



RT-PCR に最適な新しい逆転写酵素 ImProm-II™ Reverse Transcriptase

ImProm-II™ Reverse Transcription System, ImProm-II™ Reverse Transcriptase, Taq DNA Polymerase

By Dan Kephart, Ph.D., Promega Corporation

はじめに

逆転写酵素は、ライブラリー構築、プローブの合成、RT-PCRなどcDNA合成を必要とするさまざまなアプリケーションに用いられます。

多くのアプリケーションにおいて、全長cDNAの合成が求められますが、鋳型となるRNAの高次構造や逆転写酵素に由来するRNase H活性により伸長反応が阻害されます。プロメガのImProm-II™ Reverse Transcriptase は、これらの問題に影響されずに長鎖cDNAの合成が可能です。

また、遺伝子発現の研究に繁用されているRT-PCR法は、微量でも定量的にメッセージを検出するために、RNAから効率的にcDNAを合成する能力と高い感度が要求されます。ImProm-II™ Reverse Transcriptase では、特殊なバッファーを用いているため、酵素の安定性が非常に高く希少RNAを検出する高感度RT-PCRに最適です。

長鎖cDNAの合成

ImProm-II™ Reverse TranscriptaseとI社の代表的な逆転写酵素を用い、逆転写反応を行いました。図1の結果のように、ImProm-II™ Reverse Transcriptaseは、7.5kbのcDNA合成が可能であることを確認しました。ImProm-II™ Reverse Transcriptaseは長鎖cDNAの逆転写に適したツールとしてお使いいただけます。

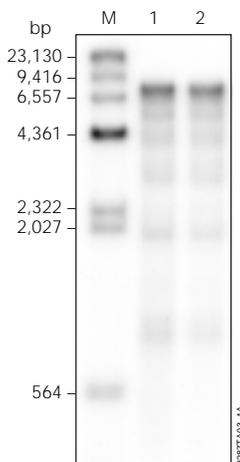


図1. ImProm-II™ Reverse TranscriptaseおよびI社の競合品を用いた7.5kb RNAの逆転写反応の比較

7.5kbのpoly(A)+転写産物(1µg)にOligo(dT)₁₅ Primer (0.5µg)を加え、70 °Cで5分間変性を行い、素早く氷上で冷却した。1 × Reaction buffer, 3mM MgCl₂, 0.5mM dNTPおよび[³²P] dCTPとなるようにImProm-II™ Reverse Transcription Reaction Mixを調整した。変性させたRNA/プライマー混合液を37 °Cに温めた反応液に加えた。『ホットスタート』cDNA合成を行うために、その後ImProm-II™ Reverse Transcriptase (1µl)を添加した。反応を37 °Cで1時間インキュベートした。合成されたcDNAの一部を取り、変性させ、電気泳動を行った。標識したLambda DNA/Hind III Markers (カタログ番号G1711)を対照に用いた。レーン1、ImProm-II™で逆転写されたcDNA。レーン2、I社の逆転写酵素で得られたcDNA。レーンM、Lambda DNA/Hind III Markers。

RT-PCRを用いた希少RNAの検出

RT-PCRは、逆転写後にTaq DNA Polymeraseを加えて行う2段階反応と単一のバッファー中で両反応を行う1段階反応が用いられます。Taq

DNA PolymeraseはImProm-II™ Reverse Transcriptaseに添付されるバッファー中で酵素活性を示すため、ImProm-II™ Reverse TranscriptaseとTaq DNA Polymeraseを組み合わせた1段階反応のRT-PCRが行えます。

標準的な組成を用いた1段階RT-PCR反応により(詳細はPromega Notes 79参照)、1 × 10¹⁰コピー(約0.1µg)から1コピーまで段階希釈(10倍ずつ)したKanamycin Control RNAを鋳型とし、RT-PCRを行いました。その結果、10¹⁰コピーから1コピーまで明瞭なバンドが検出されました(図2参照)。このことから、ImProm-II™ Reverse Transcriptaseを用いたRT-PCRでは、1コピーでも検出可能であり、11オーダーの解析を行うことができます。このように、ImProm-II™ Reverse TranscriptaseはRT-PCRにおいて優れた性能を示します。

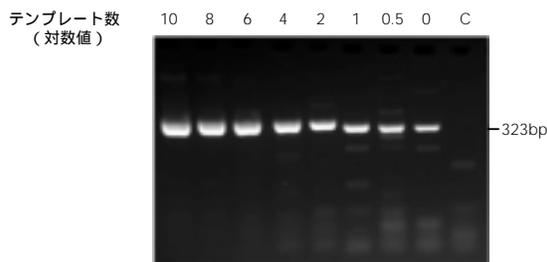


図2. ImProm-II™ Reverse TranscriptaseとTaq DNA Polymeraseを組み合わせた1段階RT-PCRによるKanamycin Control RNAの検出

RT-PCRの反応は、逆転写: 25 /5分間(アニーリング); 42 /60分間(伸長)、酵素の不活性化: 95 /5分間、増幅: 94 /1分間; 60 /1分間; 72 /2分間の38サイクル後、72 /5分間の伸長を行った。20µlのRT-PCR反応液から2µlを取り、4% NuSieve® : GTG® agarose gelによる電気泳動で解析した。レーンM、100bp DNA Ladder (カタログ番号G2101)。レーンC、RNAを含まないネガティブコントロール。センスプライマー 5'-GCCATTCTCACCCGGATTTCAGTCGTC - 3'。アンチセンスプライマー 5'-AGCCGCCGTCCCGTCAAGTCAG - 3'

まとめ

ImProm-II™ Reverse Transcriptaseを用いた逆転写反応は7.5kbの長鎖cDNA合成が可能です。また、ImProm-II™ Reverse TranscriptaseとTaq DNA Polymeraseを組み合わせることによって1コピーの希少RNAでもRT-PCRにより検出できることを示しました。

ImProm-II™ Reverse Transcriptaseは特殊なバッファーを用いており、反応液中で高い安定性を示します。このため、ImProm-II™ Reverse Transcriptaseでは、長鎖cDNA合成や高感度RT-PCRが可能となりました。

このようにImProm-II™ Reverse Transcriptaseは、RT-PCRをはじめとしたさまざまなアプリケーションにご利用いただけます。

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
ImProm-II™ Reverse Transcription System (キット: コントロール、プライマーなどを含む)	100回分	A3800	64,000
ImProm-II™ Reverse Transcriptase (酵素 + バッファーのみ)	100回分	A3802	40,000
	500回分	A3803	140,000

お試しサンプル(10回分; カatalog番号 A3801) 受け付け中 !!!
在庫がなくなりしだい終了させていただきます。