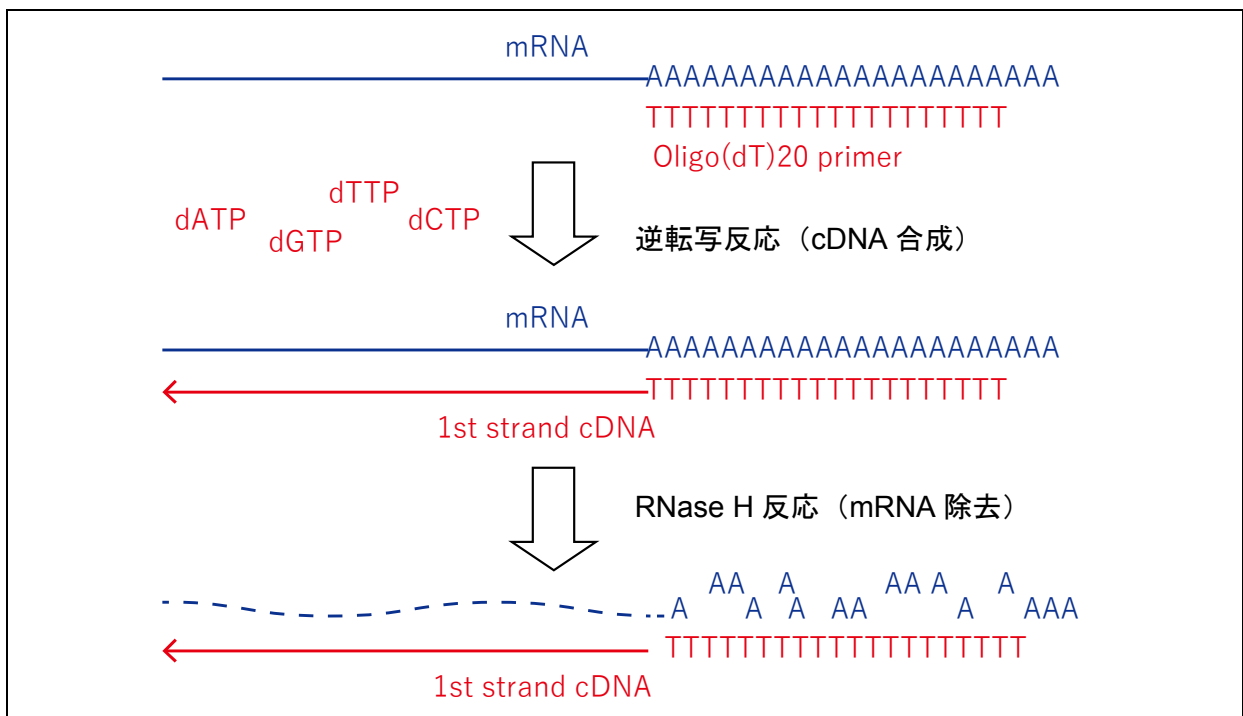


1st strand cDNA 合成キット

GeneAce cDNA Synthesis Kit

マニュアル (第1版)

Code No. 319-08881



Oligo (dT)20 primer と RNase H を使用する場合の反応イメージ図

NIPPON GENE CO., LTD.

I 製品説明

GeneAce cDNA Synthesis Kit は、GeneAce Reverse Transcriptase を用いて RNA を鋳型に 1st strand cDNA を合成するためのキットです。

GeneAce Reverse Transcriptase は RNase H 活性を欠損させた M-MLV 由来の改変型逆転写酵素で、効率よく長鎖 cDNA を合成することができます。

II キット内容

本キットには、1 反応あたり 20 μ l の容量で cDNA 合成反応（逆転写反応）を 50 回行える試薬が含まれています。

| キット構成成分 | 容量（50 回用） | 保存温度 | 備考 |
|---------------------------------|------------------|-------|--------------------|
| GeneAce Reverse Transcriptase | 50 μ l × 1 本 | -20°C | 200 units/ μ l |
| 5×RT Buffer | 1 ml × 1 本 | -20°C | |
| 10 mM dNTP Mixture | 50 μ l × 1 本 | -20°C | |
| RNase Inhibitor | 50 μ l × 1 本 | -20°C | 40 units/ μ l |
| RNase H | 50 μ l × 1 本 | -20°C | |
| Oligo(dT)20 primer (50 μ M) | 50 μ l × 1 本 | -20°C | 5'-(dT)20-3' |
| Random hexamers (50 μ M) | 50 μ l × 1 本 | -20°C | 5'-(dN)6-3' |
| ddWater (RNase free) | 1 ml × 2 本 | -20°C | |

【関連製品】

| | |
|----------|--|
| 単品販売 | <ul style="list-style-type: none">GeneAce Reverse Transcriptase (Code No. 316-08151, 312-08153)RNase Inhibitor (Code No. 315-08121) |
| RNA 抽出試薬 | <ul style="list-style-type: none">ISOGEN II (Code No. 317-07361) 一液タイプISOSPIN Cell & Tissue RNA (Code No. 314-08211) スピンカラム精製ISOSPIN Plant RNA (Code No. 310-08171) 植物組織からの RNA 抽出 |

III 使用上の注意

- 本キットは、試験研究用試薬ですので、医薬品、その他の目的にはご使用になれません。
- 試薬についての基本的な知識のある方以外は取り扱いしないで下さい。
- 本キットの取扱いは、マニュアル記載内容通りに行ってください。
- マニュアル記載内容と異なった取り扱いによるトラブルにつきましては、弊社では責任を負いかねます。

IV プロトコール

<キット以外に必要なもの>

- ・ マイクロピペット
- ・ ピペットチップ
- ・ 1.5 ml マイクロチューブまたは PCR チューブ
- ・ 卓上低速遠心機
- ・ 恒温槽 (ヒートブロックまたはサーマルサイクラー)
- ・ 氷
- ・ 鋳型 RNA (total RNA, poly A⁺ RNA)

(注意) RNA を調製する際には、RNA が分解しないように RNase フリーの溶液や容器を使用して下さい。また、ゲノム DNA が混入しないようご注意ください。

1) 逆転写酵素反応 (1st strand cDNA 合成)

(注意) 使用時は、キットから酵素と RNase Inhibitor 以外の試薬を取り出して融解後、タッピング等で混合してから卓上遠心機等で軽く遠心して下さい。酵素の GeneAce Reverse Transcriptase と RNase Inhibitor は使用する直前に取り出して下さい。

調製液

| | |
|------------------------------------|----------------|
| 鋳型 RNA ^{*1)} | X μ l |
| 10 mM dNTP Mixture | 1 μ l |
| Primer (50 μ M) ^{*2)} | 1 μ l |
| ddWater (RNase free) | (12-X) μ l |
| Total | 14 μ l |

↓
65°C 5 分間 (RNA の熱変性)
氷中で急冷 1 分間

| | |
|-------------------------------|------------|
| 調製液 (RNA, dNTP, Primer) | 14 μ l |
| 5 × RT Buffer | 4 μ l |
| RNase Inhibitor | 1 μ l |
| GeneAce Reverse Transcriptase | 1 μ l |
| Total ^{*3)} | 20 μ l |

↓
30°C 10 分間 (Random hexamers 使用時のみ) ^{*4)}
42°C 30~60 分間 (cDNA 合成反応)
70°C 15 分間 (反応停止)

↓
1st strand cDNA ^{*5), *7)}

*1) 1 反応あたりの鋳型 RNA 量 :
total RNA 5 μ g 以下
poly A⁺ RNA 1 μ g 以下

*2) Oligo(dT)20 primer または
Random hexamers を使用する。

*3) ピペッティングで穏やかに混合する。

*4) Random hexamers は鎖長が短いため、最初は低温でアニーリングと伸長反応を行う。

*5) 合成した cDNA はそのまま PCR の鋳型に使用できる。cDNA をすぐに使用しない場合は、-20°Cにて保存する。

2) RNase H 反応（鋳型 RNA の除去）

本反応は、1st strand cDNA を鋳型にした PCR の増幅効率が悪い場合に行います。

RNase H は、DNA と RNA が二本鎖を形成した DNA/RNA ハイブリッドの RNA 鎖のみを特異的に分解する酵素です。

本キットの GeneAce Reverse Transcriptase は RNase H 活性を欠損させた改変型逆転写酵素のため、合成した 1st strand cDNA は鋳型の RNA とハイブリッド鎖（ヘテロ二本鎖）を形成しています。合成した cDNA は PCR の熱変性ステップで一本鎖になるため、そのまま PCR の鋳型に使用できますが、DNA-RNA ヘテロ二本鎖は DNA 二本鎖よりも安定なため、PCR を行う前に RNase H で RNA を分解することで PCR 効率が向上することがあります。

| | |
|-----------------|------------|
| 1st strand cDNA | 20 μ l |
| RNase H | 1 μ l |
| <hr/> | |
| Total | 21 μ l |

↓
37°C 15 分間（鋳型 RNA の除去）
↓
1st strand cDNA ^{*6), *7)}

*6) インキュベート後の cDNA はそのまま PCR の鋳型に使用できる。cDNA をすぐに使用しない場合は、-20°Cにて保存する。

*7) PCR への持ち込みは PCR 溶液の 1/10 量を超えないようにする。多量の持ち込みは PCR を阻害する。

マニュアル記載内容や製品仕様、価格に関しては予告なしに変更する場合があります。

| お問い合わせ先 | |
|-----------------------------------|---|
| 株式会社ニッポンジーン 研究試薬部 学術営業課 | |
| TEL | 076 - 451 - 6548 |
| URL | https://www.nippongene.com/siyaku/ |
| お問い合わせは、お電話もしくはWEB フォームより承っております。 | |