



M-MLV Reverse Transcriptase, RNase H Minus

cDNA合成において、逆転写酵素が持つRNase H活性はテンプレートとなるRNAからの完全長cDNA合成を妨げる場合があります。RNase H活性(-)の逆転写酵素(例えばM-MLVの組換え体など)の使用は、合成される完全長cDNAの比率を上げるため、完全長のcDNAライブラリーの作製に推奨されています。



逆転写酵素は一般的にどのようなアプリケーションに用いられますか。

逆転写酵素(RT)は、RNAテンプレートから相補的なDNA(cDNA)合成を触媒するDNAポリメラーゼの一種です(1-3)。RNAからcDNAコピーを作製する逆転写酵素の活性は、cDNAライブラリーの構築、RT-PCR^(a)、プライマー・エクステンション、RNAシークエンシングなど様々な分子生物学のアプリケーションで利用されています。



もっとも一般的に使われるRTは何ですか。

もっとも一般的に使われる逆転写酵素は、Avian Myeloblastosis Virus から精製されたレトロウイルス酵素AMV RT (カタログ番号 M5101)(4,5) と、Moloney Murine Leukemia Virus RT の組換え体クローンを発現する大腸菌から精製されたM-MLV RT(6,7)です。



逆転写酵素はどのような酵素活性を持つのですか。

AMV RTとM-MLV RTは、両方とも2つの主要な活性を持ちます。ひとつはRNA依存性DNAポリメラーゼ活性、もうひとつはRNase H活性です。DNAポリメラーゼ活性は、cDNA合成を必要とする全てのアプリケーションで必要です。それに対し、RNase H活性は完全長cDNAを合成するこの酵素の活性として望ましくなく、むしろ妨げとなります。逆転写酵素は、DNAテンプレートとRNA:DNAハイブリッドにおいてDNA依存性DNAポリメラーゼ活性も持つことに注意してください。しかし、この活性は大きくなく、一般的に分子生物学のアプリケーションで活用されることはありません。



RNase H活性とはどのようなものですか。

RNase H活性は、cDNA合成にもっとも適した逆転写酵素を選ぶ際に重要な問題となります。大腸菌のRNase H活性のように逆転写酵素のRNase活性はRNA:DNAハイブリッドのRNA鎖を分解します。cDNAが合成されると、逆転写酵素のRNase H活性の基質となるRNA:DNAハイブリッドが形成されます。cDNA合成におけるRNase H活性の影響は2つ

あります。転写産物の全収量と完全長cDNAのパーセントが低下するという事です。逆転写反応は、RNAテンプレート中の特異的な配列にハイブリダイズしたDNAプライマー、多くの場合poly(A)+ tailから開始されます。プライマーとRNAのハイブリッドは重合のプライムサイト(開始点)として働くのみならず、逆転写酵素のRNase H活性の基質にもなります。合成されるcDNAの収量は、逆転写酵素が重合を開始する前にRNA:DNAハイブリッドを分解するRNase H活性がどのくらいあるかにも影響されます。アプリケーションによってはDNA合成を検出するためにRNAの最少量を増加させる必要が生じます。さらに、この酵素のRNase H活性により、DNA重合が起こっているサイトの近くのRNA鎖が切断されることもあります。切断が起こるとRNA分子のコピーされていない部位が逆転写複合体から解離し、cDNA合成は停止します。RNA分子が長ければ長いほどこのような現象は起こりやすくなります。その結果、お使いになる逆転写酵素にRNase H活性がある場合、長鎖RNA分子(>5kb)は完全にはcDNAにコピーされにくくなります。



どのようにしたら逆転写酵素からRNase H活性を除去できるのですか。

逆転写酵素のDNAポリメラーゼ活性は、付随するRNase H活性には依存しません。すなわち、cDNA合成におけるRNase H活性の悪影響はRNase H活性を持たない逆転写酵素を作製することで除去できます。これは、そのタンパク質のRNase H活性領域に変異を導入することによって達成されます。これらの逆転写酵素はRNase H (-)と呼ばれます。RNase H活性の除去により、プライマーとRNAのハイブリッドが分解されないため、逆転写反応がより効率的に開始されるようになります。また、前述のように合成の早期終結が起こりにくいため、完全長cDNAの合成もより効率が上がります。



プロメガからはどのようなタイプのRNase H (-) RTs が入手できますか。

プロメガでは2種類のRNase H(-)の逆転写酵素を提供しております。M-MLV Reverse Transcriptase, RNase H Minus, Deletion Mutant(カタログ番号M5301)とM-MLV Reverse Transcriptase, RNase H Minus, Point Mutant(カタログ番号 M3682)です。点変異型は、この酵素のRNase H活性領域に点変異を導入することによってRNase H(-)にされました。この酵素は機能的にSuperScript™ II と同等です。欠失変異型は点変異型と機能的に類似していますが、RNase H活性は欠失変異によって除去されています。M-MLV Reverse Transcriptase, RNase H Minusは、機能的にSuperScript™ と同等です。



M-MLV RT, RNase H (-) 欠失変異型(deletion mutant)と点変異型(point mutant)の機能的な違いは何ですか。

ほとんどのアプリケーションでは、M-MLV RTのどちらのRNase H(-)型もお使いいただけます。プロメガでは、点変異型のほうが欠失変異型よりも高温での安定性があることを確認しました。また、1.2kbの鋳型を用いたcDNA合成反応において、M-MLV RT, RNase H Minus, Point Mutantを使った場合55℃まで完全長のcDNAが合成されるのを観察しました。同じ鋳型でM-MLV RT, RNase H Minus, Deletion Mutantを使った場合、50℃まで完全長cDNAが合成されました。これらの酵素を高温で使う場合の詳しい情報については、プロメガテクニカルサービスにお問い合わせください(prometec@jp.promega.com)。



SuperScript™シリーズの酵素を現在使っている場合はどうですか。

SuperScript™ IIには、M-MLV RT, RNase H Minus, Point Mutant (カタログ番号 M3682)を代替使用することをお勧めします。SuperScript™ IIには、M-MLV RT, RNase H Minus (カタログ番号 M5301)を代替品としてお使いください。これらの酵素は、お客様のアプリケーションでSuperScript™またはSuperScript™ IIに替えてそれぞれ同ユニットでお使いいただくことができます。



RNase H(-) の逆転写酵素を使うことは、どのアプリケーションでもっとも有効ですか。

RNase H(-)の逆転写酵素は、cDNAライブラリー作製において選択すべき酵素です。この酵素により長いテンプレートから完全長のcDNAを合成できるということは、より正確なRNAの相対的な存在量(転写産物の長・短によらず)をライブラリーに反映できるということです。しかしながら、RNase H(-)の逆転写酵素を使用する一番の利点が長鎖cDNAを合成することであるため、通常では短いDNAが必要とされるRT-PCRや、プライマー・エクステンションの結果改善には結びつかないかもしれません。長鎖cDNA (>5kb)が必要とされるアプリケーションには、RNase H(-)の逆転写酵素をお使いいただくことを推奨します。逆転写酵素の完全長cDNAを合成する能力は、RNAの長さのほかに、テンプレート中で複雑な二次構造をとる領域も影響します。反応温度を上げてcDNA合成反応を実施することで、問題となる二次構造を持つ領域をリラックスさせ、合成反応を向上させることができます。RNAテンプレート中の二次構造が完全長cDNAの合成を阻んでいる可能性がある場合や、cDNA合成反応を温度を上げて行ないたい場合、M-MLV Reverse Transcriptase, RNase H Minus, Point Mutantを使用することをお勧めします。いずれの酵素も高温でご使用になれます。

参考文献

1. Eun, H.-M. (1996) *Enzymology Primer for Recombinant DNA Technology*, Academic Press, San Diego, CA, 427,
2. Gerard, G.F. and D'Alessio, J. (1993) In: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 16: *Enzymes of Molecular Biology*, Burrell, M.M., ed., Humana Press, Totowa, NJ, 73. .
3. *Enzyme Resource Guide*, Vol. I : *Polymerases* **BR075A**, Promega Corporation.
4. Kacian, D.L. (1977) *Meth. Virol.* **6**, 143.
5. Houts, G.E. *et al.* (1979) *J. Virol.* **29**, 517. .
6. Roth, M.J., Tanese, N. and Goff, S.P. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 9326.
7. Verma, I.M. (1974) In: *The Enzymes*, Boyer, P.D., ed., Academic Press, NY, 87.

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
M-MLV Reverse Transcriptase, RNase H Minus, Deletion Mutant	10,000u	M5301	20,000
M-MLV Reverse Transcriptase, RNase H Minus, Point Mutant	10,000u	M3682	26,000
	50,000u	M3683	102,000

関連製品

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
M-MLV Reverse Transcriptase, RNase (H+)	10,000u	M1701	9,000
	50,000u	M1705	34,000
M-MLV Reverse Transcriptase Buffer Pack	2 × 1ml	M5313	5,000
AMV Reverse Transcriptase	300u	M5101	14,000
	1,000u	M5108	36,000
AMV Reverse Transcriptase, High Concentration	600u	M9004	26,000

SuperScript is a trademark of Life Technologies, Inc.

©The PCR process is covered by patents issued and applicable in certain countries. Promega does not encourage or support the unauthorized or unlicensed use of the PCR process.