

高効率逆転写酵素「ReverTra Ace[®]」の反応効率・伸長性能と逆転写反応温度の検討

東洋紡績（株） 敦賀バイオ研究所 川井 淳

はじめに

「ReverTra Ace[®]」は、M-MLV RTaseを遺伝子工学的に改変して開発された高効率逆転写酵素であり、伸長性、および反応効率が格段に向上しています。この「ReverTra Ace[®]」は、高効率逆転写キット「ReverTra Ace - α -[®] (Code No. FSK-101)」やリアルタイムPCR用逆転写キット「ReverTra Ace[®] qPCR RT Kit (Code No. FSQ-101)」に用いられており、大好評いただいています。

今回は、この「ReverTra Ace[®]」の優れた反応効率、および伸長性を確認するために、高次構造を取りやすく、逆転写が難しいとされる18SリボソームRNAを鋳型とした逆転写反応において、他社の逆転写酵素と比較を行いました。

方法

(1) 使用酵素

- ・ReverTra Ace[®]
(Code No. TRT-101, 100U/ μ l, 推奨反応温度42 $^{\circ}$ C)
- ・A社逆転写酵素
(改変型M-MLV RTase, 200U/ μ l, 推奨反応温度42 $^{\circ}$ C)
- ・B社逆転写酵素
(改変型M-MLV RTase, 200U/ μ l, 推奨反応温度55 $^{\circ}$ C)

(2) 逆転写反応

まず、鋳型となる200ngのHeLa細胞由来total RNAと、4 pmolの配列特異的リバースプライマー (5'-GTTCGACCGTCTTCTCAGCGCTCC-3')、各逆転写酵素推奨量のdNTPs、およびRNase-free水を混合し(合計液量13 μ l)、65 $^{\circ}$ C、5min. インキュベート後、氷上で急冷して、プライマーのプレアニーリングを行いました。その後、各逆転写酵素の反応バッファー、40UのRNase inhibitor (Code No. SIN-101)、2 μ lの各逆転写酵素、およびRNase-free水を混合し(合計液量20 μ l)、42 $^{\circ}$ Cまたは55 $^{\circ}$ C、20分間の逆転写反応を行い、最後に、85 $^{\circ}$ C、5min. 処理することにより、酵素を失活させました。

(3) PCRによる検出

(2)で調製した逆転写反応液を鋳型として、高成功率PCR酵素「KOD FX (Code No. KFX-101)」を用いて様々な鎖長領域のPCRを行いました。リバースプライマーは逆転写反応で用いたものと同じのもの、フォワードプライマーはプライマー#1 (5'-TGACGGAAGGGCACCACAGGAG-3'、増幅鎖長600bp)、プライマー#2 (5'-AGCTAGGAATAATGGAATACGACCGC-3'、増幅鎖長950bp)、プライマー#3 (5'-TAACGAGGATCATTGGAGGGCAAGC-3'、増幅鎖長1220bp)、プライマー#4 (5'-GCCATGCATGTCTAAGTACGCACGG-3'、増幅鎖長1760bp)を、それぞれ5pmol使用しました。その後、逆転写反応液2 μ lを用いて、反応液量25 μ lで、温度条件98 $^{\circ}$ C 2min \rightarrow

(98 $^{\circ}$ C 10sec \rightarrow 68 $^{\circ}$ C 2min) \times 30サイクルのPCRを行いました。PCR終了後、電気泳動を行い、目的バンドのシグナル強度、非特異バンドの出現パターンにより逆転写反応効率、および特異性を評価しました(図2)。

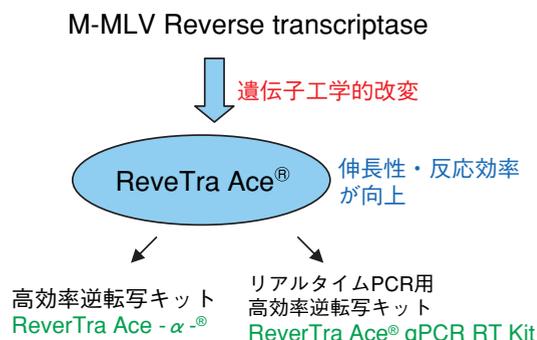
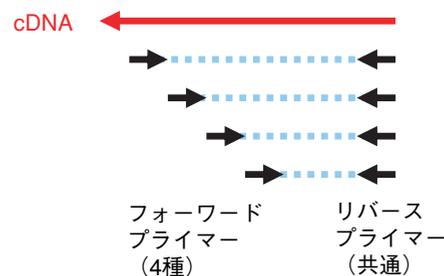


図1. ReverTra Ace[®]のキットへの応用

(1) 逆転写反応 (42 $^{\circ}$ Cおよび55 $^{\circ}$ C)



(2) PCR (KOD FX使用)



(3) アガロースゲル電気泳動

図2. 逆転写反応効率・伸長性比較の実験スキーム

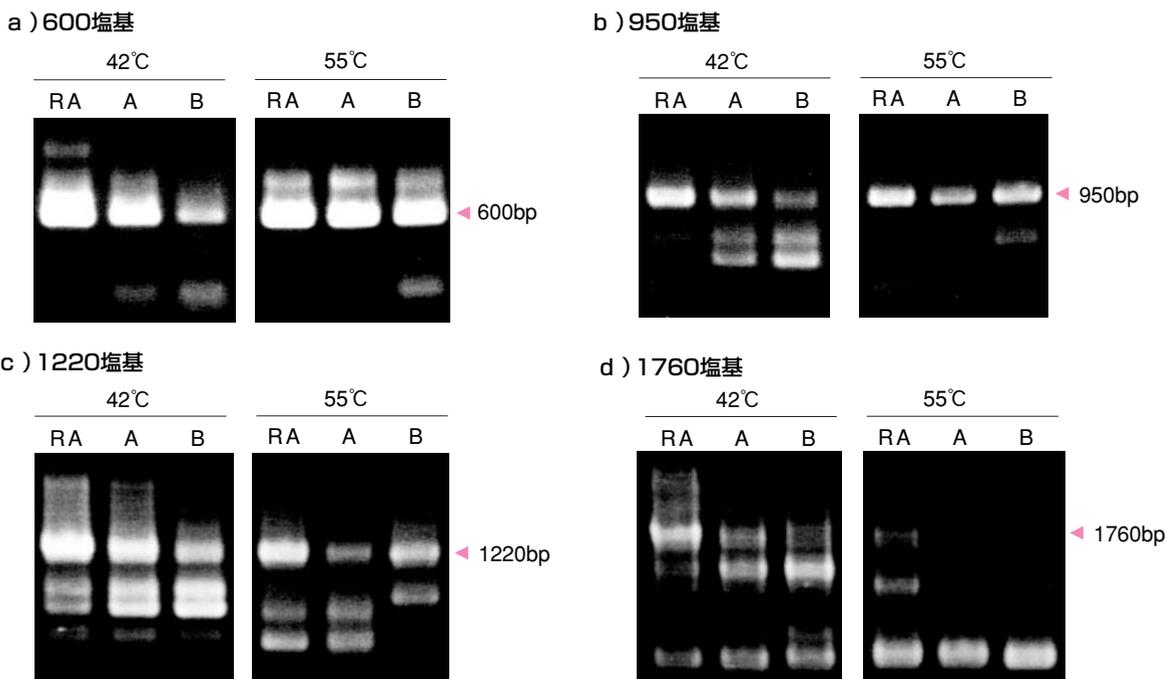


図3. 逆転写伸長性の比較結果
RA : ReverTra Ace®, A : A社逆転写酵素、B : B社逆転写酵素

結果及び考察

結果を図3に示します。cDNA合成量、および伸長距離のいずれにおいてもReverTra Ace®が最も良好な結果を示しました。図3の中でエキストラバンドがみられるものがありますが、それは、rRNAの複雑な立体構造が原因で逆転写のスリップが原因で生じた短い増幅産物であると考えられます。ReverTra Ace®は最もエキストラバンドが少なく、特異性の高い逆転写が行われていることが示唆されました。また今回、逆転写の反応温度を2水準(42℃および55℃)で比較しましたが、いずれの酵素においても、高温で反応を実施するより、それぞれの至適温度(ReverTra Ace®およびA社酵素: 42℃、B社酵素: 55℃)で反応を行った方が良好な結果を示し、18S rRNAのような高次構造をとりやすい鋳型においても、高温での逆転写は必ずしも結果の改善には結びつかないことが示唆されました。これらの結果から、逆転写酵素の選択においては、反応温度

の高さより、酵素に由来備わっている基本性能が重要であることが示唆されました。なお、本酵素の反応効率・伸長性などの基本性能の高さは、弊社独自の遺伝子改変によるものです。

まとめ

今回の結果より、ReverTra Ace®の基本性能は、他社品と比較して極めて優れており、様々な逆転写反応のアプリケーションにおいて安定した性能を発揮すると考えられます。ReverTra Ace®は、単品での販売(TRT-101)のほか、様々なキット製品の酵素としても用いられており、1st strand cDNA合成、定量PCR用のcDNAサンプル調製、RT-PCRによる遺伝子クローニングなど、多様な用途において簡便にご使用いただけます。是非一度、ReverTra Ace®および各種キット製品をお試しください。

品名および内容	包装	保存温度	Code No.	価格
ReverTra Ace®	2,000U×1本	-20℃	TRT-101T	¥6,000
	10,000U×1本		TRT-101	¥15,000
	(10,000U×1本)×5		TRT-101X5	¥60,000
	(10,000U×1本)×10		TRT-101X10	¥105,000

関連商品

品名および内容	包装	保存温度	Code No.	価格
高効率逆転写キット ReverTra Ace -α®	100回用(20μl反応)	-20℃	FSK-101	¥53,000
リアルタイムPCR用高効率逆転写キット ReverTra Ace® qPCR RT Kit	200回用(10μl反応)	-20℃	FSQ-101	¥38,000
RNase Inhibitor (Native type)	2,500U×1本	-20℃	SIN-101	¥9,000
RNase Inhibitor (Recombinant type)	2,500U×1本	-20℃	SIN-201	¥9,000