



Application

FastGene™ miRNA Enhancerを用いた DNase I 処理の検討

製品名

FastGene™ miRNA Enhancer (Cat.No. 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 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。しかしながら、FastGene™ miRNA Enhancerを使用した際のDNase I 処理について検討を行っていなかった。そこで、本アプリケーションノートでは、FastGene™ RNA Premium Kit、FastGene™ miRNA Enhancer 使用時におけるDNase I 処理について検討を行った。

〈実験の流れ〉

1. FastGene™ RNA Premium Kit を用いてmiRNA含むtotal RNA抽出/miRNA分離抽出後、DNase I 処理
2. Qubit™ 4 Fluorometerを用いたdsDNA測定
3. cDNA合成
4. LightCycler® 96 Systemを用いたmiR-21、ACTBおよびGAPDH 遺伝子解析

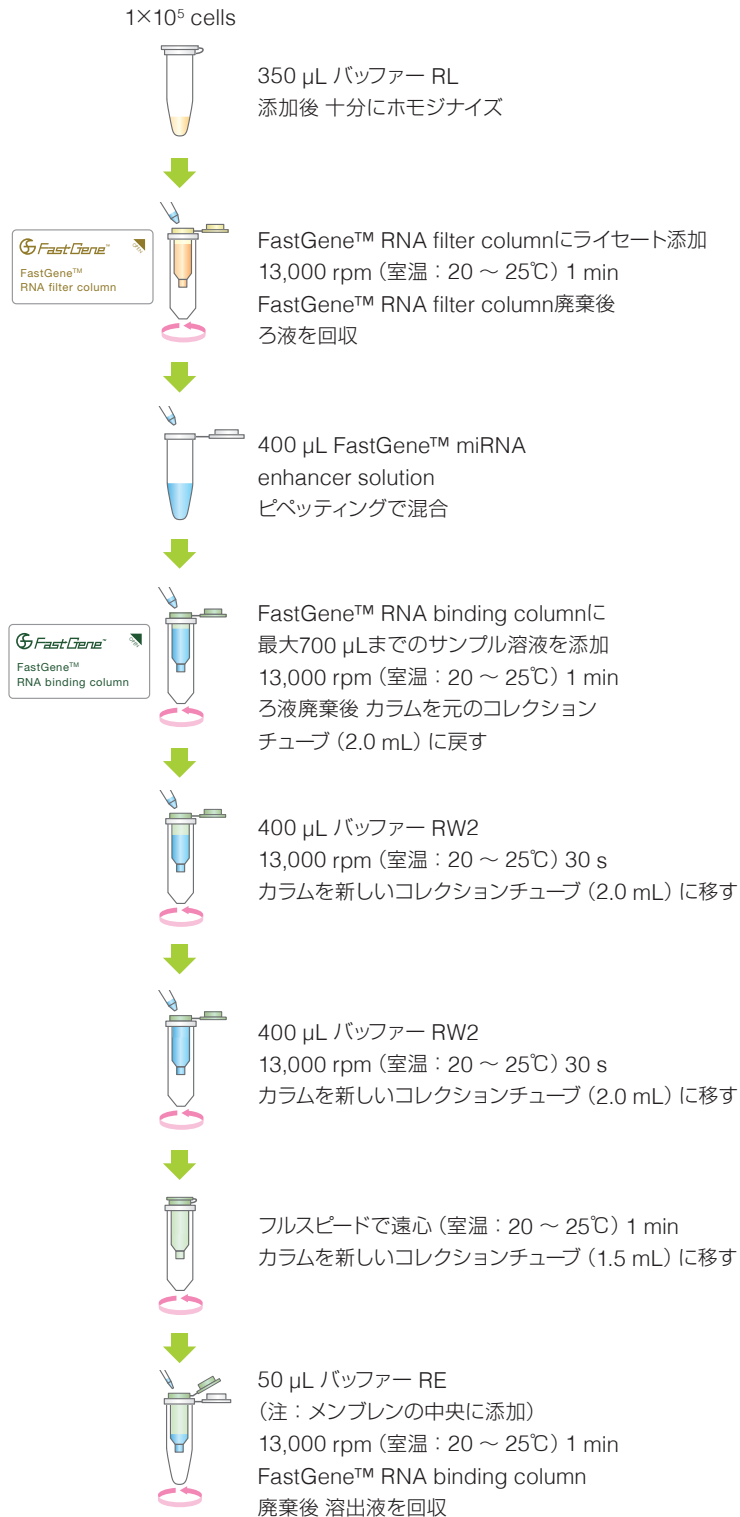
実験方法

- サンプル
K562 cell (1×10⁵ cells)
- 装置
LightCycler® 96 System (Roche / Cat.No. 05815916001)
Qubit™ 4 Fluorometer (invitrogen / Cat.No. Q33238)
- 試薬
〈RNA抽出〉
FastGene™ RNA Premium Kit (FastGene™ / Cat.No. FG-81006, FG-81050, FG-81250)
FastGene™ miRNA Enhancer (FastGene™ / Cat.No. FG-RNAE-25)
〈cDNA合成〉
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche / Cat.No. 04379012001)
〈dsDNA測定〉
Qubit™ ds DNA HS Assay Kit (invitrogen / Cat.No. Q32851)
〈リアルタイムPCR〉
FastStart Essential DNA Probes Master (Roche / Cat.No. 06402682001)

RNA抽出/DNase I 処理方法

miRNAを含む Total RNA 抽出 (DNase I 処理なし)

FastGene™ RNA Premium kit + FastGene™ miRNA Enhancer



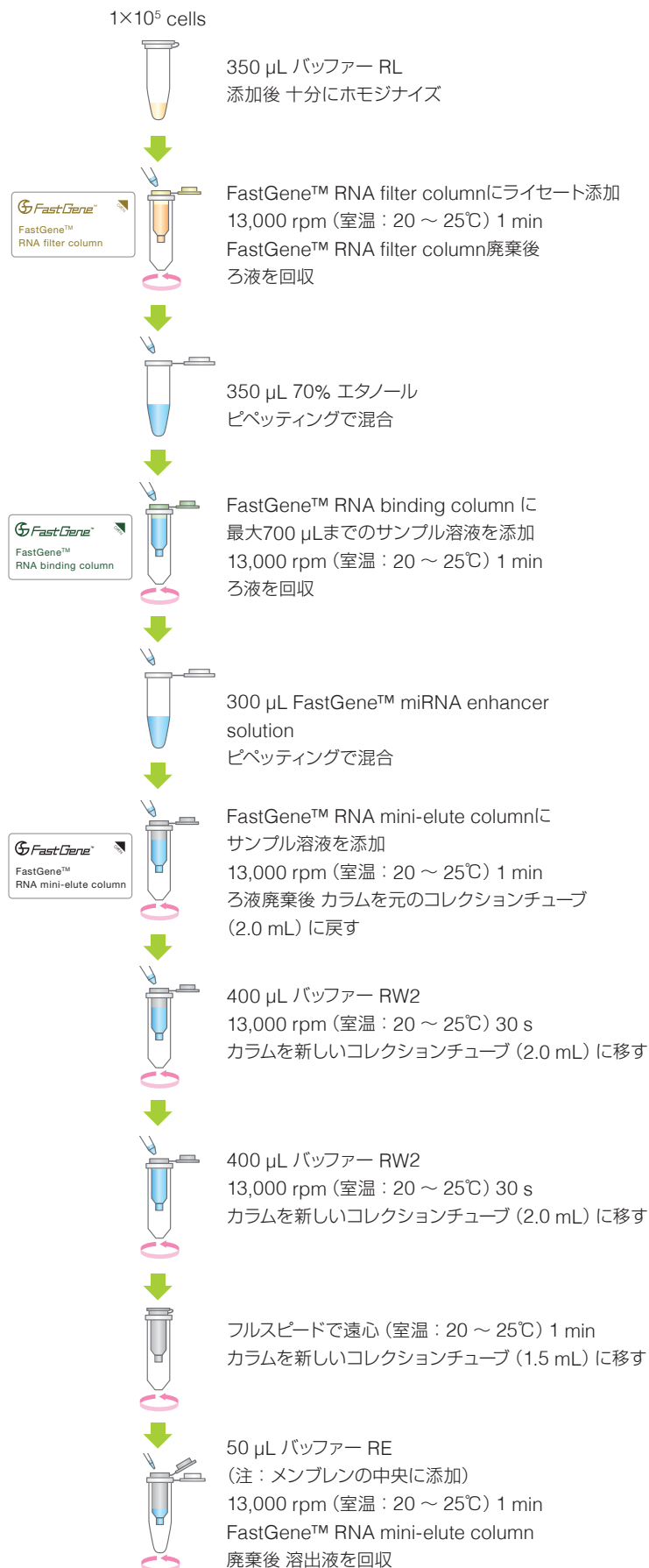
miRNAを含む Total RNA 抽出 (DNase I 処理あり)

FastGene™ RNA Premium kit + FastGene™ miRNA Enhancer



miRNAを分離抽出 (DNase I 処理なし)

FastGene™ RNA Premium kit + FastGene™ miRNA Enhancer



miRNAを分離抽出 (DNase I 処理あり)

FastGene™ RNA Premium kit + FastGene™ miRNA Enhancer



cDNA 合成反応

Stem-Loop RT Primer を用いた cDNA 合成 (miR-21)

● Stem-Loop RT Primer sequences

miRNA	Stem-Loop RT primer sequences (5' → 3')
miR-21	GTCAGAGGAGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCTCCTCTGACTCAACA

● 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	-
42 °C	30 sec	60 Cycles
50 °C	1 sec	-
85 °C	5 min	-

Random Hexamer Primer および Oligo dT Primer を用いた cDNA 合成 (ACTB, GAPDH)

● 反応組成

Transcriptor RT Reaction Buffer (5×)	2 μL
Random Hexamer Primer	1 μL
Oligo dT Primer	0.5 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	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	Cycle
16 °C	30 min	-
30 °C	30 sec	-
42 °C	30 sec	60 Cycles
50 °C	1 sec	-
85 °C	5 min	-

リアルタイム PCR

● Primer/Probe

miR-21	Primer sequences (5' → 3')
Forward	GATCGGTAGCTTATCAGACTGATG
Reverse	GTGCAGGGTCCGGGTAAT
Probe	Universal ProbeLibrary Probe (Roche) #82

GAPDH	Primer sequences (5' → 3')
Forward	AGCCACATCGCTCAGACA
Reverse	GCCCAATACGACCAAATCC
Probe	Universal ProbeLibrary Probe (Roche) #60

ACTB	Primer sequences (5' → 3')
Forward	TCCTCCCTGGAGAAGAGCTA
Reverse	CGTGGATGCCACAGGACT
Probe	Universal ProbeLibrary Probe (Roche) #27

● 反応組成

Essential Probe Master	5 μL
10 μM each primer	0.2 μL
UPL probe	0.2 μL
cDNA solution	2.5 μL
water	1.9 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	30 sec	-

結果

1. LightCycler® 96 System を用いた miR-21, ACTB および GAPDH 遺伝子の解析 (Cq 値、3重測定の前平均値)

miRNA を含む Total RNA 抽出

	miR-21	ACTB	GAPDH
DNase I 処理 (-)	21.50	18.80	19.66
DNase I 処理 (+)	22.10	19.60	19.83
DNase I 処理 (-) - DNase I 処理 (+)	-0.60	-0.80	-0.17

miRNA を分離抽出

	miR-21	ACTB	GAPDH
DNase I 処理 (-)	22.72	19.95	18.84
DNase I 処理 (+)	23.33	20.55	19.63
DNase I 処理 (-) - DNase I 処理 (+)	-0.61	-0.60	-0.79

2. Qubit ds DNA HS Assay を用いた残存 dsDNA の測定

miRNA を含む Total RNA 抽出

	DNase I 処理 (-)	DNase I 処理 (+)
1	132.5	57.0
2	176.5	50.5
3	182.5	65.5
Mean	163.8	57.7
SD	27.3	7.5

単位 : ng

miRNA を分離抽出

	DNase I 処理 (-)	DNase I 処理 (+)
1	77.5	31.2
2	53.0	39.0
3	43.8	51.0
Mean	58.1	40.4
SD	17.4	10.0

単位 : ng

● まとめ

miRNA を含む Total RNA 抽出および miRNA の分離における Cq 値は、ACTB および GAPDH 遺伝子と miRNA は DNase I 処理においてほぼ同様の動向を示している。

また、DNase I 処理後の溶出液の dsDNA 収量は低下傾向を示している。

これらより、溶出後の DNase I 処理は有効であると考えられる。



お客様のコメント

DNase 処理することで、より純度の高い miRNA が得られると考えられ、収量のロスも少なく、高純度の核酸を必要とする実験において有用と考える。