



Application

Neuro2a細胞（マウス由来Neuroblastoma）を用いたRNA精製の検討（リアルタイムqPCRによる確認）

製品名

FastGene™ RNA Basic Kit (FG-80050, FG-80250)

メーカー名

日本ジェネティクス株式会社

下記のデータは、国立研究開発法人 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 疾病研究第五部様のご厚意により、掲載させていただきます。

方法

マウス由来のNeuroblastoma Neuro2a細胞を6つに分け（1チューブあたり1,000,000 cells）、それぞれ3つずつからQ社キットとFastGene™ RNA BasicキットによるRNA精製を行った。
RNA 1μgをTOYOBO社のReverTra Aceを用いて20μLの反応系で逆転写した。逆転写反応サンプルをMQ水で20倍希釈し、1μLをqPCR に供した。
qPCR反応にはTOYOBO社のTHUNDERBIRD SYBR qPCR Mixを用い、actinおよびGeneAを目的遺伝子としてApplied Biosystems社 7300 Real-Time PCR Systemで増幅、測定した。

条件

1. RNA精製

サンプルの種類 : Neuro2a細胞（マウス由来Neuroblastoma）
サンプル量 : 1.0×10⁶ cells / prep
RNA精製キット : ①Q社キット、②FastGene™ RNA Basic Kit (各n=3)
DNase I 処理 : ①、②とも未実施
RNA溶出バッファ量 : ①、②とも30μL

2. 逆転写反応

インプットRNA量 : 1μg (1反応20μLあたり)
逆転写酵素 : ReverTra Ace (TOYOBO社)

反応組成:

total RNA	1μg
Random Primers (25 pmoles/μl)	1μl
5×Buffer	4μl
10mM dNTPs	2μl
ReverTra AceR (100units/μl)	1μl
(Total Volume)	20μl)

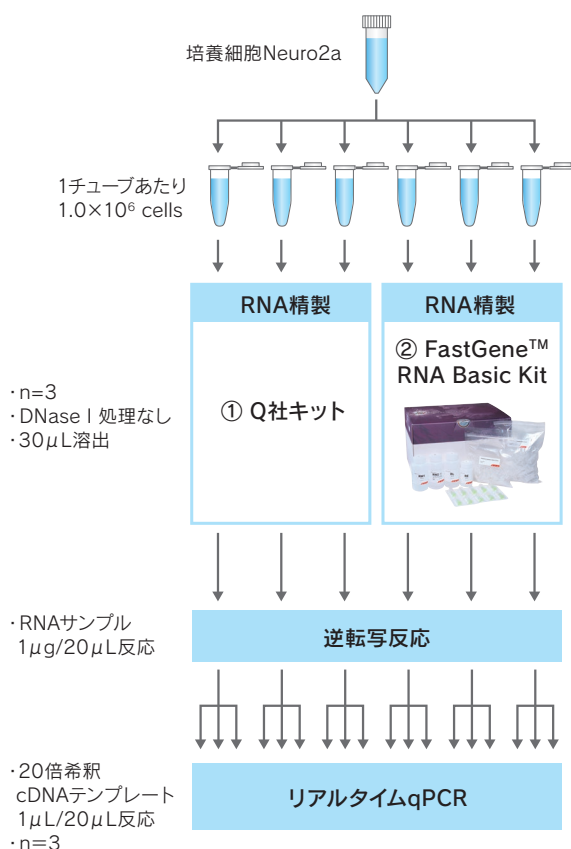
反応プログラム:

アニーリング	30℃・10min
↓	
酵素反応	42℃・30min
↓	
変性	99℃・5min

3. リアルタイムqPCR

インプットcDNA量 : 20倍希釈した逆転写反応液1μL (1反応 20μLあたり)
qPCR試薬 : THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO社)
qPCR装置 : Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System

【検討方法ワークフロー】



結果

収量と純度

RNA sample		yield		purity	
		(μg)	Mean (μg)	A260/280	A260/230
Q社	1	17.6625	18.7547	2.05	2.31
	2	18.4535		2.05	2.47
	3	20.1480		2.04	2.50
FastGene™	1	18.9745	19.8202	2.08	2.33
	2	21.4340		2.06	2.49
	3	19.0520		2.07	2.42

NanoDrop
(Thermo Scientific™ 社) にて測定

Q社キットとの比較において、収量、純度ともほとんど差はない。



qPCR結果 1: actin

Sample	Ct	Mean	Mean Ct	StdDev Ct	P value
Q 社	1	16.1606	16.1369	16.3551	0.29728
		16.2475			
		16.0027			
	2	16.2128	16.2347		
		16.3102			
		16.1810			
	3	16.7193	16.6937		
		16.5803			
		16.7815			
FastGene™	1	15.9163	15.8943	15.8970	0.05795
		15.8641			
		15.9024			
	2	15.9028	15.9563		
		15.8711			
		16.0950			
	3	15.9139	15.8405		
		15.8597			
		15.7479			

qPCR結果 2: Gene A

Sample	Ct	Mean	Mean Ct	StdDev Ct	P value
Q 社	1	21.7528	21.7298	21.9913	0.34464
		21.5308			
		21.9058			
	2	22.3860	22.3819		
		22.5230			
		22.2366			
	3	21.5057	21.8623		
		22.2444			
		21.8369			
FastGene™	1	21.4406	21.4551	21.5940	0.13235
		21.5040			
		21.4208			
	2	21.2879	21.6081		
		21.8181			
		21.7182			
	3	21.9397	21.7187		
		21.5256			
		21.6908			

Q社キットとの比較において、qPCRの結果もほとんど差がない ($P > 0.05$)。



お客様のコメント

Q社製品をこれまで用いてきたが、FastGene™ RNABasicキットは操作性も良く、また収量、純度も遜色ない結果が得られた。