

cDNA合成時の反応前サンプルの氷上放置による反応阻害効果の比較

No. RT_008

カテゴリ: cDNA合成

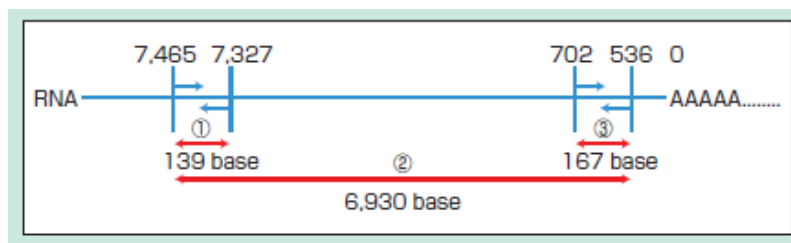
キーワード: cDNA合成、Library作製、逆転写反応、完全長cDNA

データソース: タカラバイオ株式会社

方法: 各種逆転写酵素のミスプライミングに起因する非特異的伸長産物量と、それがpolyAからの完全長cDNA合成に及ぼす影響を、Oligo dTプライマーを用いて以下の方法で調べました。

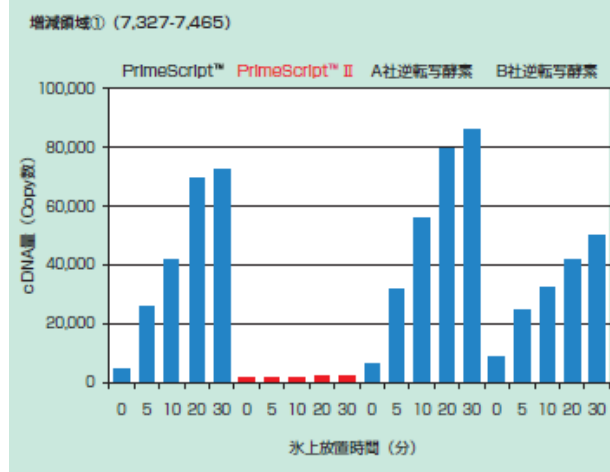
Human heart total RNA 1 µgを鋳型に、各種逆転写酵素でOligo dTプライマーを用いてcDNAを合成するための反応液を氷上調製後0~30分間氷上放置し、逆転写反応を行わず熱失活した後、Dystrophin遺伝子のpolyAから7,327塩基離れた139塩基(領域①)のcDNA量をリアルタイムPCRにて定量した。

また、氷上放置サンプルから定法に従い、逆転写反応を行った後熱失活し、Dystrophin遺伝子のpolyAの近傍から6,930塩基(領域②)の長鎖のcDNA量をリアルタイムPCRにて定量した。

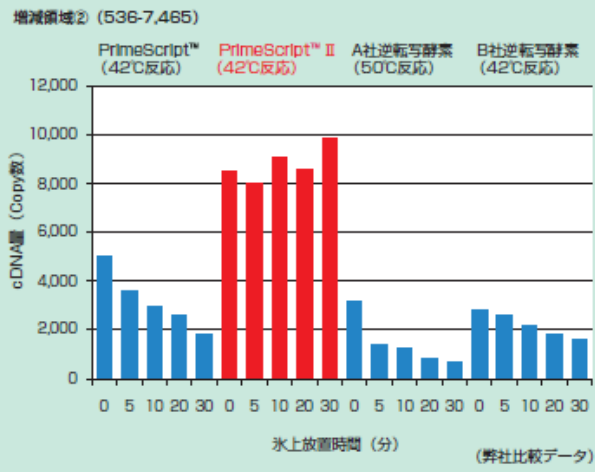


結果: PrimeScript™ RTase (製品コード 2680A)とA社およびB社逆転写酵素は、反応液の氷上放置時間が長くなるとともにpolyA以外からの非特異的伸長産物が増加し(A)、その後の逆転写反応によるpolyAからの長鎖伸長産物量は逆に減少しました(B)。この結果から氷上放置によるバックグラウンド生成に伴い長鎖cDNA合成が阻害されたものと推察されます。一方、PrimeScript™ II RTase (製品コード 2690A)においては、反応液の氷上放置時間が長くなってもpolyA以外からの非特異的伸長産物は増加せず(A)、その後の逆転写反応によるpolyAからの長鎖cDNA合成の阻害も全く見られませんでした(B)。

(A) 逆転写反応液調製後の氷上放置により生じるバックグラウンド (polyA以外からの短鎖cDNA合成産物量)



(B) 逆転写反応液調製～氷上放置後の逆転写反応による polyA からの長鎖cDNA合成産物量



以上の結果から、PrimeScript™ II RTaseを用いることで、polyAからのcDNA合成において極めてバックグラウンドが少なく完全長の割合が高い高品質のcDNAの取得が期待できます。

関連製品

PrimeScript™ 1st strand cDNA Synthesis Kit (製品コード 6110A)

PrimeScript™ II 1st strand cDNA Synthesis Kit (製品コード 6210A)