



First Strand cDNA Synthesis Kit

ReverTra Ace - α -[®]

([Code No. FSK-101F](#))

取扱説明書

TOYOBO CO., LTD.
Bioproducts Sales and Marketing Department
OSAKA JAPAN

TOYOBO

— 目次 —

[1]	はじめに.....	(1)
[2]	RT-PCR 法の原理.....	(2)
[3]	キットに含まれているもの.....	(3)
[4]	ご用意いただくもの.....	(3)
[5]	プロトコール.....	(4)
[6]	添付プライマーの説明.....	(6)
[7]	RNAを取り扱う際の注意.....	(6)
[8]	RT-PCR を行う際の注意.....	(6)
[9]	トラブルシューティング.....	(7)
[10]	関連商品.....	(9)

ご注意

本キットに含まれる試薬類はすべて研究用試薬です。診断・臨床用試薬として決して使用しないでください。本キット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。

[1] はじめに

逆転写 (Reverse Transcription; RT) 反応を PCR (Polymerase Chain Reaction) と組み合わせた RT-PCR 法は、比較的簡便かつ迅速に、多数のサンプルからRNAの検出を行うことが可能な手法です。そのため、mRNA 発現の有無、発現量、長さの異常といった RNA の解析や cDNA クローニングの手段として広く用いられています。

弊社では MMLV (Molony murine leukemia virus) 由来の逆転写酵素を遺伝子工学的手法を用いて改変し、長鎖の cDNA 合成を妨げる RNase H 活性を欠失させ、さらに cDNA 合成能を大幅にアップさせた改良型酵素である ReverTra Ace[®] の開発に成功しました。本製品はこのReverTra Ace[®]の優れた cDNA 合成能を活かした、First strand cDNA 合成キットです。

ReverTra Ace - α -[®]は、ReverTra Ace[®]を用いた First strand cDNA 合成キットです。RT 用のプライマーを揃えているため、手軽に逆転写反応を行うことができます。お手持ちの各種 DNAポリメラーゼによる PCR 反応のためのテンプレートの作製にもご利用いただけます。例えば、High fidelity PCR 用酵素、Long PCR 用酵素等と組み合わせることにより、より目的に応じた RT-PCR が可能です。

本製品には、以下の特長があります。

1. 高い cDNA 合成能

本製品で使用している ReverTra Ace[®]は cDNA 合成能を大幅にアップさせた改良型酵素です。14 kb 以上の cDNA 合成を確認しています。

2. 高い検出感度

ReverTra Ace - α -[®]は、逆転写反応液を全量持ち込んでも PCR 反応を阻害しないように至適化しているため、種々の DNA ポリメラーゼを用いて RT 反応と同一チューブ内で PCR 反応を行うことが可能です。

[2] RT-PCR 法の原理

RT-PCR 法は、図1のように、鋳型 RNA から First Strand cDNA を合成する逆転写反応のステップと、この cDNA を鋳型として Second Strand cDNA を合成し、さらに目的の遺伝子断片を増幅する PCR のステップからなります。

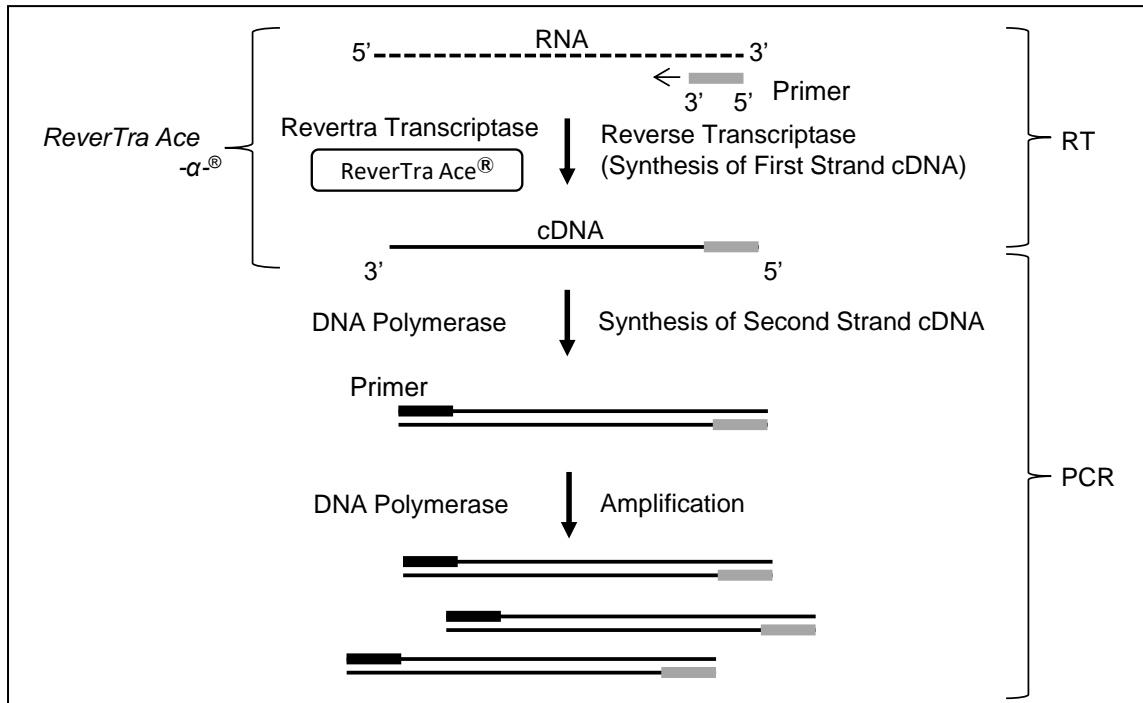


図1 RT-PCR法の原理

[3] キットに含まれているもの (-20°C保存)

			(100回用)
1	ReverTra Ace®		100 μL
2	5×RT Buffer	(25 mM Mg 含有)	400 μL
3	RNase Inhibitor	(10 U/μL)	100 μL
4	dNTP Mixture	(各10 mM)	200 μL
5	RNase Free H ₂ O		1,200 μL
6	Oligo(dT)20 Primer	(10 pmol/μL)	100 μL
7	Random Primer (9 mer)	(25 pmol/μL)	100 μL

【各プライマーのシーケンス】

Oligo(dT)20 Primer

5'-(dT)₂₀-3'

Random Primer (9 mer)

5'-(dN)₉-3'

[4] ご用意いただくもの

RT-PCRを行う際には、本製品のほかに以下のものが必要となります。

1. 試薬

- ・ミネラルオイル(必要に応じて)
- ・電気泳動用ゲル
- ・電気泳動用バッファー
- ・DNAサイズマーカー
- ・滅菌蒸留水(PCR グレード)
- ・PCR用試薬(DNA ポリメラーゼ)

2. 機器・器具

- ・サーマルサイクラー
- ・ゲル電気泳動装置
- ・UVトランスイルミネーター及び撮影装置
- ・マイクロ遠心機
- ・PCR用チューブ

[5] プロトコール

1. 逆転写反応

試薬	使用量
RNase Free H ₂ O	(11-X) μ L
5 \times RT Buffer	4 μ L
dNTP Mixture (各10 mM)	2 μ L
RNase Inhibitor (10 U/ μ L)	1 μ L
Primer	
Random Primer (9 mer) *	(25 pmol/ μ L)
Oligo(dT)20 Primer	(10 pmol/ μ L)
配列特異的下流プライマー	(10 pmol/ μ L)
	いずれか1 μ L
RNA	
Total RNA	: 1 μ g以下
mRNA	: 10~100 ng
	いずれかX μ L
ReverTra Ace [®]	1 μ L**
Total Volume	20 μ L
↓ (30°C、10 min.) *	
↓ 42°C、20 min.	
↓ 99°C、5 min.	
↓ 4°C、5 min.	
↓ スピンドウン	

【注】

- * Random Primer (9 mer) をご使用の場合は、十分にアニールできるように、30°C、10分間のプレインキュベーションを行ってください。
- ** 逆転写酵素は反応後にcDNAに結合しているため、99°C、5分間の熱処理を行いますが、必要以上に添加すると熱処理が不十分となり、PCR反応を阻害することがありますので、ご注意ください。

2. PCR

基本的には、お手持ちの DNA ポリメラーゼの使用方法に従って下さい。以下に一般的な使用例を示します。

試薬	使用量
(1. 逆転写反応の) サンプル	20 μ L
滅菌蒸留水	67.5 μ L
10 \times PCR Buffer *	10 μ L
配列特異的上流プライマー (10 pmol/ μ L)	1 μ L
配列特異的下流プライマー ** (10 pmol/ μ L)	1 μ L
DNA ポリメラーゼ (5 U/ μ L)	0.5 μ L
Total Volume	100 μ L

↓ PCR

(ターゲット長が1 kb程度の場合)

94°C	30 sec.	(30サイクル)
60°C	30 sec.	
72°C	1 min.***	

↓ サンプルの一部をとって、アガロースゲル電気泳動を行い、目的増幅断片の生成を確認する。

【注】

- * Mg 別添の場合には、Mg も添加して下さい。
- ** 配列特異的下流プライマーを逆転写反応に用いた場合は、プライマーの代わりに滅菌蒸留水 1 μ Lを加えてください。
- *** 使用する酵素によりますが、Taq DNA ポリメラーゼの場合、ターゲット長が1 kbを超える際には、通常 1 min./1 kb を目安に伸長時間を延長してください。

[6] 添付プライマーの説明

逆転写反応のプライマー選択の際には、以下の選択基準を参考にしてください。

1. Oligo(dT)20 Primer

poly(A) tail を有する mRNA の逆転写反応にのみご使用いただけます。原核生物の RNA、真核生物の rRNA や tRNA 等には使用できません。

2. Random Primer (9 mer)

poly(A) tail の有無を問わず、一般的にご使用いただけます。Random Primer (9 mer) で逆転写反応を行った場合、いかなるペアの配列特異的なプライマーによっても PCR を行うことができます。

Random Primer (9 mer) で逆転写反応を行う際には、プライマーが十分アニールできるように 30°C、10分間のプレインキュベーションを行ってください。

[7] RNA を取り扱う際の注意

1. RNase の混入をおさえる

RT-PCR法では、RNase の作用をおさえることが重要です。そのためには、使用器具および試薬類からの RNase の混入を防ぐとともに、純度の高い RNA サンプルを得ることが重要です。さらに、実験環境にご注意いただくとともに、唾液、汗等からの RNase の混入を防ぐため、マスク、手袋の着用をおすすめします。

2. 器具類について

実験器具は可能な限り、ディスポーザブルタイプのプラスチック製品をオートクレーブ滅菌して使用して下さい。ガラス器具をご使用になる際には、乾熱滅菌するか、もしくは0.1% Diethylpyrocarbonate (DEPC) 溶液に37°C、12時間浸せきした後、オートクレーブ(121°C、30分間)をかけたものを使用します。

[8] RT-PCR を行う際の注意

本製品は鋳型として、Total RNA、tRNA、mRNA、rRNA に適用できるように設計されておりますが、いずれの場合でも目的の増幅産物を効率良く得るために純度の高いRNAサンプルをご使用になることをお勧めします。

[9] トラブルシューティング

1. 増幅バンドが確認できない、または、増幅効率が悪い。

原因		対策
鋳型RNA	<ul style="list-style-type: none"> ・純度が悪い ・鋳型量が少ない ・劣化している ・高次構造を有する 	<ul style="list-style-type: none"> ・再調製する ・PCRのサイクル数を増やす ・鋳型量を増やす ・再調製する。 ・使用頻度が高い場合は、あらかじめ少量ずつ分注しておく ・RTにRandom Primer (9 mer) を使用する ・酵素以外を入れたRT反応液を65℃で5分間、氷上で5分間置いた後、RTを行う
プライマー	<ul style="list-style-type: none"> ・Tm値が低い ・配列が適切でない ・プライマー量が少ない 	<ul style="list-style-type: none"> ・アニーリング温度を下げる、またはプライマーを再設計する ・poly (A) tail を持たないRNAをRTのテンプレートとする場合、Oligo(dT)20 Primerは使用できない ・配列が正しいことを確認する ・プライマー内、あるいはプライマー間に相補的な領域がないことを確認する ・PCRのプライマー2つが同一鎖にアニールしないことを確認する ・1反応当り、10 pmol 以上使用する
PCR条件	<ul style="list-style-type: none"> ・アニーリング温度が高い ・伸長時間が短い ・サーマルサイクラーの作動が適切でない 	<ul style="list-style-type: none"> ・PCR条件を検討する ・PCR条件を検討する ・動作が正常であるかを確認する
その他	<ul style="list-style-type: none"> ・RNaseのコンタミ ・酵素の失活 	<ul style="list-style-type: none"> ・鋳型RNAを再調製する ・新しい酵素を使用する

2.非特異的なバンドが多い

原因		対策
鋳型RNA	<ul style="list-style-type: none"> ・鋳型量が多すぎる ・ゲノムDNAのコンタミ 	<ul style="list-style-type: none"> ・鋳型量を減らす ・DNase I 処理を行う ・逆転写反応を行っていないNegative Control も同時にPCRを行う
プライマー	<ul style="list-style-type: none"> ・配列が適切でない ・プライマー量が多すぎる 	<ul style="list-style-type: none"> ・ターゲット領域以外にもアニーリングしやすい領域がある→プライマーを再設計する ・プライマー量を検討する
PCR条件	<ul style="list-style-type: none"> ・アニーリング温度が低い 	<ul style="list-style-type: none"> ・アニーリング温度を上げる
その他	<ul style="list-style-type: none"> ・サンプル間のコンタミネーション 	<ul style="list-style-type: none"> ・チップをこまめに交換する ・フィルターチップを用いる

[10] 関連商品

●キット構成試薬の単品販売

品名	内容	Code No.
ReverTra Ace [®] <高効率逆転写酵素>	10,000 U × 1本	TRT-101
RNase Inhibitor, recombinant	2,500 U × 1本 (2,500 U × 1本) × 5	SIN-201 SIN-201X5
dNTPs Mixture (10 mM)	0.2 mL	NTP-301
Oligo(dT)20 Primer	1 nmol	FSK-201
Random Primer (9 mer)	2.5 nmol	FSK-301

●RNA抽出関連試薬

MagExtractor TM -RNA- <Total RNA抽出用試薬キット>	100回用	NPK-201F
Magical Trapper <磁性ビーズ分離用スタンド>	1個	MGS-101

●他のRT-PCRキット

RT-PCR Quick Master Mix <Tth DNA Pol.を使用したワンステップRT-PCRキット>	50回用	PCR-311F
---	------	----------

●リアルタイムPCR関連試薬

ReverTra Ace [®] qPCR RT Kit <リアルタイムPCR用cDNA合成キット>	200回用	FSQ-101
Realtime PCR Master Mix <リアルタイムPCR用マスターミックス(プローブ検出用)>	1 mL × 5本 (500回用/20 μL反応)	QPK-101
SYBR [®] Green Realtime PCR Master Mix <リアルタイムPCR用マスターミックス(SYBR [®] Green I 検出用)>	1 mL × 5本 (500回用/20 μL反応)	QPK-201
SYBR [®] Green Realtime PCR Master Mix -Plus- <リアルタイムPCR用マスターミックス(SYBR [®] Green I 検出用)>	1 mL × 5本 (500回用/20 μL反応)	QPK-212
THUNDERBIRD [®] Probe qPCR Mix <各種蛍光プローブ・蛍光プライマー検出用リアルタイムPCR試薬>	1.67 mL × 3本 (500回用/20 μL反応)	QPS-101
THUNDERBIRD [®] SYBR [®] qPCR Mix <SYBR [®] Green I 検出用リアルタイムPCR試薬>	1.67 mL × 3本 (500回用/20 μL反応)	QPS-201

TOYOBO

【製造・販売元】

— 価格・在庫に関するお問い合わせ —

東洋紡株式会社 バイオプロダクト営業部 (大阪)
〒530-0001 大阪府大阪市北区梅田一丁目13番1号
大阪梅田ツインタワーズ・サウス
TEL 06-6348-3786 FAX 06-6348-3833
E-mail : order_lifescience@toyobo.jp

東洋紡株式会社 バイオプロダクト営業部 (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・技術に関するお問い合わせ —

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、休日を除く)
E-mail : tech_osaka@toyobo.jp
[URL] <https://lifescience.toyobo.co.jp/>