



Technical Data

超高速（～5分）逆転写反応の検討

評価製品

FastGene™ Scriptase II cDNA Synthesis キット (Cat.No. NE-LS63)

目的

FastGene™ Scriptase II を用いて逆転写反応時間の短縮プロトコルを検討する。

評価方法

0.05ng、0.5ng、5ngのインプットRNAを用いて、42℃での反応時間を変えた5種類のプロトコル（5、10、20、30、60分間）で逆転写反応を行った。
得られたそれぞれのcDNAを用いて、「エンドポイントPCR後の電気泳動による増幅産物の比較」および「リアルタイムqPCRにおけるCq値の比較」により、プロトコルの評価を行った。

要約

FastGene™ Scriptase II は、少量のRNAから高品質のcDNAを得ることができる組み換え型逆転写酵素です。酵素反応の最適化により、さらに反応性が向上されました。

本テクニカルノートでは、FastGene™ Scriptase IIを用いることで、最少量0.05ngのインプットRNAから、最短5分間の逆転写反応時間で、エンドポイントPCRおよびリアルタイムqPCRにおいて、十分な結果を得ることができた事例をご紹介します。

使用試薬

- FastGene™ Scriptase II cDNA Synthesisキット
- RNA：Universal Human Reference RNA
インプットRNA量：5 ng、0.5 ng、0.05 ng
- プライマー：
 - TUBB (1006 bp)：エンドポイントPCR
 - GAPDH (138 bp)：qPCR
 - YWHAZ (249 bp)：qPCR

実験手順

逆転写反応

反応組成およびプログラム	容量
2 mM dNTP	2 μL
80 μM Oligo dT	1 μL
RNA*	5 μL
滅菌水	up to 10 μL

65℃で10分間インキュベーション

5 x 逆転写酵素緩衝液	4 μL
FastGene™ Scriptase II	1 μL
0.1 M DTT	1 μL
RNase 阻害剤	0.5 μL
滅菌水	up to 20 μL

42℃で5、10、20、30、60分間

95℃で3分間

* インプットRNA量は、50 ng、5 ng、0.5 ngを用いました。逆転写反応液の10%をPCR解析に使用しました。

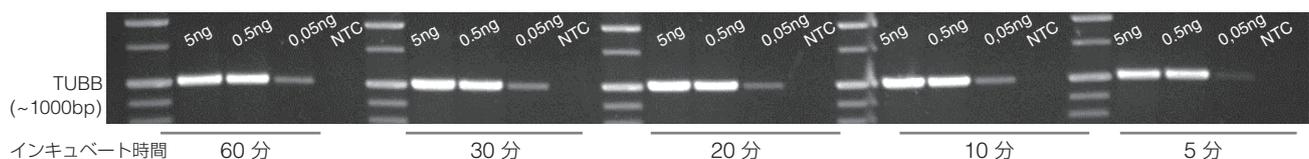


FastGene™ Scriptase II cDNA Synthesisキット

エンドポイントPCRおよびリアルタイムqPCRは、使用した試薬の取扱説明書に記載されている推奨プロトコルに従って実施しました。

結果

PCR - 電気泳動結果

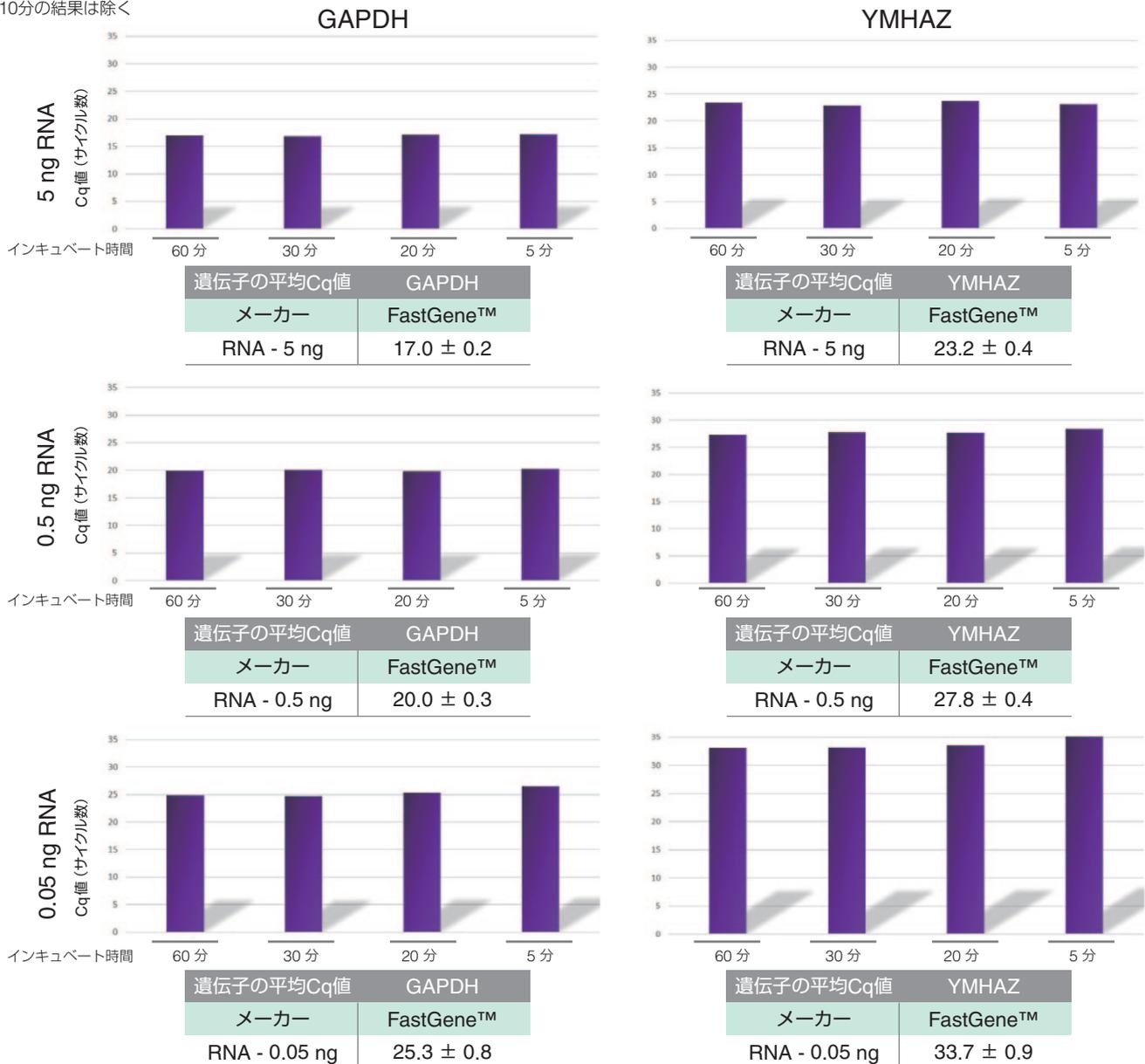


結果 1 エンドポイントPCRによる評価

異なるインプットRNA量および異なる逆転写反応時間で得られたcDNAを用いて、TUBB遺伝子をターゲットとする1006 bpのPCR産物を増幅した結果、最短5分間の逆転写反応時間でも、すべてのインプットRNA量でPCR産物が確認されました。鋳型を含まない陰性コントロール (NTC) では、PCR産物は確認されませんでした。

定量PCR

※10分の結果は除く



結果2 リアルタイムqPCRによる評価

異なるインプットRNA量および異なる逆転写反応時間で得られたcDNAと、GAPDH遺伝子（高発現量）およびYMHAAZ遺伝子（低発現量）をターゲットとするプライマーを用いて、リアルタイムqPCRを実施しました。

その結果、インプットRNA量が最少量0.05 ngでも、逆転写反応時間5～60分間で得られたテンプレートの間で、Cq値の差は認められず、すべての標準偏差は±1サイクル未満でした。

結論

今回の評価方法では、FastGene™ Scriptase IIを用いることで、最短5分間の逆転写反応時間で、エンドポイントPCRおよびリアルタイムqPCRにおいて、十分な結果を得ることができました。

〈結果1 エンドポイントPCRによる評価〉

今回の全ての条件で1006bpのPCR産物を確認することができました。

しかし、最少インプットRNA量0.05 ngを用いた逆転写反応時間5分間の条件では、バンドは比較的薄かったため、ターゲットが1000 bp以上のPCR増幅では、インプットRNA量が少量の場合、最低でも10分間の逆転写反応を推奨します。

〈結果2 リアルタイムqPCRによる評価〉

今回の条件では、±1サイクルを超えるCq値の差は検出されませんでした。