



Application

FastGene™ RNA Premium Kitによる培養細胞からのRNA抽出事例

(補足：FastGene™ RNA mini-elute columnを用いたクリーンナップ)

製品名

FastGene™ RNA Premium Kit (FG-81050, FG-81250)

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、国内のお客様のご厚意により掲載させて頂きました。

本アプリケーションノートのポイント (日本ジェネティクス株式会社)

FastGene™ RNA Kitは「高品質を低価格で」をコンセプトとしたシリカメンブレン法によるRNA精製キットです。FastGene™ RNA Premium kit ではDNase 処理を溶出後に実施することにより、ゲノムDNA 除去効率の向上・安定を図りました。

本アプリケーションノートでは、FastGene™ RNA Premium Kitをご使用いただいた事例をご紹介します。

ポイント

- FastGene RNA Kitの使用事例 (培養細胞からのRNA 抽出)
- 溶出後のDNase 処理によるゲノムDNA 除去

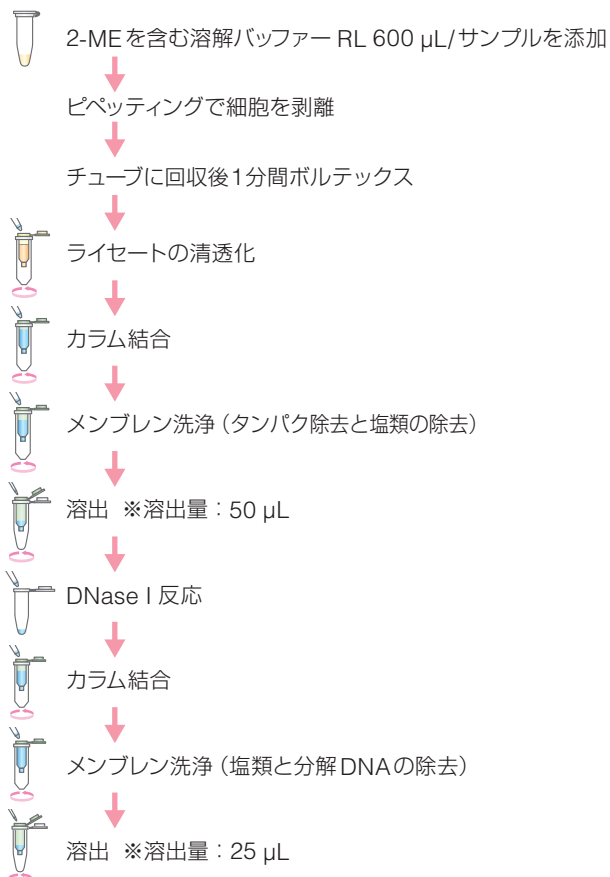


RNA精製からリアルタイムPCRまでのワークフロー

サンプル準備

↓ マウス初代培養肝細胞 1×10⁶ cell

RNA抽出



逆転写

試薬：PrimeScript™ RT Master Mix (Perfect Real Time) (Takara)

- 反応組成

5 x PrimeScript RT Master Mix	2 µL
total RNA	500 ng 程度
RNase Free dH ₂ O	up to 10 µL
Total volume	10 µL

- 反応プログラム

37 °C · 15 min (逆転写反応)

↓

85 °C · 5 sec (熱失活)

↓

4 °C · ホールド

リアルタイムPCR ——— 結果2

試薬：KAPA SYBR Fast qPCRキット (Universal qPCRキット) (KAPABIOSYSTEMS)

機器：Thermal Cycler Dice Real Time System II (Takara)

- 反応組成

KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2X)	10 µL
10 µM forward primer	0.4 µL
10 µM reverse primer	0.4 µL
Template DNA	10 ng 相当
PCR-grade water	up to 20 µL
Total volume	20 µL

- 反応プログラム

95 °C · 3 min (初期変性)

↓

95 °C · 2 sec (変性)

↓

60 °C · 30 sec (アニーリング/伸長反応)] 40cycles

収量・純度測定 ——— 結果1

測定機器：SimpliNano (GE)

結果

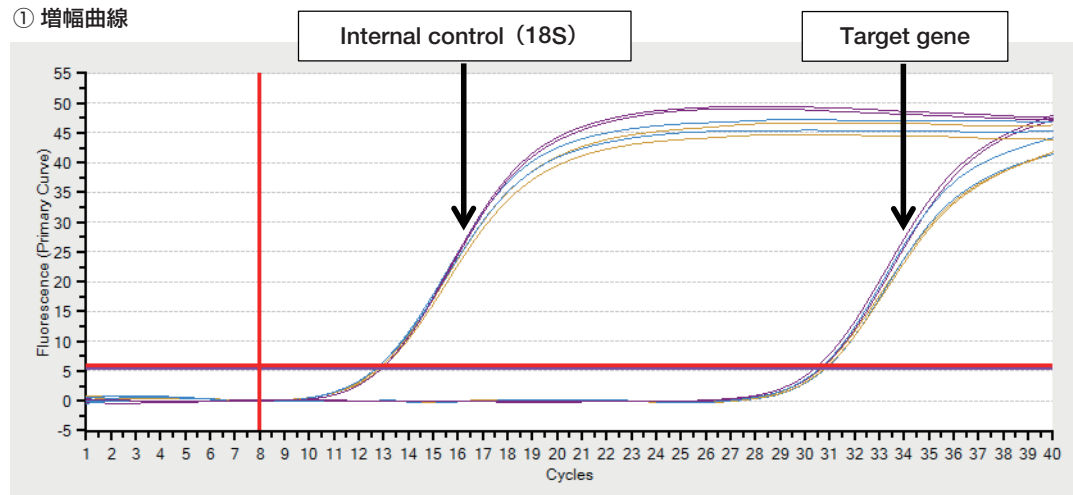
結果1. 収量・純度測定

SampleNo.	Conc. (ng/μL)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	SampleNo.	Conc. (ng/μL)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
1	59.2	2.0	1.9	13	48.9	2.0	1.8
2	33.2	2.0	2.0	14	45.6	2.0	1.8
3	42.3	2.0	1.9	15	20.5	1.9	1.5
4	41.8	2.0	1.8	16	55.7	2.0	1.7
5	43.4	1.9	1.7	17	41.5	2.0	1.7
6	53.3	2.0	1.8	18	32.0	2.0	1.7
7	59.6	2.0	1.7	19	27.6	1.9	1.5
8	54.5	2.0	1.9	20	36.7	2.0	1.9
9	47.0	2.0	1.9	21	29.1	1.9	1.4
10	43.5	2.0	1.9	22	19.5	2.0	1.8
11	50.0	2.0	1.9	23	58.9	2.0	2.0
12	63.3	2.0	2.0				

結果2. リアルタイムPCR

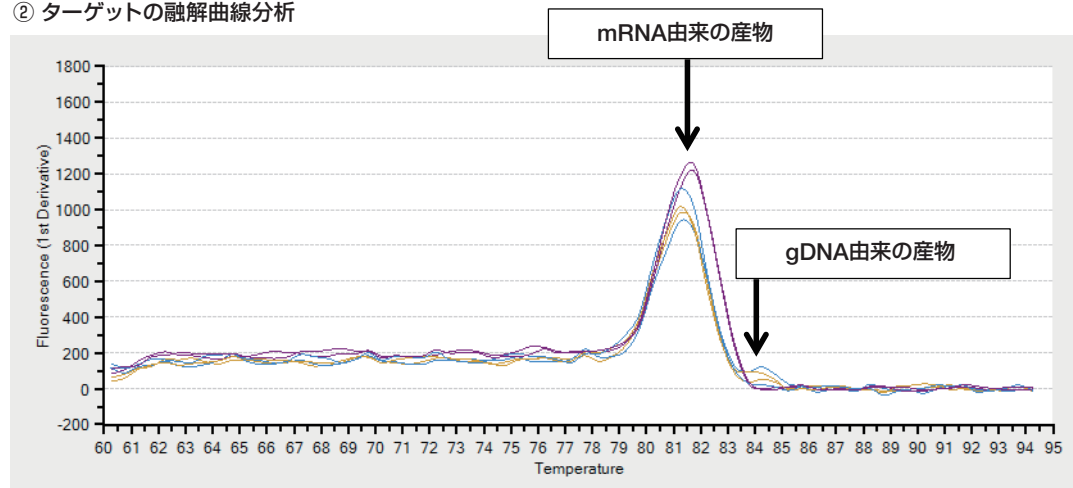
※上記の収量・純度測定の結果のうち、代表的なサンプルの結果を示した。

① 増幅曲線



FastGene™ RNA Premium Kitで抽出したRNAからcDNAを作製し、リアルタイムPCRを行った Internal control (18S ribosomal RNA) とTarget geneともに良好な増幅が認められた

② ターゲットの融解曲線分析



融解曲線分析で、mRNA由来産物の特異的な増幅を確認できた
FastGene™ RNA Premium Kitによって、gDNAを効果的に除去できたと考えられる

補足

◎TRIzol で抽出したRNAのFastGene™ RNA mini-elute columnによるクリーンアップ

●手順

TRIzolを用いて細胞からRNAを抽出 — 補足結果 (1)

↓
DNase (Promega) でゲノムDNA除去

↓
TRIzolでDNaseの失活及びRNA再抽出 (H₂O 約50 μLによる溶解) — 補足結果 (2)

↓
FastGene™ RNA Premium KitのDNase 処理後の液量 (50 μL) と同量になるようにH₂Oを添加

↓
FastGene™ RNA mini-elute columnを使用したプロトコールによるRNA抽出

↓
吸光度測定 — 補足結果 (3)

●結果

No.	(1) TRIzolで抽出したRNA			(2)(1)のRNA5ugをDNase処理し、TRIzolで精製			(3)(2)をRNA mini-elute columnでクリーンアップ		
	Concentration (ng/μL)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	Concentration (ng/μL)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	Concentration (ng/μL)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
1	381.3	1.7	2.1	165.8	1.6	1.9	114.8	2.0	1.7
2	406.6	1.8	2.0	181.2	1.6	1.9	124.8	2.0	1.8
3	435.5	1.8	2.0	161.3	1.6	1.8	111.3	2.0	1.7
4	429.5	1.8	1.9	162.5	1.6	1.9	104.1	2.0	1.9
5	418.9	1.8	2.0	152.2	1.6	2.0	104.0	2.0	1.8
6	412.0	1.8	2.0	152.7	1.6	2.1	103.3	2.0	1.9
7	268.5	1.7	2.0	119.1	1.7	0.9	80.9	2.0	1.7



お客様のコメント

以前のRNA抽出方法 (フェノール/クロロホルム抽出) では、gDNAのコンタミのため、gDNA由来の産物が増幅されてしまい、困っていました。(遺伝子の構造により、プライマー設計の工夫では回避できない。) そのため、通常の抽出後に別途DNase処理を行い、もう一度フェノール/クロロホルム抽出と濃度測定をしてから逆転写を実施していました。

この方法では、手間と時間がかかっていたのですが、本キットではそれを大幅に低減することができ、非常に助かりました。融解曲線の解析 (結果2-②) でも、gDNA由来の産物は確認されず、結果に大変満足しています。また、一つのキットの中にホモジナイズ、精製、DNase処理がすべて含まれていて、なおかつ安価なのでありがたいです。

Lysisバッファや、DNaseの量にもう少し余剰があると安心です。