



Application

FastGene™ miRNA Enhancer kit と FastGene™ RNA Premium kit または 他社RNA抽出キットを組み合わせ使用した際の比較評価試験

製品名

FastGene™ miRNA Enhancer kit (Cat.No. FG-RNAE-S, FG-RNAE-25)
FastGene™ RNA Premium kit (Cat.No. FG-81006, FG-81050, FG-81250)

メーカー名

FastGene™

下記のデータは、社会医療法人大雄会医科学研究所 菊池 有純 様のご厚意により掲載させて頂きました。

概要

臨床検査室のサンプルは、組織、血液、尿、髄液などの臨床検体が対象であり、PCRにおける反応阻害物質を除去し、解析に必要な十分量を確保する必要があります。遺伝子検査において試料から解析対象となる核酸の抽出は検査の精度を維持する上で極めて重要です。とりわけ、様々な状態が想定される臨床検体において、安定的に試料調整が可能な抽出方法の構築は必須です。

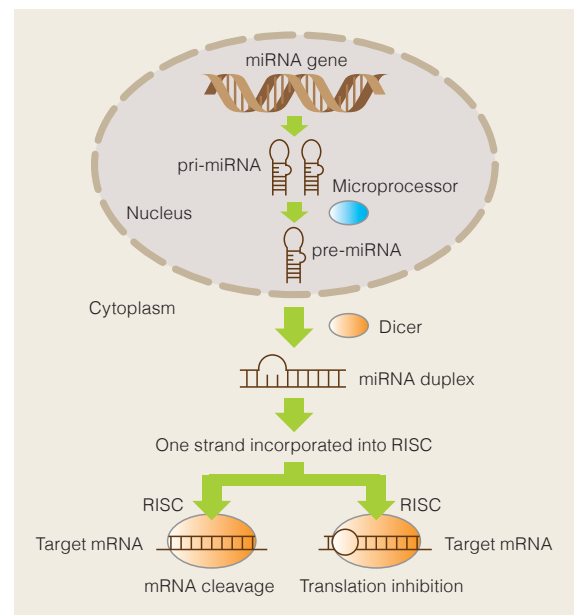
本アプリケーションノートでは、FastGene™ miRNA Enhancer kitとFastGene™ RNA Premium kitまたは他社RNA抽出キットを組み合わせ臨床検体を含む様々なサンプルからmiRNAを抽出し、cDNA合成後リアルタイムPCRによりCp値を評価した一例を報告します。

● miRNAとは

- 約30%のヒト遺伝子がmiRNAによる調節を受けていると予想されている。
- ゲノムから転写後、precursor miRNAがいくつかの酵素類の作用の後に mature miRNAとなる。
- mature miRNAは21～23ntの1本鎖RNAとなりmRNAと相互作用する。
- miRBase Release22 (2018) によると38,589が登録されている。

mRNA発現によりタンパク質が翻訳
↓
miRNAの発現増加により
mRNAからのタンパク質翻訳抑制
↓
タンパク質発現レベルの低下

癌、代謝性疾患、神経疾患や感染症などへの
関与が示唆されている。



Meltzer, P.S. *Nature* 435, 745–746 (2005). 参照

実験条件

対象サンプルと前処理方法

- Cell line (K562)
→ 細胞数 10⁵個に調整したペレットを使用 (n=3)
- human white blood cell (臨床検体)
→ EDTA・2Na抗凝固剤入り採血管を用い、健常者3名より採血した全血500 μLの溶血剤処理後の白血球のペレットを使用 (n=3)
- Formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue sample (臨床検体)
→ 大腸癌患者5例から採取した大腸組織のFFPEサンプル (詳細は*)
- Bovine muscle
→ 組織と等量のPBS (-)を用い、ホモジナイズした溶液10 μL (n=3)

*FFPEの前処理方法の詳細

- 1) 厚さ5 μmのFFPE標本から試料を採取する
- 2) 800 μLキシレンを加える
- 3) 室温で5 min インキュベート
- 4) 400 μL無水エタノールを加える
- 5) 2 min 遠心分離し、上清を廃棄
- 6) 1000 μL無水エタノールを加える
- 7) 2 min 遠心分離し、上清を廃棄
- 8) 56 °Cで20 min インキュベート
- 9) 100 μLの溶解バッファー (10 nmol/L Tris-HCl, 0.1 mmol/L EDTA, 5 g/L SDS)を加える
- 10) 40 μLのproteinase Kを加える
- 11) 56 °Cで30 min インキュベート
- 12) 85 °Cで30 min インキュベート
- 13) 溶解バッファーを加え、全量を150 μLとする

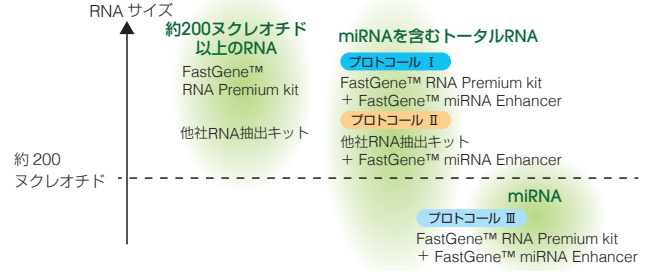
検討方法ワークフロー

● キットとプロトコルの選択ガイド

FastGene™ miRNA Enhancerは、FastGene™ RNA Basic kit、FastGene™ RNA Premium kitや他社RNA抽出キットと併用していただくことで、抽出が困難な低分子RNA (miRNA) を回収することが可能になります。

本アプリケーションノートでは、FastGene™ miRNA EnhancerとFastGene™ RNA Premium kitまたは他社RNA抽出を組み合わせた右記のプロトコルを使用しました。さらに抽出したmiRNAをcDNA合成後、リアルタイムPCRを行うことによりCp値の評価を行いました。

本アプリノートで使用しているkitの選択方法



miRNAを含むトータルRNAを回収したい場合

プロトコル I

FastGene™ RNA Premium kit + FastGene™ miRNA Enhancer

< 1×10⁵ 培養細胞

350 μL バッファー RL※1
添加後十分にホモジナイズ



FastGene™ RNA filter columnに
ライゼート添加
≥ 10,000 x g (室温: 20 ~ 25°C) 1 min
FastGene™ RNA filter column廃棄後
ろ液を回収

400 μL FastGene™ miRNA
enhancer solution
ピペティングで混合



FastGene™ RNA binding columnに
最大700 μLまでのサンプル溶液を添加
≥ 10,000 x g (室温: 20 ~ 25°C) 1 min
ろ液廃棄後 カラムを元のコレクション
チューブ (2.0mL) に戻す

400 μL バッファー RW2※1
≥ 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

400 μL バッファー RW2※1
≥ 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

フルスピードで遠心 (室温: 20 ~ 25°C)
1 min
カラムを新しいコレクションチューブ
(1.5mL) に移す

50 μL バッファー RE
(注: メンブレンの中央に添加)
≥ 10,000 x g (室温: 20 ~ 25°C) 1 min
FastGene™ RNA binding column
廃棄後 溶出液を回収

プロトコル II

他社RNA抽出キット + FastGene™ miRNA Enhancer

< 1×10⁵ 培養細胞

350 μL Buffer Lysis Buffer
添加後十分にホモジナイズ

14,000 rpm (室温: 20 ~ 25°C) 2 min
ろ液を回収

350 μL FastGene™ miRNA
enhancer solution
ピペティングで混合

columnに最大700 μLまでの
サンプル溶液を添加
14,000 rpm (室温: 20 ~ 25°C) 1 min
ろ液廃棄後 カラムを元のコレクション
チューブ (2.0mL) に戻す

500 μL バッファー Wash Buffer
14,000 rpm (室温: 20 ~ 25°C) 1 min
ろ液廃棄後 カラムを元のコレクション
チューブ (2.0mL) に戻す

500 μL バッファー RPE
14,000 rpm (室温: 20 ~ 25°C) 2 min
カラムを新しいコレクションチューブ
(2.0mL) に移す

フルスピードで遠心 (室温: 20 ~ 25°C)
1 min
カラムを新しいコレクションチューブ
(1.5 mL) に移す

RNaseフリー水 (30~50 μL)
(注: メンブレンの中央に添加)
14,000 rpm (室温: 20 ~ 25°C) 1 min
column 廃棄後 溶出液を回収

miRNAのみを回収したい場合

プロトコル III

FastGene™ RNA Premium kit + FastGene™ miRNA Enhancer

< 1×10⁵ 培養細胞

350 μL バッファー RL※1
添加後十分にホモジナイズ



FastGene™ RNA filter columnに
ライゼート添加
≥ 10,000 x g (室温: 20 ~ 25°C) 1 min
FastGene™ RNA filter column廃棄後
ろ液を回収

350 μL 70% エタノール
ピペティングで混合



FastGene™ RNA binding column に
最大700 μLまでのサンプル溶液を添加
≥ 10,000 x g (室温: 20 ~ 25°C) 1 min
ろ液を回収

400 μL FastGene™ miRNA enhancer
solution
ピペティングで混合



FastGene™ RNA mini-elute columnに
サンプル溶液を添加
≥ 10,000 x g (室温: 20 ~ 25°C) 1 min
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

400 μL バッファー RW2※1
≥ 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

400 μL バッファー RW2※1
≥ 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

フルスピードで遠心 (室温: 20 ~ 25°C) 1 min
カラムを新しいコレクションチューブ (1.5mL)
に移す

50 μL バッファー RE
(注: メンブレンの中央に添加)
≥ 10,000 x g (室温: 20 ~ 25°C) 1 min
FastGene™ RNA mini-elute column
廃棄後 溶出液を回収

リアルタイムPCRの条件

miR-21解析に用いたステムループ RT プライマーと cDNA 合成 (Cell line · human white blood cell · FFPE 検体で使用)

- Stem- Loop RT-primer sequences 5' → 3'
miR-21
GTCAGAGGAGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCTCCTCTGACTCAACA
 - Reverse Transcript → cDNA
Transcriptor RT Reaction Buffer (5×) (Roche) 2 μL
Stem-Loop RT-primer (10 μM) 0.2 μL
Transcriptor Reverse Transcriptase (20 U/μL) (Roche) 0.25 μL
Protector RNase Inhibitor (40 U/μL) (Roche) 0.25 μL
Deoxynucleotide Mix (10 mM) (Roche) 1 μL
RNA solution 2.5 μL
Water 3.8 μL
 - Reaction conditions
16 °C 30 min
30 °C 30 s
42 °C 30 s
50 °C 1 s
85 °C 5 min
60 cycles
- ➡ 反応産物を TE buffer で 5 倍希釈して、以降の反応に使用した

miR-21 解析に用いたリアルタイム PCR 時のプライマー配列、プローブ、反応条件および反応液

- Primer sequences (5' → 3') and Probe
miR-21
Forward primer GATCGGTAGCTTATCAGACTGATG
Reverse primer GTGCAGGGTCCGGGTAAT
Universal ProbeLibrary Probe (Roche) #82
- Reaction conditions
95 °C 10 min
95 °C 10 sec
60 °C 30 sec
40 cycles
- Reaction mixtures
2.5 μL of cDNA solution
5 μL of Essential Probe Master (Roche)
0.4 μM of each primer
0.4 μM of UPL probe (Roche)
(in a final volume of 10 μL)

反応は LightCycler 96 (Roche) で実施した。2 重測定 of 平均値を測定値とした。

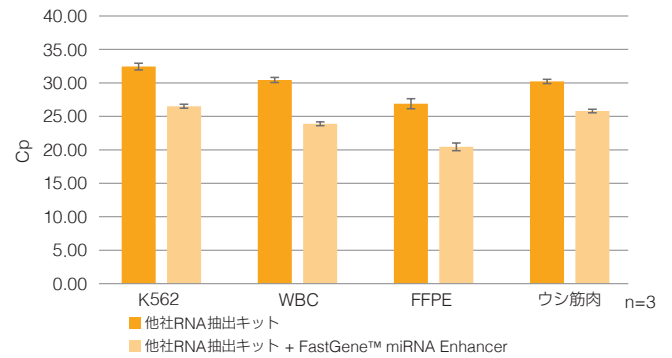
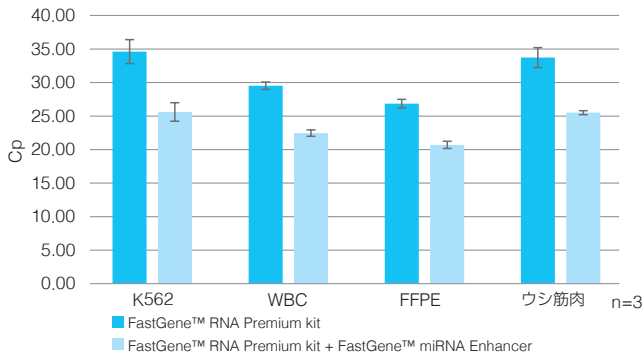
bta-miR-23a 解析に用いたステムループ RT プライマーと cDNA 合成 (Bovine muscle で使用)

- Stem- Loop RT-primer sequences 5' → 3'
bta-miR-23a
CTCAACTGGTGTCTGGAGTCCGGCAATTCAGTTGAGTGGAAATC *
*Guan L et. al. : Sci Rep, 7: 43716, 2017
 - Reverse Transcript → cDNA
Transcriptor RT Reaction Buffer (5×) (Roche) 2 μL
Stem-Loop RT-primer (10 μM) 0.2 μL
Transcriptor Reverse Transcriptase (20 U/μL) (Roche) 0.25 μL
Protector RNase Inhibitor (40 U/μL) (Roche) 0.25 μL
Deoxynucleotide Mix (10 mM) (Roche) 1 μL
RNA solution 2.5 μL
Water 3.8 μL
 - Reaction conditions
16 °C 30 min
30 °C 30 s
42 °C 30 s
50 °C 1 s
85 °C 5 min
60 cycles
- ➡ 反応産物を TE buffer で 5 倍希釈して、以降の反応に使用した

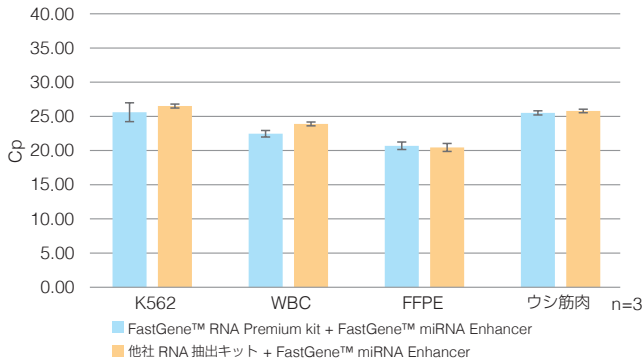
bta-miR-23a 解析に用いたプライマー配列、反応条件および反応液

- 1 Primer sequences (5' → 3') *
bta-miR-23a
Forward primer CCGAGTCAGATCACATTGCCAGG
Reverse primer CTCAACTGGTGTCTGGAGTCG
*Guan L et. al. : Sci Rep, 7: 43716, 2017
- Reaction conditions
95 °C 10 min
95 °C 10 sec
60 °C 30 sec
40 cycles
- Reaction mixtures
2.5 μL of cDNA solution
5 μL of KAPA SYBR Fast qPCR (KAPA)
0.4 μM of each primer
(in a final volume of 10 μL)

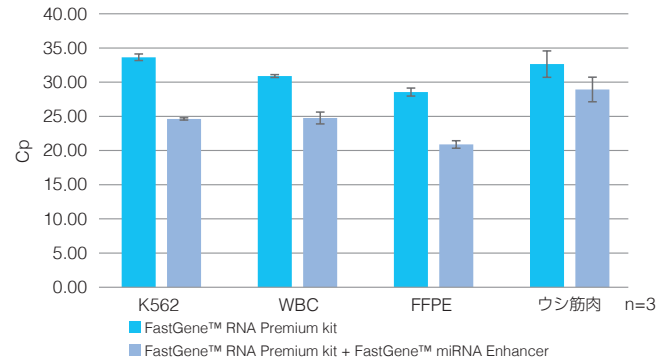
反応は LightCycler 96 (Roche) で実施した。2 重測定 of 平均値を測定値とした。

結果**● I IIのプロトコルを使用：FastGene™ miRNA Enhancerを使用・未使用の際のリアルタイムPCRによるCp値の評価**

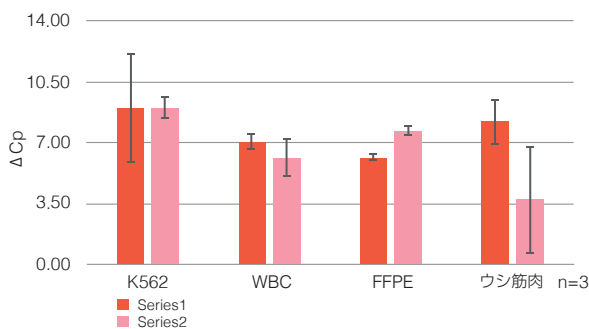
どのキットにおいてもFastGene™ miRNA Enhancerを加えることによりmiRNAの収量が向上した。

● I IIのプロトコルを使用：FastGene™ miRNA Enhancerを使用した際のリアルタイムPCRによるCp値の評価

どのキットにおいてもI、IIのプロトコルを使用した際のCp値は同程度だった。

● IIIのプロトコルを使用：様々なサンプルを使用した際のリアルタイムPCRによるCp値の評価

どのサンプルにおいてもIIIのプロトコルを使用することによりmiRNAの収量が向上した。

● IとIIIのプロトコルを使用：ΔCpの評価

Iのプロトコルを使用した場合でも、IIIのプロトコルを使用した場合でも、miRNAの抽出量は同程度だった。

ΔCpの算出方法 $\Delta Cp = (\text{FastGene™ miRNA Enhancer 未使用の際の } Cp \text{ 値}) - (\text{FastGene™ miRNA Enhancer 使用の際の } Cp \text{ 値})$

- まとめ** FastGene™ miRNA Enhancerを加えることにより、どちらのキットを用いてもmiRNAの収量が向上しました。また、カラムを通す回数が異なっても、miRNAの抽出量は同程度であることがわかりました。



お客様のコメント

当検査室ではFFPEや腹膜透析液排液を検体としてmiRNAを抽出した、経験がありますが、やはり解析に十分な量の抽出が困難な例がありました。そんな際にこの試薬の活用は有効であると思いました。FastGene™シリーズのRNA抽出試薬は純度・収量が優れていることから、この試薬と組み合わせることで他社のmiRNA抽出専用試薬と同等以上の効果が期待できると思います。