

Sensiscript™ Reverse Transcriptase

プロトコールとトラブルシューティング

50 ng 以下のRNA を用いたFirst-strand cDNA 合成

Two-tube RT-PCR

One-tube RT-PCR 用

Sensiscript Reverse Transcriptase

目次	ページ
50 ng 以下のRNA を用いた逆転写反応用Sensiscript プロトコール	2
ガイドライン：Two-Tube RT-PCR	5
ガイドライン：One-Tube RT-PCR	5
トラブルシューティング	7

March 2001

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

www.qiagen.com



50 ng 以下の RNA を用いた逆転写反应用 Sensiscript™ プロトコール

本プロトコールは 50 ng 以下の RNA と QIAGEN の逆転写酵素、Sensiscript™ 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。Sensiscript Reverse は微量の RNA を用いた逆転写反应用到に特別に開発された酵素です。50 ng 以上の RNA には、QIAGEN の Omniscript™ Reverse Transcriptase の使用をお勧めします。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 量には関与しません。

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) をまずお読み下さい。
- 本プロトコールは、50 ng 以下の 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 量には関与しません。50 ng 以上の RNA を使用する際は、QIAGEN の Omniscript Reverse Transcriptase により最高の結果が得られます。
- 反応液のセットアップは、RNA の分解および不完全な 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、本反応の前に 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は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。
- 逆転写反応に続いて PCR (Two-tube RT-PCR) を行う際には、5 ページの “ガイドライン : Two-Tube 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 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ため、デイ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、10x Buffer RT、dNTP Mix およびRNase フリー精製水は室温で解凍後、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) 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) で最終濃度 10 units/ μ l に希釈する。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。

市販のRNase inhibitor の濃度は、通常40 units/ μ l ですが、希釈によりステップ3でのマスターミックス調製の際、ピペetting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間 (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。一回以上逆転写反応を行う際は、実験数に必要な量の10%増してマスターミックスを調製して下さい。

注：RT-PCR を行う場合には 5 ページの“ガイドライン：Two-Tube RT-PCR”を参照して下さい。

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。

注：本プロトコールは50 ng 以下のRNA 使用量に最適化されています。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 を含むものです。使用したプライマー量や合成されたcDNA 量には無関係です。

6. 37℃で60分間インキュベートする。
7. PCRあるいは酵素反応アプリケーションによる短いcDNA 解析用には、Sensiscript Reverse Transcriptase を93℃で5分間加熱後、氷上で冷却し不活性化する。

注：分解しやすい長いcDNA を解析する際には、Sensiscript 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
マスターミックス		
10x Buffer RT	2.0 μ l	1x
dNTP Mix (5 mM 各dNTP)	2.0 μ l	0.5 mM各dNTP
Oligo-dT primer (10 μ M)*	2.0 μ l	1 μ M*
RNase inhibitor (10 units/ μ l) [†]	1.0 μ l	10 units (反応液当たり)
Sensiscript Reverse Transcriptase	1.0 μ l	
RNase フリー水	変更可	—
テンプレートRNA		
テンプレートRNA はステップ5 で添加	変更可	50 ng [‡] まで (反応液当たり)
最終容量	20.0 μl	—

* 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" (2 ページ) を参照。

[†] 別売。10 units/ μ 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：Two-Tube RT-PCR

Two-tube RT-PCR では逆転写反応によりまず cDNA を合成し、その反応液の 1 部を PCR に用います。逆転写反応の影響を受けることなく PCR ステップが至適化できるので、一般的には One-tube RT-PCR より Two-tube RT-PCR をお勧めします。

1. **Sensiscript Reverse Transcriptase と 50 ng RNA を用い 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 以下の RNA 使用量に最適化されています。ここで指定の RNA 量は反応液中の全 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や合成された cDNA 量は関与しません。50 ng 以上の RNA では、QIAGEN の Ominiscript 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分を添加する。**

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 μ l の PCR 反応には逆転写反応液の添加量は 10 μ l 以下にして下さい。

3. **サプライヤーが薦める Taq DNA polymerase を用いて PCR を行う。**

QIAGEN の Taq DNA Polymerase および PCR Buffer 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 ページ) をご覧下さい。

ガイドライン：One-Tube RT-PCR

One-tube RT-PCR では逆転写反応および PCR 反応を同一チューブ内で行います。セットアップの際に Taq DNA polymerase および全てのプライマー試薬を添加します。cDNA は 37 °C で逆転写反応において合成されますが、その反応液中の Taq DNA polymerase はほとんど不活性です。逆転写反応終了後、温度を上昇することにより逆転写酵素は不活性化され、cDNA は Taq DNA polymerase により増幅されます。

逆転写反応と PCR 反応は同一チューブ中で行われるので、各々の反応の至適化は不可能です。ある種の PCR バッファーにより逆転写反応の効率が下がることもあるので、通常は Two-tube RT-PCR をお勧めします。しかし、One-tube RT-PCR を行う必要がある場合のために以下にガイドラインを記述します。

1. **One-tube RT-PCR には 200 ng 以下のトータル RNA を使用することを推奨。6 ページの表に従って反応液をセットアップする。**

注：本プロトコールは 200 ng 以下の RNA 使用量に最適化されています。ここで指定の RNA 量は反応液中の全 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や合成された cDNA 量には関与しません。

構成成分	最終濃度
マスターミックス	
10x PCR buffer*	1x
MgCl ₂ *	必要な際は2 mM
dNTP mix*	0.4 mM 各dNTP
Primer †	0.1 ~0.5 μM 各
Taq DNA polymerase	2.5 units (1 反応当たり)
Sensiscript Reverse Transcriptase	1.0 μl (1 反応当たり)
RNase フリー水	—
テンプレートRNA	<200 ng ‡ (1 反応当たり)
最終容量	25 ~50 μl (1 反応当たり)

* PCR 試薬は別売り。多くのPCR バッファーにはMgCl₂が含まれていることに注意。使用のPCR バッファーでのMg²⁺濃度をチェック。必要な場合は最終濃度が2 mMになるようMgCl₂を添加。

† 一般的にはOne-tube RT-PCRには遺伝子特異的なプライマーを使用するが、oligo-dT primer (最終濃度0.1 μMまで)も添加可能。

‡ 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、使用したプライマーおよび合成されたcDNAは含まない。

2. 37℃、60分間のインキュベーションにより逆転写反応を行う。

3. 続いて即PCR用のサイクリングプログラムを開始。

注：ステップ2および3は、殆どのサーマルサイクラーで一つのプログラムに組み込める。サーマルサイクラーのプログラミングは、メーカーの指示に従って行う。

トラブルシューティング

コメントおよび対処法

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こと。
- b) 反応温度 逆転写反応は37℃で行うこと。インキュベーターあるいはヒートイ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℃まで上昇させたほうが良い場合がある。しかし42℃以上ではSensiscript 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場合にはcDNAの収量および長さに影響を及ぼす。
- c) ピペティングエラー、
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、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 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 Sensiscript Reverse Transcriptaseは50 ng以下のRNAに使用のこと。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。50 ng以上のRNAでは、QIAGEN Omniscript Reverse Transcriptaseを使用することを推奨。Handbook 22ページの“Ordering Information”を参照。
- f) ヌクレオチド濃度が不正確
あるい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える。

- 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 °C) あるいは長時間 (>5 min) の変性により RNA が分解され cDNA が短くなりえる。
- 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” (7 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 °C 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 DNA が分解されやすい長い cDNA を解析する際には、Sensiscript Reverse Transcriptase の不活性化を行わない方がよい。reverse transcriptase の不活性化なしに first-strand cDNA 合成を行う。

Trademark に関しては英語版 Handbook を参照して下さい。

© 2001 QIAGEN, all rights reserved. 2300235 03/2001