

ImProm-II™ Reverse Transcriptase

INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCTS A3801, A3802 AND A3803.

Quick
PROTOCOL

簡易プロトコル

A. RNAとプライマーの結合

1. 使用するRNAを氷上で解凍し、必要量を分注する（未使用分は速やかに冷凍庫に戻す）。
2. RNA(1 µgまで)とcDNA primerをそれぞれ5 µlのNuclease-Free Water(氷上)に加える。
3. チューブの蓋をきつく閉め、70°C、5分間加熱後、氷水中に5分間急冷する。
4. 約10秒間遠心し、壁面などについた溶液を落とす。

(注) Reverse Transcription Mix (以下RT mix) を加えるまではチューブは閉めておくようにする。

B. 逆転写反応

20 µlの反応系の場合（スケールアップ可能）。

1. 氷上で、以下に示すようにRT mixを調製する。

Nuclease-free water (最終的に15 µlになるように加える)	X µl
ImPromII 5X Reaction Buffer	4.0 µl
25mM MgCl ₂	1.2-6.4 µl
dNTP Mix (終濃度 0.5mM)	1.0 µl
rRNasin Ribonuclease Inhibitor	20 unit
ImProm-II Reverse Transcriptase	1.0 µl
Final Volume	15 µl

2. 穏やかに攪拌し、氷上へ置く。
3. ステップAで調製したRNAとプライマー結合物から5 µlを氷上に用意してあるRT mixに加える。
4. 必要に応じてMineral oilを反応液の液面上に加える。
5. 25°C、5分間 インキュベートする。
6. 42°C、60分間で第1鎖cDNAの合成を行う（温度は37-55°Cの間で調整可能）。
7. 70°C、15分間でReverse Transcriptaseを不活性化させる。

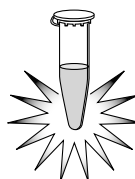
C. (参考) PCRによるDNA増幅

(弊社のTaq DNA Polymeraseをご使用の場合、詳細はプロトコルTM236, page 8-10をご覧ください。)

1. PCRの反応に必要な試薬を滅菌した1.5mlチューブに加えてよく混合し、氷上に保存する（以下 PCR Mixとする）。
2. 逆転写反応物（cDNA）をPCR Mixの入った氷上のチューブに加える。（Nuclease-Free Waterで最終的に100 µlになるように調整）
3. 溶液の蒸発による濃度変化を防ぐため、必要に応じてNuclease-Freeのmineral oilを溶液上加える。
4. あらかじめ94°Cに設定したサーマルサイクラーへセットし、PCR反応を行う。（増幅反応前に94°C、2分の処理を行うHot Start法を推奨しています。）
5. PCR反応後、サンプルを直ちに解析に用いない場合は、-20°Cで保存して下さい。



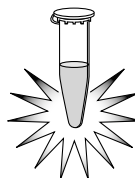
CAUTION !
作業は氷上で行ってください。



RNAとprimerの結合



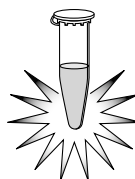
氷上でRT mixを調製



逆転写反応



氷上でPCR mixを調製



Hot StartによるPCR反応

Additional protocol information is available in Technical Manual #TM236, available upon request from Promega or online at www.promega.com

技術的なお問合せは:

e-mail: prometec@jp.promega.com • Tel: 03-3669-7980 • Fax: 03-3669-7982



Promega

Revised 4/03
Part #Impro-IIJ