



Application

ゼブラフィッシュの受精卵から抽出した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)

メーカー名 日本ジェネティクス株式会社

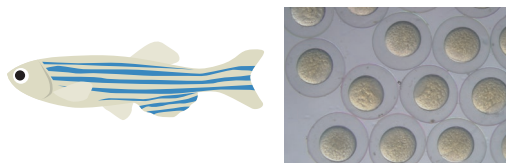
下記のデータは北海道大学 理学研究院 生物科学部門 生殖発生生物学講座 小谷 友也様のご厚意により掲載させていただきました。

はじめに

卵母細胞に蓄えられた母性因子は受精と発生に極めて重要ですが、発現量が微量の転写産物もあり研究は困難です。今回、検出を試みた転写産物は発生において重要な機能を持つと考えられますが、その発現量が極めて微量であることが予測されました。FastGene™ Scriptase II を用いて研究対象の転写産物を検出するとともに、得られたPCR産物はゲル精製後にクローニングし、変異なく逆転写されていることも確認できました。

方法

初発サンプル：ゼブラフィッシュ - 受精卵 50個



RNA精製：TRIzol Reagent (Thermo社)



逆転写反応 (製品の比較検討)

- 従来のキット (T社)
- FastGene™ Scriptase II



PCR装置：GeneAtlas 485 (メーカー：ASTEC)

PCR酵素：Expand High Fidelity PCR System (Roche-Sigma)

PCRプログラム

Pre-denature	94°C, 4 min	} 35cycles
Denature	94°C, 30 sec	
Annealing	55°C, 30sec	
Extension	72°C, 60 sec./ kb	



電気泳動

電気泳動装置：Mupid-2x
泳動 Buffer：TAE
電圧：100V
泳動時間：15min

FastGene™ Scriptase II

RNAのインプット量 total RNA 3 μg
+
oligo dT primer 1 μL を混合
+
dNTP Mixture を 2 μL 添加

※ 鋳型RNAの量は下記の量まで使用できます

- Total RNA : 1 ng-5 μg
- Messenger RNA (mRNA) : 1 ng-0.25 μg
- Specific RNA : 0.01 pg-0.5 μg

合計 12.5 μL となるように 蒸留水を添加する

65°Cで5分間インキュベート後、氷上にて冷却

コンポーネントの添加

5x FastGene Scriptase II buffer	4 μL
0.1 M DTT	2 μL
RNase Inhibitor	0.5 μL

42°Cで2分間インキュベート

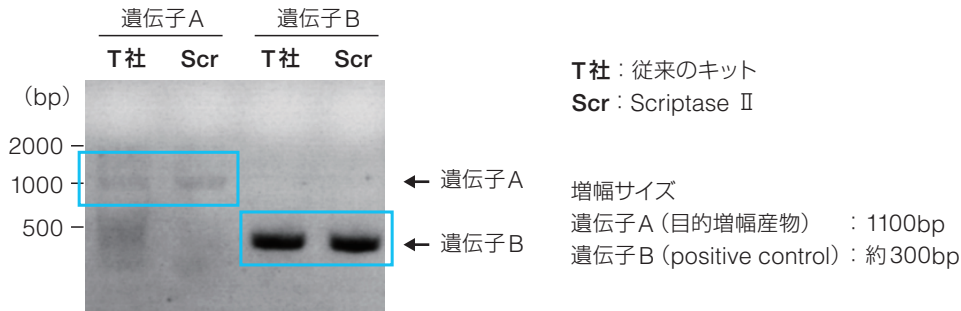
氷上でRNA懸濁液に、1 μL FastGene™ Scriptase II を添加する

42°Cで50分間インキュベート

70°Cで15分間インキュベートし酵素を完全に不活化させる



結果



結果

発現量の極めて少ない転写産物を少ないバックグラウンドで検出することが出来た。



お客様のコメント

既存のキット (T社) を使用していましたが、これに替わる廉価な逆転写酵素を探していました。私の研究室ではFastGene社の製品をいくつか使用していますが、それらは廉価で質が良く評価が高いため、今回の製品を試しました。結果、発現量の極めて少ない転写産物を検出することができ、廉価だけでなく非常に優れた逆転写酵素であることが分かりました。今後も使用していく予定です。