduplicateで行った。

- 両キットとも、現状品のTh社キットの逆転写反応プログラムを用いた。同一条件で逆転写反応を行い、そのcDNAを用いたqPCRの結果を比較した。その結果、両キットともに、ほぼ同等の増幅曲線が得られていることから、FastGene™ Scriptase II Master Mixを現状品の条件で使用した場合でも、安定して逆転写反応が行われたと判断された。
- Middle（原液）を10000倍希釈して逆転写したものでは、原液よりも約13.3サイクル後ろで立ち上がることが予測されるが、実験結果としてそれがはっきりと確認できたのはFastGene™ Scriptase II Master Mixであった。



## お客様のコメント

従来までMasterMixタイプの製品を扱っていなかったため、その点はとても扱いやすかった。  
 また、低発現遺伝子のRNAの逆転写効率も、従来まで用いていた製品よりも高い印象があった。