



Application

## FastGene™ miRNA Enhancerを用いた植物からのmiRNA抽出効率の改善

製品名

FastGene™ miRNA Enhancer (Cat.No.FG-RNAE-S, FG-RNAE-25)  
FastGene™ RNA Basic Kit (Cat.No.FG-80006, FG-80050, FG-80250)  
TRIsure (Cat.No.BIO-38032)

メーカー名

FastGene™  
meridian Bioscience

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

### 実験概要

FastGene™ miRNA Enhancerは、市販のカラム法を用いたRNA抽出キットと組み合わせることによって、microRNA (miRNA) の効果的な回収を可能にする試薬である。これまで、培養細胞・FFPE・全血・筋肉組織での実績はあったが、植物での実績はなかった。

そこで、本アプリケーションノートでは、植物からのmiRNA抽出におけるFastGene™ miRNA Enhancerの抽出効率の改善効果について検討を行った。

### 実験の流れ

1. TRIsure、FastGene™ RNA Basic Kit、FastGene™ miRNA Enhancerを用い、RNA抽出
2. stem-loop RT primer、Random Hexamer primerおよびoligo dT primerを用い、cDNA合成
3. リアルタイムPCRにて測定
4.  $\Delta Cq = \text{Target gene } Cq - \text{Housekeeping gene } Cq$ とし、 $2^{-\Delta Cq}$ にてmiRNA量を比較

### 実験条件

● サンプル

トウモロコシの実  
枝豆の豆  
キャベツの葉

● 使用試薬

〈RNA抽出使用試薬〉

FastGene™ miRNA Enhancer (FastGene / Cat.No. FG-RNAE-S, FG-RNAE-25)  
FastGene™ RNA Basic Kit (FastGene / Cat.No. FG-80006, FG-80050, FG-80250)  
TRIsure (meridian Bioscience / Cat.No. BIO-38032)

〈cDNA合成使用試薬〉

Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche / Cat.No. 04379012001)

〈リアルタイムPCR〉

FastStart Essential DNA Green Master (Roche / Cat.No. 06402712001)

● 使用装置

LightCycler® 96 システム (Roche / Cat.No. 05815916001)

## RNA抽出方法

## miRNA Enhancer (-)



液体窒素にてサンプルを凍らせ  
すり潰した後、100 mgを秤量



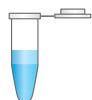
TRIsure  
1 mL添加し、ペッスル棒を用いてホモジナイズ  
室温、5 min インキュベート



クロロホルム 200  $\mu$ L添加後、  
15 sec vortex  
室温、3 min インキュベート



4°C, 12,000 rpm, 15 min



上清 350  $\mu$ Lを採取 (水層部分)  
1% 2-MEを加えたBuffer RL 350  $\mu$ Lを  
加える (Total 700  $\mu$ L)



室温、13,000 rpm, 1 min



70%エタノール 400  $\mu$ L添加



FastGene™ RNA binding columnに  
アプライ



室温、13,000 rpm, 1 min



Buffer RW2 400  $\mu$ L添加



室温、13,000 rpm, 1 min



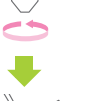
Buffer RW2 400  $\mu$ L添加



室温、13,000 rpm, 1 min



カラムを新しいコレクションチューブにセット



室温、13,000 rpm, 1 min



カラムを新しい1.5 mLチューブにセット  
Buffer RE 50  $\mu$ L添加  
室温、13,000 rpm, 1 min  
FastGene™ RNA binding column廃棄後、  
溶出液を回収

## miRNA Enhancer (+)



液体窒素にてサンプルを凍らせ  
すり潰した後、100 mgを秤量



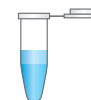
TRIsure  
1 mL添加し、ペッスル棒を用いてホモジナイズ  
室温、5 min インキュベート



クロロホルム 200  $\mu$ L添加後、  
15 sec vortex  
室温、3 min インキュベート



4°C, 12,000 rpm, 15 min



上清 350  $\mu$ Lを採取 (水層部分)  
1% 2-MEを加えたBuffer RL 350  $\mu$ Lを  
加える (Total 700  $\mu$ L)



室温、13,000 rpm, 1 min



FastGene™ miRNA Enhancer solution  
400  $\mu$ L添加



FastGene™ RNA binding columnに  
アプライ



室温、13,000 rpm, 1 min



Buffer RW2 400  $\mu$ L添加



室温、13,000 rpm, 1 min



Buffer RW2 400  $\mu$ L添加



室温、13,000 rpm, 1 min



カラムを新しいコレクションチューブにセット



室温、13,000 rpm, 1 min



カラムを新しい1.5 mLチューブにセット  
Buffer RE 50  $\mu$ L添加  
室温、13,000 rpm, 1 min  
FastGene™ RNA binding column廃棄後、  
溶出液を回収

## 結果

## リアルタイムPCR

## トウモロコシ

	miRNA Enhancer	miR319 (Target gene)			EF1A (Housekeeping gene)			2 <sup>-ΔCq</sup>		
		Cq value	mean	SD	Cq value	mean	SD	Cq value	mean	SD
1	-	29.87	29.72	0.22	24.77	24.41	0.38	0.03	0.03	0.00
2		29.47			24.02			0.02		
3		29.84			24.44			0.02		
4	+	25.30	25.16	0.25	26.62	26.78	0.62	2.51	3.46	2.20
5		24.88			27.46			5.98		
6		25.32			26.26			1.93		

FastGene™ miRNA Enhancerの添加により**137.3倍**のmiRNAが抽出された。

## 枝豆

	miRNA Enhancer	miR159 (Target gene)			ACT11 (Housekeeping gene)			2 <sup>-ΔCq</sup>		
		Cq value	mean	SD	Cq value	mean	SD	Cq value	mean	SD
1	-	28.38	28.31	0.17	22.41	22.32	0.09	0.02	0.02	0.00
2		28.12			22.33			0.02		
3		28.45			22.22			0.01		
4	+	21.56	21.27	0.26	24.09	24.51	0.37	5.78	9.98	3.89
5		21.06			24.81			13.45		
6		21.20			24.62			10.70		

FastGene™ miRNA Enhancerの添加により**632.2倍**のmiRNAが抽出された。

## キャベツ

	miRNA Enhancer	miR159 (Target gene)			GAPDH (Housekeeping gene)			2 <sup>-ΔCq</sup>		
		Cq value	mean	SD	Cq value	mean	SD	Cq value	mean	SD
1	-	31.25	30.75	0.43	24.92	24.44	0.41	0.01	0.01	0.00
2		30.51			24.24			0.01		
3		30.48			24.18			0.01		
4	+	25.83	25.62	0.49	25.26	24.90	0.32	0.67	0.64	0.22
5		25.06			24.80			0.84		
6		25.98			24.66			0.40		

FastGene™ miRNA Enhancerの添加により**50.1倍**のmiRNAが抽出された。

## ● まとめ

- 各サンプルにおけるmiRNAのCq値は、FastGene™ miRNA Enhancer添加例でより低値を示した。
- 各サンプルにおけるHousekeeping geneのCq値は、FastGene™ miRNA Enhancer添加例でより高値を示した。
- 2<sup>-ΔCq</sup>は、FastGene™ miRNA Enhancer添加例でより高値を示した。

これらより、FastGene™ miRNA Enhancerは植物からのmiRNA抽出における抽出効率の向上を可能にすると考えられる。



## お客様のコメント

FastGene miRNAエンハンサーを用いた細胞株や種々の臨床検体でその有用性が示されていますが、今回はそれ以外の試料を検討しました。

いずれも臨床検体と同様の効果が認められ、幅広い対象にて有効であることが明らかとなりました。



## 補 足

## cDNA 合成反応

## Stem-loop RT Primerを用いたcDNA合成 (miR159, miR319で実施)

## ● Stem-loop RT Primer sequences

miRNA	Stem-loop RT primer sequence (5' - 3')
miR159*	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGAAGAGCT
miR319*	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGAGGGAGC

\*Plant, Cell and Environment (2012) 35, 502–512

## ● 反応組成

Transcriptor RT Reaction Buffer (5×)	2 μL
10 μM Stem-loop RT Primer	0.2 μL
Transcriptor Reverse Transcriptase (20 U/μL)	0.25 μL
Protector RNase Inhibitor (40 U/μL)	0.25 μL
Deoxynucleotide Mix (10 mM)	1 μL
RNA solution	2.5 μL
water	3.8 μL
Total	10 μL

反応産物をTE bufferで5倍希釈して、以降の反応に使用した。

## ● 反応条件

Temperature	Time	Cycle
16 °C	30 min	-
30 °C	30 sec	60 Cycles
42 °C	30 sec	
50 °C	1 sec	
85 °C	5 min	-

## Random Hexamer PrimerおよびOligo dT Primerを用いたcDNA合成 (EF1A, ACT11, GAPDHで実施)

## ● 反応組成

Transcriptor RT Reaction Buffer (5×) (Roche)	2 μL
Random Hexamer Primer	1 μL
Oligo dT Primer	0.5 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	2.5 μL
Total	10 μL

反応産物をTE bufferで5倍希釈して、以降の反応に使用した。

## ● 反応条件

Temperature	Time
25 °C	10 min
55 °C	60 min
85 °C	5 min



## リアルタイムPCR

## ● PCR primer sequences

miRNA	Forward primer sequence (5' - 3')	Reverse primer sequence (5' - 3')
miR159	GCGGCGTTGGATTGAAGGG	GTGCAGGGTCCGAGGT
miR319	GCGGCGTTGGACTGAAGGGT	

\*Plant, Cell and Environment (2012) 35, 502–512

## ● Housekeeping genes

	Gene	Forward primer sequence (5' - 3')	Reverse primer sequence (5' - 3')
トウモロコシ <sup>*1</sup>	EF1A	TGGGCCTACTGGTCTTACTACTGA	ACATACCCACGCTTCAGATCCT
枝豆 <sup>*2</sup>	ACT11	ATCTTGACTGAGCGTGGTTATTCC	GCTGGTCCTGGCTGTCTCC
キャベツ <sup>*3</sup>	GAPDH	AGAGCCGCTTCCTTCAACATCATT	TGGGCACACGGAAGGACATACC

\*1 PLoS One. 2014; 9 (5) : e95445.

\*2 PLoS One. 2017; 12 (12) : e0189405.

\*3 PLoS One. 2018 Sep 7;13 (9) :e0203656.

## ● 反応組成

FastStart Essential DNA Green Master	5 μL
10 μM Forward primer	0.2 μL
10 μM Reverse primer	0.2 μL
cDNA	2.5 μL
Water	2.1 μL
Total	10 μL

## ● 反応プログラム

Temperature	Time	Cycle
95 °C	10 min	-
95 °C	10 sec	40 Cycles
60 °C	10 sec	
72 °C	10 sec	