



Application

マウス肝臓からの「RNA抽出」および「逆転写反応」に 用いたキットの性能確認

製品カテゴリ

核酸精製・クリーンアップ、逆転写酵素、qPCR試薬

製品/メーカー名

- RNA抽出
High Pure RNA Tissue Kit (50rx) (12033674001) /ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社
FastGene™ RNA Basic Kit (FG-80250) /日本ジェネティクス株式会社
- 逆転写反応
Transcriptor ユニバーサル cDNA マスター (05893151001) /ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社
FastGene™ Scriptase II Master Mix (5X) (NE-LS64) /日本ジェネティクス株式会社
FastGene™ Scriptase Basic cDNA Synthesis (NE-LS62) /日本ジェネティクス株式会社
- qPCR
FastStart Essential DNA Green Master Mix (06402712001) /ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社

下記のデータは、国内のお客様からのご厚意により掲載させていただきました。

実験概要

既存のキット (Roche 製品) と同様に FastGene™ の製品 (Scriptase II, Basic) がほぼ同等に使用できるかを検討した。

サンプル：マウスの肝臓を RNAlater (QIAGEN) (76104) に沈めて凍結保存した。



肝臓



RNAlater (QIAGEN) (76104)



凍結保存

2か月程度凍結保存

サンプルの採取
組織を 10mg 弱切り出した

RNA抽出

吸光度測定
Nano Drop™

逆転写反応

qPCR Cq 値測定
(Light Cycler 96)

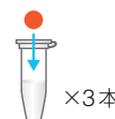
RNA抽出

使用キット2種類

- High Pure RNA Tissue Kit (50rx) (12033674001)
- FastGene™ RNA Basic Kit (FG-80250) + DNase I set (FG-81DN250)
- 「オプション：オンカラム DNase I 処理 を使用」 ⇒ 詳細は次ページ



High Pure RNA Tissue Kit



FastGene™ RNA Basic Kit

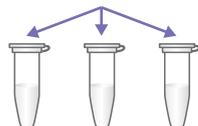
● 組織片 10 mg 弱

逆転写反応

使用キット3種類

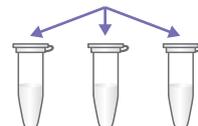
- Transcriptor ユニバーサル cDNA マスター (05893151001)
 - FastGene™ Scriptase II Master Mix (5X) (NE-LS64)
 - FastGene™ Scriptase Basic cDNA Synthesis (NE-LS62)
- それぞれ上記3種のキットにて逆転写反応

High Pure RNA Tissue Kit-RNA



Transcriptor II Basic
Scriptase

FG RNA Basic Kit-RNA



Transcriptor II Basic
Scriptase

qPCR

使用キット1種類

- FastStart Essential DNA Green Master Mix (06402712001)

RNA 抽出キットと逆転写反応キットの組み合わせ表

		逆転写反応		
		Transcriptor Universal cDNA Master	FastGene™ Scriptase II Master Mix	FastGene™ Scriptase Basic
RNA抽出	High Pure RNA Tissue Kit	1 sample	1 sample	1 sample
	FastGene™ RNA Basic Kit + DNase I	1 sample	1 sample	1 sample

qPCRでは、1 sampleごとに3反復を行う。

実験条件

RNA 抽出

High Pure RNA Tissue Kit : High Pure RNA Tissue Kitの取扱説明書の推奨プロトコルに準拠した。

FastGene™ RNA Basic Kit + DNase I set : FastGene™ RNA Basic Kitの取扱説明書 (P12 ~) に記載がある
 『オプション : オンカラムDNase I 処理 (※)』を通常の操作に加えた。
 また、Elution Bufferを100 μLとした (通常は50 μL)。

(※) オンカラム DNase I 処理を加えた洗浄手順 (FastGene™ RNA Basic Kit 取扱説明書より抜粋)

S1 メンブレン洗浄1 (タンパク除去と 反応条件の調整)		300μL バッファー RW1 ≥ 10,000 x g (室温 : 20 ~ 25°C) 30 s カラムを新しいコレクションチューブ (2.0mL) に移す
S2 DNase I 反応 (DNAの分解)		70 μL DNase I 反応溶液 (注 : メンブレンの中央に添加) インキュベート (室温 : 20 ~ 25°C) 10 min
S3 メンブレン洗浄2 (分解DNAと 酵素の除去)		300 μL バッファー RW1 ≥ 10,000 x g (室温 : 20 ~ 25°C) 30 s ろ液廃棄後 カラムを元のコレクションチューブ (2.0 mL) に戻す
S4 メンブレン洗浄3 (塩類の除去)		700 μL of バッファー RW2 ≥ 10,000 x g (室温 : 20 ~ 25°C) 30 s カラムを新しいコレクションチューブ (2.0 mL) に移す

RNA 測定機器

吸光度測定機器 : Nano Drop™

逆転写反応

すべてのキットでそれぞれの取扱説明書の推奨プロトコルに準拠した。

qPCR プログラム

qPCR装置 : Light Cycler 96

Preincubation : 95°C 600 s

↓
 95°C 15 s
 ↓
 60°C 60 s } 45 cycles

↓
 Melting : 95°C 1 s → 57°C 15 s → 98°C 1 s

↓
 Cooling 40°C 30s

結果

● RNA 収量と純度の結果 (吸光度測定 - ナノドロップ)

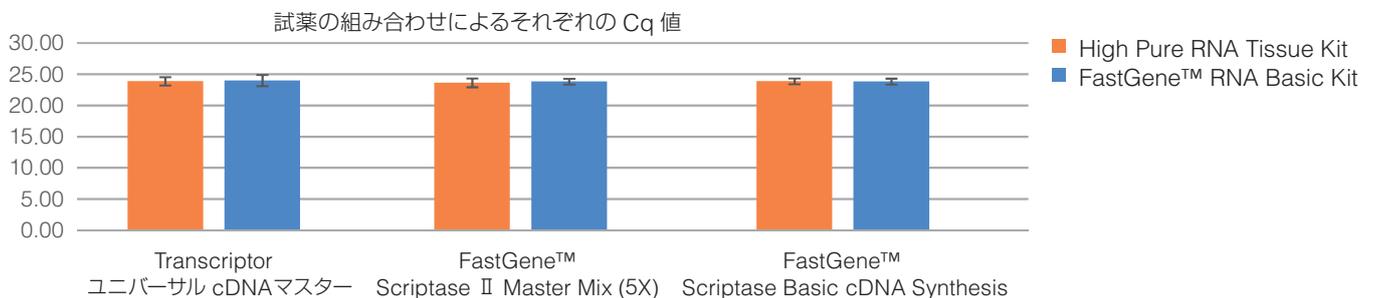
	Sample No.	A230	A260	A280	収量 (ng/μL)	収量平均値
High Pure RNA Tissue Kit	1	4.93	10.10	4.82	403.89	472.46
	2	5.03	9.63	4.61	385.32	
	3	7.87	15.70	7.47	628.16	
FastGene™ RNA Basic Kit + DNaseI	1	5.11	10.52	5.04	420.91	477.36
	2	4.89	9.97	4.77	398.71	
	3	8.44	15.31	7.26	612.46	

試薬間での大きな違いは見受けられず、ほぼ同等の結果が得られました。

● qPCR 結果 (Cq 値の確認)

RNA 抽出	逆転写反応	Cq 値	mean	stdev
High Pure RNA Tissue Kit	Transcriptor ユニバーサル cDNA マスター	24.43	23.89	0.67
		23.14		
		24.09		
	FastGene™ Scriptase II Master Mix (5X)	22.82	23.63	0.70
		24.04		
		24.03		
FastGene™ Scriptase Basic cDNA Synthesis	24.02	23.87	0.46	
	23.36			
	24.24			
FastGene™ RNA Basic Kit	Transcriptor ユニバーサル cDNA マスター	24.83	23.99	0.91
		23.03		
		24.12		
	FastGene™ Scriptase II Master Mix (5X)	23.29	23.83	0.47
		24.09		
		24.11		
FastGene™ Scriptase Basic cDNA Synthesis	24.00	23.84	0.47	
	23.31			
	24.20			

各サンプル (cDNA) に対し、PCRを3反復で行った



試薬間での大きな違いは見受けられず、ほぼ同等の結果が得られました。



お客様のコメント

これまで使用していた製品と比較して遜色ないデータを得ることができ、価格も安価で非常に使いやすいものでした。これからも愛用したいです。

本文中に記載されているTMおよび®は、それぞれ各社の商標、登録商標を表しています。

Copyright(C) NIPPON Genetics Co, Ltd All Rights Reserved. 2019.FEB