

Code No. TRT-101 10,000U×1本  
 Code No. TRT-101X5 (10,000U×1本)×5  
 Code No. TRT-101X10 (10,000U×1本)×10

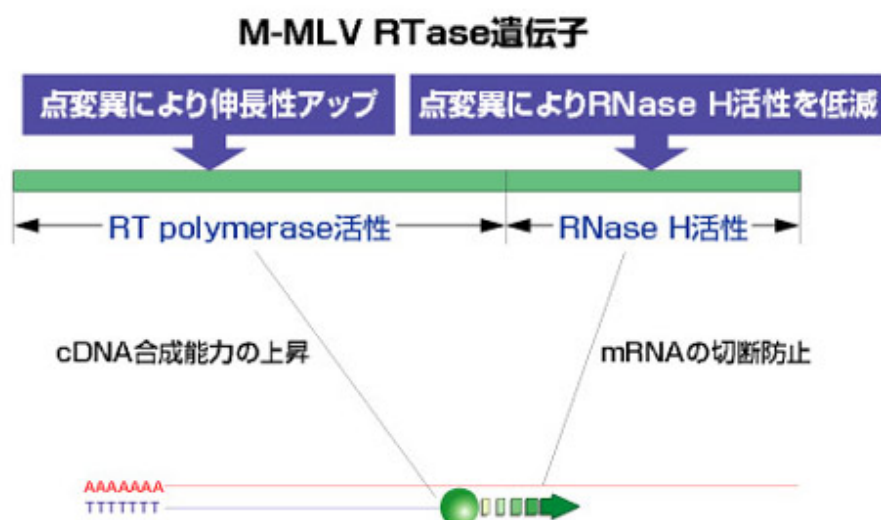
保存温度 -20℃

伸長性・反応効率・高温反応性が向上した逆転写酵素

## ReverTra Ace®

ReverTra Ace®はM-MLV RTaseのRNaseH活性ドメインとDNA合成ドメインに当社独自の点変異を導入し、機能改変した高効率逆転写酵素です。また、バッファの至適化を行い、今までにない高温反応性・伸長性・反応効率を実現しています。

- ・ **伸長性が向上** 本酵素では、M-MLV RTaseのRNaseH活性ドメインに点変異を導入し、RNaseH活性を除去しています。RNaseH活性は、cDNA合成において鋳型/プライマーであるDNA-RNAハイブリッドのRNAを分解し、反応効率等の低減の原因となることが知られています。従来のM-MLV RTase、デリーションタイプのM-MLV RTase RNaseHに比べて、伸長性が格段に向上しています。
- ・ **反応効率・高温反応性が向上** M-MLV RTaseのDNA合成ドメインに点変異を導入し、高温反応性・反応効率を向上させています。RNAの高次構造はRTaseの反応の進行を妨げ、cDNAの合成を困難にしますが、反応温度を上げるにより鋳型RNAの高次構造を緩和し、RTaseによるcDNA合成反応を促進させることができます。



### 1. 内容物

ReverTra Ace® は容量別に次の3種類をご用意しております。

	TRT-101 (10,000U×1)	TRT-101X5	TRT-101X10
ReverTra Ace® (100U/μl)	100 μl × 1本	(TRT-101)×5	(TRT-101)×10
5× Buffer	1ml × 1本		

(注1) 5× Buffer中にdNTPsは含まれておりません。

(注2) 5× Bufferは、Code No.: TRT-1Bとして別売しています。



<製品の内容・技術に関するお問合せ>  
 東洋紡株式会社 ライフサイエンス事業部 テクニカルライン  
 TEL 06-6348-3888 FAX 06-6348-3833  
 開設時間 9:00~12:00, 13:00~17:00 (土、日、祝日を除く)  
 E-mail: tech\_osaka@toyobo.jp  
 [URL] <http://www.toyobo.co.jp/bio>

## 2. 安全上の注意

本製品は、研究用試薬です。診断・臨床用試薬として使用しないでください。また、本製品の使用にあたっては、実験室での一般の注意事項を厳守し、安全に留意してください。

## 3. 性能・品質

本製品は次の性能を保有していることを各ロットで確認しています。

### (1) 合成能

Poly(rA) : Oligo(dT)<sub>20</sub> を鋳型／プライマーとして、42°C、10 分間に 1 nmol の TTP を酸不溶性沈殿物に取り込む酵素量を 1U としています。

### (2) 純度

酵素 50U と 0.2 μg の MS2 RNA を 42°C で 1 時間反応させても RNA の電気泳動パターンに変化はありません。

## 4. プロトコール (RT-PCR のための 1 本鎖 cDNA 合成)

### (1) 反応液の調製

- ・ 凍結している試薬は完全に融解してからご使用ください。
- ・ 反応液を調製する前に各試薬を十分混合してからご使用ください。

Components	Volume or Final Concentration
total RNA	0.5~5 μg
or poly(A) <sup>+</sup> RNA	50~500ng
Oligo(dT) <sub>12-20</sub> or Gene Specific Primer (10 pmoles/μl)	0.5 μl
or Random Primers (25 pmoles/μl)	1 μl
5× Buffer	4 μl
10mM dNTPs	2 μl
ReverTra Ace <sup>®</sup> (100units/μl)	1 μl
Total Volume	20 μl

### (2) 酵素反応温度条件

アニーリング 30°C ・ 10min 注意：Random Primer を使用する時は必要です。

↓

酵素反応 42°C ・ 20~60min

↓

変性 99°C ・ 5min 注意：必ず行ってください。DNA/RNA ハイブリッドとタンパクが結合したままですと後の PCR が阻害される可能性があります。

### (3) PCR 組成

Components	Volume or Final Concentration
1st strand reaction	~20 μl
10× Buffer	10 μl
dNTPs	0.2 mM
Amplification primer 1 (10 pmoles/μl)	1 μl
Amplification primer 2 (10 pmoles/μl)	1 μl
Blend Taq <sup>®</sup> (2.5 U/μl)	0.5 μl
Total Volume	100 μl

(注 1) dNTPs の添加量は RT 反応液からの持込分を加味して調整してください。

## 5. 使用上の注意

### (1) 反応温度について

本酵素は通常 42°Cで行ってください。RNA の高次構造の緩和のために反応温度を上げる際には、プライマーのアニーリング効率に留意する必要があります。

### (2) RNA の熱変性について

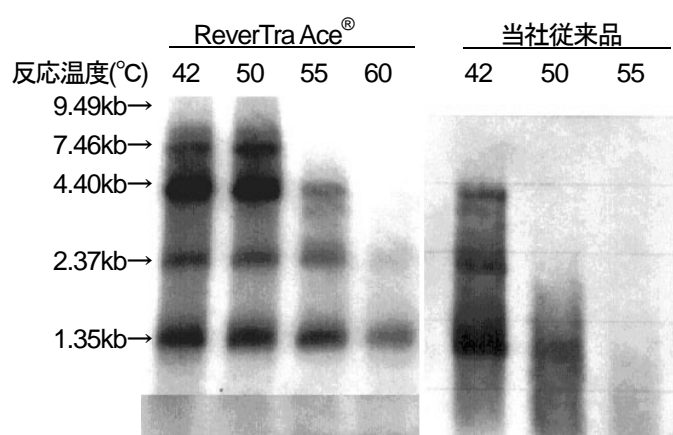
RNA の高次構造緩和のため、一旦 RNA を熱変性させてから反応を開始させると効率が上がる場合があります。その際は、RNA, Primer, H<sub>2</sub>O のみで 65°C, 5min の熱処理を行い、直ちに氷上に移して急冷します。その後、5× Buffer, 10mM dNTPs, ReverTra Ace<sup>®</sup> を加え反応を行います。

(3) 逆転写反応液を PCR のテンプレート DNA として用いる場合、RT 反応液中の過剰の RNA が PCR 反応を阻害することがあります。PCR 反応液 50 μl に添加する RT 反応液量は、RNA 量として 100ng 以下にすることを推奨します。つまり、Total RNA 1 μg を用いて 20 μl の容量で RT 反応を行った場合、PCR 反応への添加量は 2 μl 以下にします。

(4) 5x Buffer を溶解させたときに浮遊物（沈殿）ができることがあります。これは還元剤の一部が析出したものです。転倒混和後室温で静置して溶かした後お使いください。

## 6. 実施例

### 【42~60°Cにおける cDNA 合成反応】



Poly(rA)Tail を持つ 9.49, 7.46, 4.40, 2.37, 1.35kb の長さの RNA 400ng を鋳型に、42~60°Cの反応温度で Oligo(dT)<sub>30</sub> 25pmoles をプライマーとして、酵素 100U を用いて 30min の cDNA 合成反応を行いました。

ReverTra Ace<sup>®</sup> では 42°C及び 50°Cで 9.49kb, 55°Cで 4.40kb, 60°Cで 2.37kb の cDNA の合成が確認されました。

この他にも、当社ライフサイエンス事業部のウェブページ(<http://www.toyobo.co.jp/bio/>)で下記の実施例をご覧ください。

- (1) 42~60°Cにおける cDNA 合成反応。
- (2) cDNA 合成効率の比較
- (3) 14kb の cDNA 合成反応

## 7. 関連商品

品名	包装	Code No.
RNase Inhibitor, recombinant	2,500 U × 1 本 (2,500 U × 1 本) × 5	SIN-201 SIN-201X5
ReverTra Ace - $\alpha$ - <sup>®</sup>	100 回用	FSK-101
Oligo(dT) <sub>20</sub> Primer	1nmole	FSK-201
Random Primer(9mer)	2.5 nmoles	FSK-301
dNTPs Mixture(10mM)	0.2 ml	NTP-301
ReverTra Ace <sup>®</sup> 用 Buffer	1 ml	TRT-1B
<高性能 Taq polymerase> Blend Taq <sup>®</sup>	250 U × 1 本 (250 U × 1 本) × 5	BTQ-101 BTQ-101X5
<Hot start PCR 用高性能 Taq polymerase> Blend Taq <sup>®</sup> -Plus-	250 U × 1 本 (250 U × 1 本) × 5	BTQ-201 BTQ-201X5

## 8. 参考文献

- (1) K.miyazaki et al., *J.Bacteriology*, 185:2219-2226 (2003)
- (2) A.Nezu et al., *Biochem.J.*, 263:59-66 (2002)
- (3) S.Nakashima et al., *J.Biochem.(Tokyo)*, 131:241-246 (2002)
- (4) S.Atsumi et al., *EMBO J.*, 20:5453-5460 (2001)
- (5) Y.Yabuta et al., *Plant Cell Physiol.*, 41:666-675 (2000)
- (6) S.Lee et al., *Gene*, 245:253-266 (2000)

## 【製造・発売元】



ー納期・注文に関するお問い合わせー

東洋紡株式会社 ライフサイエンス事業部 (大阪)  
 〒530-8230 大阪市北区堂島浜二丁目 2 番 8 号  
 TEL 06-6348-3786 FAX 06-6348-3833  
 E-mail : order\_lifescience@toyobo.jp

東洋紡株式会社 ライフサイエンス事業部 (東京)  
 〒104-8345 東京都中央区京橋一丁目 17 番 10 号 住友商事京橋ビル  
 TEL 03-6887-8819 FAX 03-6887-8951  
 E-mail : order\_lifescience@toyobo.jp



<製品の内容・技術に関するお問合せ>  
 東洋紡株式会社 ライフサイエンス事業部 テクニカルライン  
 TEL 06-6348-3888 FAX 06-6348-3833  
 開設時間 9:00~12:00, 13:00~17:00 (土、日、祝日を除く)  
 E-mail: tech\_osaka@toyobo.jp  
 [URL] <http://www.toyobo.co.jp/bio>