

# Omniscript™ Reverse Transcriptase

## プロトコールとトラブルシューティング

First-strand cDNA 合成

Two-tube RT-PCR 用

Omniscript Reverse Transcriptase

目次	ページ
逆転写反应用 Omniscript プロトコール	2
ガイドライン：RT-PCR	5
トラブルシューティング	6

February 2001



## 逆転写反应用 Omniscript プロトコール

本プロトコールは 50 ng から 2 µg までの RNA と QIAGEN の逆転写酵素、Omniscript Reverse Transcriptase を用いて first-strand cDNA を合成するためのプロトコールです。ここで指定の RNA 量は、逆転写反応液中の全 RNA (rRNA、mRNA ウイルス RNA およびキャリア RNA を含む) を意味し、使用したプライマー量および合成された cDNA 量には RNA 量は関与しません。また 2 µg 以上の RNA を使用する際は、各溶液を RNA 量に比例してスケールアップして下さい。50 ng 以下の RNA では、微量の RNA 用に特別に開発された QIAGEN の Sensiscript™ Reverse Transcriptase を使用することをお勧めします。

### 実験を始める前の注意事項

- RNA を初めて取り扱う方は、Handbook の “Appendix A: General Remarks for Handling RNA” (16 ページ) をはじめにお読み下さい。
- 本プロトコールは、50 ng から 2 µg の RNA 使用量に最適化されたものです。ここで指定の RNA 量は逆転写反応液中の全 RNA (rRNA、mRNA ウイルス RNA およびキャリア RNA を含む) 意味し、使用したプライマー量および合成された cDNA 量には RNA 量は関与しません。2 µg 以上の RNA を使用する際は、各溶液を RNA 量に比例してスケールアップして下さい。
- 反応液のセットアップは、RNA の分解および不完全な長さの cDNA 合成を避けるために全て氷上で行って下さい。
- 通常、特別に RNA の変性およびアニーリングを行う必要性はありません。しかし、複雑な二次構造を有する RNA の場合には、変性ステップを必要とする場合もあります。その際は、逆転写反応の前に RNase フリー精製水に溶解した RNA を 65 °C で 5 分間インキュベーション後、直ぐに氷上に反応チューブを置いて下さい。RNA の変性を逆転写反応液中で行わないで下さい。
- oligo-dT プライマーを使用の際は、プライマーの長さは最低 12 ヌクレオチド、そして最終濃度は 1 µM をお勧めします。その他のプライマーを使用する際は、それらの濃度および長さの最適化をそれぞれ行って下さい。一般的に推奨されるプライマーの最終濃度は 0.1 ~ 1.0 µM です。
- 逆転写反応に続く PCR (two-tube RT-PCR) を行う際には、5 ページの “ガイドライン: RT-PCR” を参照して下さい。さらに以下の点にご注意下さい：
  - DNA 調製、あるいは RT-PCR 増幅産物解析を行う場所と本反応液のセットアップを行う場所は別にする。
  - 逆転写反応および PCR のセットアップに用いる溶液およびピペット類は他の実験に使用しない。
  - クロスコンタミネーションの危険性を避ける為、ディスポーザブルの疎水性フィルター付きピペットチップを使用する。

## 実験手順

1. テンプレートのRNA 溶液を氷上で溶解する。プライマー溶液（キットに含まれない）、10x Buffer RT、dNTP Mix およびRNase フリー精製水を室温で解凍後、直ぐに氷上に保存する。各溶液をボルテックスでミックス後、スピンドウンして溶液を収集する。
2. RNase inhibitor（別売り）を冷却した1x Buffer RT（10x Buffer RTを添付されているRNase フリー精製水で希釈）を用いて最終濃度10 units/ $\mu$ lに希釈する。ボルテックスで数秒静かにミックス後、スピンドウンして溶液を収集する。

市販のRNase inhibitorの濃度は、通常40 units/ $\mu$ lですが、前もって希釈することでステップ3におけるマスターミックス調製の際にピペッティングが簡単になります。

注：RNase inhibitorは実験直前に希釈し、RNase inhibitor およびBuffer RTは実験に必要な量のみを希釈するようにして下さい。

3. 4 ページの表に従ってマスターミックスを氷上で調製する。ボルテックスで数秒（5秒以下）静かにミックス後、スピンドウンして溶液を収集し、氷上保存する。

マスターミックスはfirst-strand 合成に必要なRNA テンプレート以外の全ての成分を含んでいます。1 サンプル以上の逆転写反応を行う際は、実験数に必要な量の10%増しでマスターミックスを調製して下さい。

注：本プロトコールは50 ng から2  $\mu$ g のRNA 用です。RNA 2  $\mu$ g 以上のRNA を使用する際は、反応溶液をRNA 量に比例してスケールアップして下さい。スケールアップのファクターは、全RNA 量（rRNA、mRNA、ウイルスRNA およびキャリアRNA）からのみ計算して下さい。使用されたプライマーおよび合成されたcDNA には影響されません。例えば、RNA 4  $\mu$ g をテンプレートとして使用する場合には全ての溶液を2倍にし、最終容量は40  $\mu$ lになります。

4. 多数の逆転写反応をセットアップする場合は、マスターミックスを各チューブに分注し、氷上に保存する。
5. マスターミックスを含む各チューブにテンプレートを添加する。ボルテックスで数秒（5秒以下）静かにミックス後、スピンドウンして溶液を収集する。
6. 37°Cで60分間インキュベートする。
7. PCRあるいは酵素反応のアプリケーションによる短いcDNA 解析用には、Omniscrypt Reverse Transcriptase を93°Cで5分間加熱後、氷上で冷却し不活性化する。

注：分解を受けやすい長いcDNAを解析する際には、Omniscrypt Reverse Transcriptaseの不活性化はお薦めしません。

構成成分	容量／反応	最終濃度
<b>マスターミックス</b>		
10x Buffer RT	2.0 $\mu$ l	1x
dNTP Mix (5 mM 各dNTP)	2.0 $\mu$ l	0.5 mM 各dNTP
Oligo-dT プライマー (10 $\mu$ M) *	2.0 $\mu$ l	1 $\mu$ M*
RNase inhibitor (10 units/ $\mu$ l) †	1.0 $\mu$ l	10 units (20 $\mu$ l 反応液当たり)
Omniscript Reverse Transcriptase	1.0 $\mu$ l	4 units (20 $\mu$ l 反応液当たり)
RNase フリー精製水	変更可	—
<b>テンプレートRNA</b>		
RNA はステップ5で添加	変更可	2 $\mu$ g <sup>‡</sup> まで (20 $\mu$ l 反応液当たり)
<b>最終容量</b>	<b>20.0 <math>\mu</math>l</b>	<b>—</b>

- \* 別売。ヘキサメアプライマーあるいは特殊なプライマーを使用の際は、濃度をそれぞれ至適化すること。  
“実験を始める前の注意事項”を参照。
- † 別売り。10 units/ $\mu$ l 以上の場合は1x Buffer RT (10x Buffer RTを希釈)により希釈すること。
- ‡ この量は、全RNA量 (rRNA、mRNA、ウイルスRNA およびキャリアRNA) のみで、プライマーおよび合成されたcDNAは含まない。

## ガイドライン：RT-PCR

RT-PCRには、two-tube RT-PCRとone-tube RT-PCRの2種類があります。two-tube RT-PCRでは、逆転写反応とPCR反応は2個の別々のチューブで行います。one-tube RT-PCRでは、両方の反応を1個のチューブ内で行い、逆転写反応の完了後、温度を上昇させPCR反応を行います。逆転写反応の影響を受けることなくPCRステップの至適化が可能なので、一般的にはone-tube RT-PCRよりtwo-tube RT-PCRをお勧めします。

two-tube RT-PCRに関しては以下を参照してください。one-tube RT-PCR用にはQIAGENのSensiscript Reverse Transcriptase (Sensiscript Reverse Transcriptase Handbookを参照)をご使用下さい。

### Omniscript Reverse Transcriptase を用いたtwo-tube RT-PCR 用ガイドライン

1. **Omniscript Reverse Transcriptase** で2～4ページのプロトコールに従い逆転写反応を行う。

注：本プロトコールは50 ng から2 µg のRNA用です。RNA 2 µg以上のRNAを使用する際は、反応溶液をRNA量に比例してスケールアップして下さい。スケールアップのファクターは、全RNA量 (rRNA、mRNA、ウイルスRNA およびキャリアRNA) からのみ計算して下さい。使用されたプライマーおよび合成されたcDNAには影響されません。50 ng以下のRNAでは、微量のRNA用に特別に開発されたQIAGENのSensiscript Reverse Transcriptaseを使用することをお勧めします。

2. **PCR ミックスに逆転写反応溶液の一部を添加する。**

注：逆転写反応液の添加量はPCR最終反応液の1/5を超えないこと。例えば、50 µlのPCR反応には逆転写反応液の添加量は10 µl以下にします。

3. **Taq DNA polymerase** を用いてサプライヤーのプロトコールに従いPCRを行う。

QIAGENのTaq DNA PolymeraseおよびHotStarTag™ DNA Polymeraseを用いれば常に素晴らしい実験結果が得られます。Handbookの“ordering information” (22、23ページ) をご覧下さい。

### cDNA の合成量が少ない、または皆無

- |                                   |  |
|-----------------------------------|--|
| a) 反応液のセットアップ法                    | 反応液のセットアップは氷上で行う。  |
| b) 反応温度                           | 逆転写反応は37℃で行う。インキュベーターあるいはヒーティングブロックの温度をチェックする。まれではあるが、複雑な二次構造を持つRNAの解析には温度を42℃あるいは50℃に上昇させたほうが良い場合がある。しかし、42℃以上ではOminiscript Reverse Transcriptaseの活性が低下するので、一般的なテンプレートを使用した際には、cDNAの収量および長さに影響を及ぼす。   |
| c) ピペッティングエラー、<br>または試薬の入れ忘れ      | セットアップに用いたピペットのチェック。解凍後全ての試薬を良く混ぜ、即氷上に保存し、もう一度逆転写反応を行う。  |
| d) RNA テンプレートの品質が悪い、<br>または定量の間違い | RNA テンプレートの濃度、純度、分解度のチェック (“Appendix B: Storage, Quantitation, and Determination of Quality of RNA”, Handbook の18 ページ) を参照。RNA テンプレートの解凍後、良く混ぜ、RNase inhibitor を反応液に添加 (最終濃度 : 0.5 U/μl)。特に少量のRNA を用いた場合は、微量の RNase が cDNA 合成の長さおよびRT-PCR の感度に影響する。  |
| e) RNA 濃度が高すぎる、<br>または低すぎる        | Ominiscript Reverse Transcriptase は50 ng から 2 μg の RNA に使用のこと。このRNA量は反応液中の全RNAで、rRNA、mRNA、ウイルスRNA およびキャリアRNAを含む。使用したプライマー量や合成されたcDNA量には無関係である。2 μg以上のRNAを使用する際は、反応溶液をスケールアップする。50 ng以下のRNAでは、微量のRNA用に特別に開発されたQIAGEN Sensiscript Reverse Transcriptaseを使用することを推奨。Handbook 22 ページの “ordering information” を参照。 |

Trademark に関しては英語版Handbookを参照して下さい。

©2001 QIAGEN, all rights reserved. 2300234 01/2001

- f) ヌクレオチド濃度が不正確、またはヌクレオチドが分解  
キットに添付されているdNTP Mixを使用すること。ヌクレオチド濃度の違いによりcDNA合成量は低下する。室温での保存によりヌクレオチドの分解が起こり得る。
- g) 変性条件が不正確  
RNAとプライマーのミックスを変性する必要は通常ないが、テンプレートの変性によってより効果的にプライミングする場合もある。その際には、RNAをRNaseフリー精製水（キットに添付）中で変性する。高温（>65℃）あるいは長時間（>5 min）の変性によりRNAが分解されcDNAが短くなり得る。
- h) プライマー濃度が不正確、またはプライマーが分解  
逆転写反応に用いたプライマーの濃度および分解度をチェック。必要な場合は異なるプライマー濃度、あるいは異なるプライマーで逆転写反応を行う。
- i) 短いインキュベーション時間  
通常、逆転写反応のインキュベーション時間は60分である。非常に複雑な二次構造を持つRNAの解析には、インキュベーション時間を2時間まで延長したほうが良い場合もある。

#### 短いcDNA産物

- a) 様々な原因  
“cDNAの合成量が少ない、または皆無”（6ページ）の項の(c)～(i)を参照。
- b) 高すぎるインキュベーション温度  
逆転写反応は37℃で行うこと。高い温度によりcDNA産物が短くなることがある。インキュベーターあるいはヒーティングブロックの温度をチェックする。
- c) 逆転写酵素の不活性化  
長いcDNAを解析する際には、DNAが分解されることがあるのでOmniscrypt Reverse Transcriptaseの熱による不活性化は行わない方がよい。Reverse transcriptaseの不活性化なしにfirst-strand cDNA合成を行う。

株式会社 キアゲン

〒104-0054 東京都中央区勝どき3-13-1 Forefront Tower II

Tel: 03-6890-7300 Fax: 03-5547-0818

E-mail: [techservice-jp@qiagen.com](mailto:techservice-jp@qiagen.com)

[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)

