



Application

# アンチセンス法によるノックダウン後の安定したRNA抽出とqPCR定量

製品名

TRIsure (トータルRNA抽出試薬) (BIO-38032)

メーカー名

BIOLINE 社

下記のデータは、東京大学 定量生命科学研究所 分子情報研究分野 (秋山研究室) 山角 祐介様のご厚意により掲載させていただきました。

## 概要

geneXに対する antisense oligo を用いたノックダウン実験を実施した。目的遺伝子をノックダウンさせた細胞から TRIsure にて RNA を抽出した。逆転写反応により cDNA に変換後、リアルタイム PCR による定量を行った。

核酸の種類は 2 種類 (NA-1, NA-2)、antisense oligo の配列は 2 配列 (Anti-GeneX-1, Anti-GeneX-2) を用いた。

### TRIsure (トータルRNA抽出試薬)

Cat.No. BIO-38032



- フェノール抽出試薬
- 有機相が淡緑色に色が付くため水相 (RNA を含む) の回収が容易
- RNA の抽出が約 1 時間で可能
- 操作しやすい広口ボトル



## ワークフロー

### 1. サンプル準備

- 1) A549 細胞  $1.1 \times 10^5$  cell/ml  $\times 1$  ml /well をプレートに播種した。(プレート: TrueLine Cell Culture Plates 12 ウェルタイプ (TrueLine))
- 2) 細胞に Reverse transfection で Antisense oligo を導入した。  
(トランスフェクション試薬: Lipofectamine® RNAiMAX Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific))
- 3) 48 時間培養後、培地を捨て、PBS で細胞を洗浄した。



### 2. TRIsure を用いた RNA 抽出



- 1) 500  $\mu$ L /well の TRIsure を加え、細胞をチューブに回収した。
- 2) 室温で 5 分間インキュベートをした。
- 3) 100  $\mu$ L / tube のクロロホルムを加えて、15 秒間強く混和させた。
- 4) 室温で 3 分間インキュベートした。
- 5) 4°C で 12,000  $\times$ g で 15 分間遠心し、3 層に分離させた。
- 6) 水溶性の層 (無色、150  $\mu$ L) を新しいチューブに移した。
- 7) 150  $\mu$ L / tube のイソプロパノールを加えて、転倒混和し、室温で 10 分間インキュベートした。
- 8) 4°C で、12,000  $\times$ g で 10 分間遠心し、上清を捨てた。
- 9) 500  $\mu$ L / tube の 75% エタノールを加えて、ボルテックスにて混和し、ペレットを洗浄した。
- 10) 4°C で、7,500  $\times$ g で 5 分間遠心し、上清を捨てた。
- 11) ペレットを風乾させ、20  $\mu$ L の MilliQ 水で溶出後、60°C で 10 分間インキュベートし、RNA ペレットを再懸濁した。



上層 (水相): 無色の水溶性の層 (RNA を含む)  
中間相: 白色の層  
下層 (有機相): 淡緑色の有機性の層



### DNaseI 処理未実施

### 3. RNA の収量・濃度測定

↳ RNA の濃度を NanoDrop で測定した。—— 結果 1. 収量・純度の測定結果

### 4. 逆転写反応

↳ RNA を逆転写反応させ、cDNA を合成した。

(逆転写酵素: PrimeScript™ RT Master Mix (Perfect Real Time) (TaKaRa))

#### ● 反応組成

Total RNA	500 ng
Primescript RT Master Mix	2 $\mu$ L
MilliQ	up to 10 $\mu$ L
(total volume)	10 $\mu$ L

#### ● 反応プログラム

アニーリング・逆転写反応	37°C · 15 min
↓	
逆転写酵素の熱失活	85°C · 5 sec
↓	
ホールド	4°C



LightCycler® 480 System I

**5.リアルタイムPCRによる定量**

- 逆転写後の反応液に、MilliQを90  $\mu$ L 加えて、cDNAを10倍希釈した（※ DNaseI 処理未実施）。
- 希釈したcDNA溶液を用いて、qPCRによる定量を実施した。—— 結果2. リアルタイムPCRの結果  
 (測定機器 : LightCycler® 480 System I (Roche))  
 (qPCR試薬 : LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche))  
 (プレート : LightCycler® 480 Multiwell Plate 96 white (Roche))

**●反応組成**

Template DNA	3 $\mu$ L
Master Mix, 2x conc.	5 $\mu$ L
5 uM forward primer	1 $\mu$ L
5 uM reverse primer	1 $\mu$ L
PCR-grade water	Up to 10 $\mu$ L
(total volume)	10 $\mu$ L

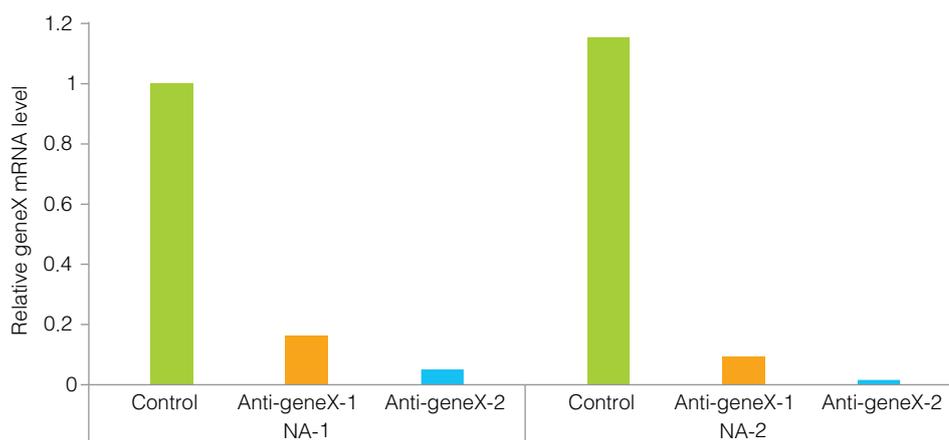
**●反応プログラム**

初期変性	95 °C · 5 min	} 45 cycles
↓		
変性	95 °C · 10 sec	
↓		
アニーリング	62 °C · 10 sec	
↓		
伸長反応	72 °C · 10 sec	
*最終伸長反応は未実施		

**結果**
**結果1. 収量・純度の測定結果**

		ng/ $\mu$ L	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>	A <sub>260</sub> /A <sub>230</sub>	A <sub>260</sub>	A <sub>280</sub>	A <sub>230</sub>
NA-1	Control	188.78	1.86	1.68	4.72	2.53	2.82
	Anti-geneX-1	202.10	1.77	2.22	5.05	2.86	2.28
	Anti-geneX-2	188.93	1.85	2.07	4.72	2.56	2.28
NA-2	Control	207.63	1.95	0.54	5.19	2.66	9.67
	Anti-geneX-1	171.65	1.78	2.06	4.29	2.41	2.08
	Anti-geneX-2	192.49	1.79	2.13	4.81	2.68	2.26

サンプル間であまりぶれず、十分量のRNAを回収することが出来た。NA-2のコントロールでA<sub>260</sub>/A<sub>230</sub>の値が低いのは、水層を取る際にグアニジンイソチシアネートやフェノールが混入したためと考えられる。

**結果2. リアルタイムPCRの結果**


geneXを標的とするAntisense oligoを細胞に導入することで、geneXの発現量を減少させることが出来ることが明らかになった。


**お客様のコメント**

当研究室は、遺伝子の発現量の変化に着目した研究を主に行っているため、細胞からRNAを回収する機会が多いため、TRIsureは、安価であるにもかかわらず、高品質のRNAが高収量で得られるのでとても重宝している。