



Application

# モバイル型リアルタイムPCR装置「Franklin」を用いた枝豆のmiRNAの検出

製品名

Franklin™ Real-Time PCR Thermocycler (Cat.No.1000003/SET)  
FastGene™ miRNA Enhancer (Cat.No. FG-RNAE-25)

メーカー名

Biomeme, Inc.  
FastGene™

本データは、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いただきました。

## 実験概要

FastGene™ miRNA Enhancer未添加／添加条件下で、それぞれFastGene™ RNA Basic kitを用いて、枝豆のRNA抽出を行った。その後、モバイル型リアルタイムPCR装置「Franklin™ Real-Time PCR Thermocycler」及びベンチトップ型リアルタイムPCR装置「LightCycler® 96 System」を用いて、miR-159及びACT11遺伝子の検出を行い、得られた結果を比較検討した。

## 実験方法

- 初発サンプル 枝豆 (100 mg)
- 検出対象遺伝子 miR-159、ACT11遺伝子
- RNA抽出方法 FastGene™ RNA Basic kit (FastGene, Cat.No. FG-80006, FG-80050, FG-80250) を用いてRNAを抽出した。Sample No. 1-3はFastGene™ miRNA Enhancerを未添加で、Sample No. 4-6はFastGene™ miRNA Enhancerを添加して、それぞれRNA抽出を行った。詳細な方法は、巻末補足情報に記載。
- cDNA合成方法 Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, Cat. No. 04379012001) を用いてcDNAを合成した。詳細な方法は、巻末補足情報に記載。
- qPCR試薬 Faststart Essential DNA Green Master (Roche, Cat.No. 06402712001)
- 使用装置 Franklin™ Real-Time PCR Thermocycler (以下Franklin)  
LightCycler® 96 System (Roche, Cat.No. 05815916001, 以下LightCycler 96)
- 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 solution	2.5 µL
water	2.1 µL
Total	10 µL

### ● 反応条件

#### Franklin

##### 【qPCRプログラム】

Step	Temperature	Time	Cycle
Initial Denaturation	95 °C	10 min	-
Denaturation	95 °C	10 sec	40 Cycles
Annealing	60 °C	10 sec	
Extension	72 °C	10 sec	

##### 【Heat Meltプログラム】

Item	Setting
Set Start Temperature	60 °C
Set End Temperature	95 °C
Steps	36
°C per Step	1 °C

Active Channels : Green

※ Franklinは、通常のqPCRとMelting Curveのプログラムを、同一のRUN内で行うことができない。  
融解曲線分析を行う場合、通常のqPCRを行った後、別のプログラム（Heat Meltプログラム）でランを行う。

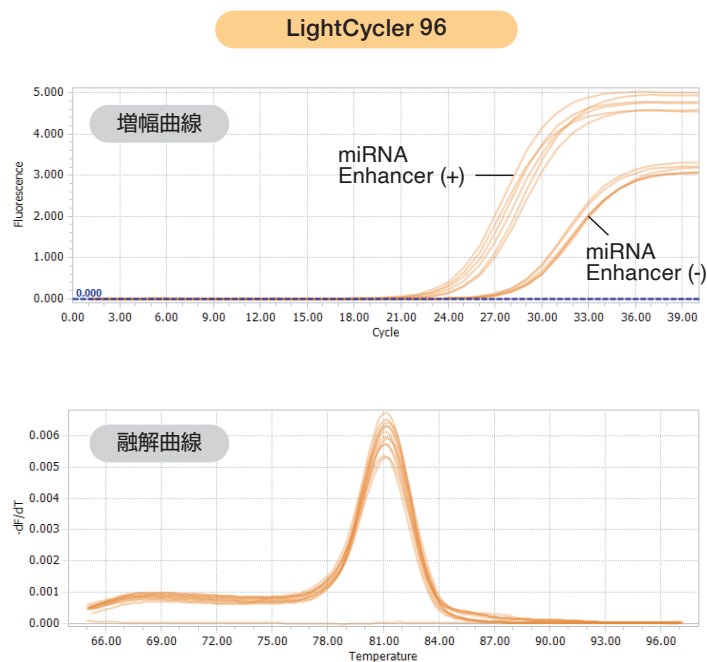
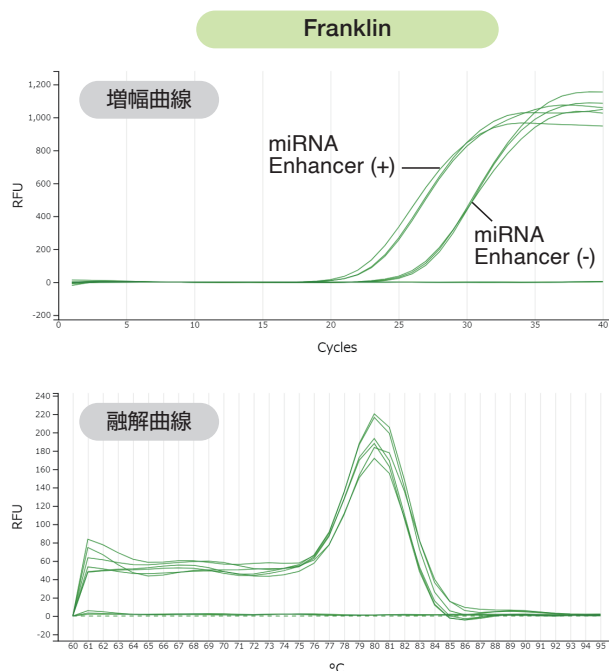
#### LightCycler 96

Step	Temperature	Time	Cycle
Initial Denaturation	95 °C	10 min	-
Denaturation	95 °C	10 sec	40 Cycles
Annealing	60 °C	10 sec	
Extension	72 °C	10 sec	
Melting Curve	95 °C	10 sec	-
	65 °C	1 min	-
	97 °C	1 sec	-

## 結果

### ● miR-159

Franklinはn=1, LightCycler 96はn=2で測定を行った。



**Cq値** ※LightCycler 96は、n=2の平均値を算出した。

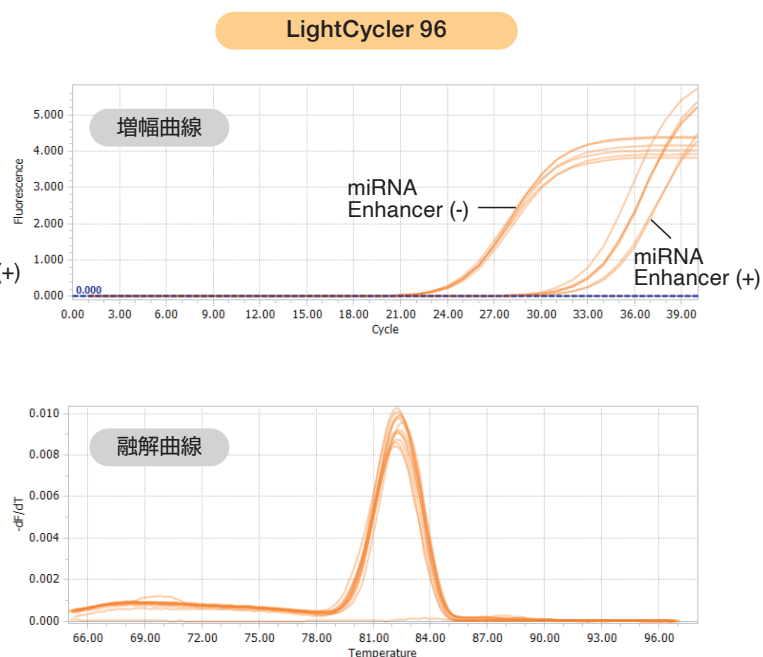
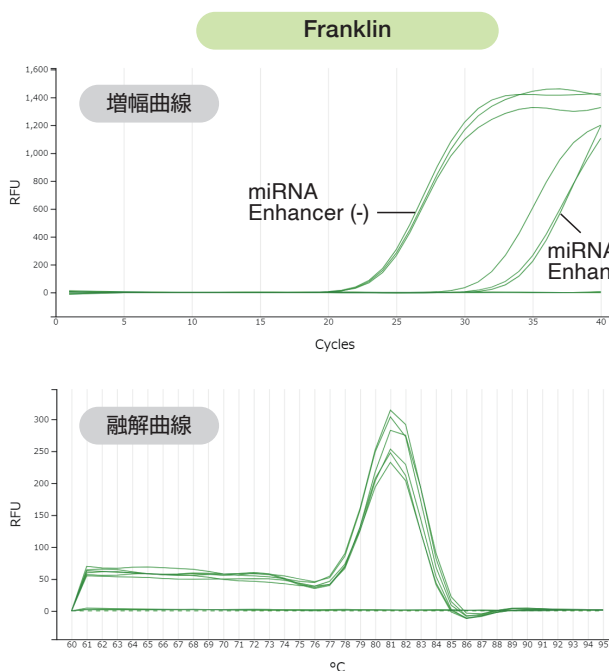
Sample No.	miRNA Enhancer	Franklin	LightCycler 96
No.1	(-)	24.37	28.28
No.2	(-)	24.39	27.76
No.3	(-)	24.29	28.24

Sample No.	miRNA Enhancer	Franklin	LightCycler 96
No.4	(+)	19.31	23.07
No.5	(+)	20.30	23.69
No.6	(+)	20.90	24.51

FranklinとLightCycler 96のどちらにおいても、miRNA Enhancerを添加した場合、Cq値が早くなることが確認できた。

### ● ACT11遺伝子

Franklinはn=1, LightCycler 96はn=2で測定を行った。



Cq値 ※LightCycler 96は、n=2の平均値を算出した。

Sample No.	miRNA Enhancer	Franklin	LightCycler 96
No.1	(-)	20.66	23.84
No.2	(-)	20.26	23.77
No.3	(-)	20.63	23.58

Sample No.	miRNA Enhancer	Franklin	LightCycler 96
No.4	(+)	28.78	31.19
No.5	(+)	31.88	31.57
No.6	(+)	31.26	32.61

FranklinとLightCycler 96のどちらにおいても、miRNA Enhancerを添加した場合、Cq値が遅くなることが確認できた。miRNA Enhancerを添加したことにより、核酸溶液中に含まれるmiRNAの割合が増加したことに反比例して、miRNAを除くtotal RNAの割合が減少したためと考えられる。

### ●まとめ

FranklinとLightCycler 96では解析におけるアルゴリズムが異なるため、得られるCq値も異なるが、miRNA Enhancerを添加した場合、miR-159のCq値は早くなり、ACT11遺伝子のCq値は遅くなるという点で同様の結果を得ることができた。



### お客様のコメント

小型・軽量でありながら通常のリアルタイムPCR装置とほぼ同様の結果が得られました。操作性も簡便で、データの保存や共有化がクラウドベースで可能であり、利便性も優れていると思われます。何よりスペースを取らない点が良いと思います。今回は臨床サンプルでの検討ではありませんが、診療目的の検査も省スペースで対応できる可能性が考えられました。

### 製品紹介



#### Franklin™ Real-Time PCR Thermocycler



1. 最大9サンプルまで同時測定が可能です。



2. スマートフォンでのデータ取得・解析できるだけでなく、クラウドへのデータ転送が可能です。



3. 最大3色 (Green, Red, Amber) までフィルターの追加が可能です。



#### FastGene™ RNA Basic Kit

培養細胞および組織等からのトータルRNA精製キットで、DNase I、プレフィルターを除いたスタンダードキットです。

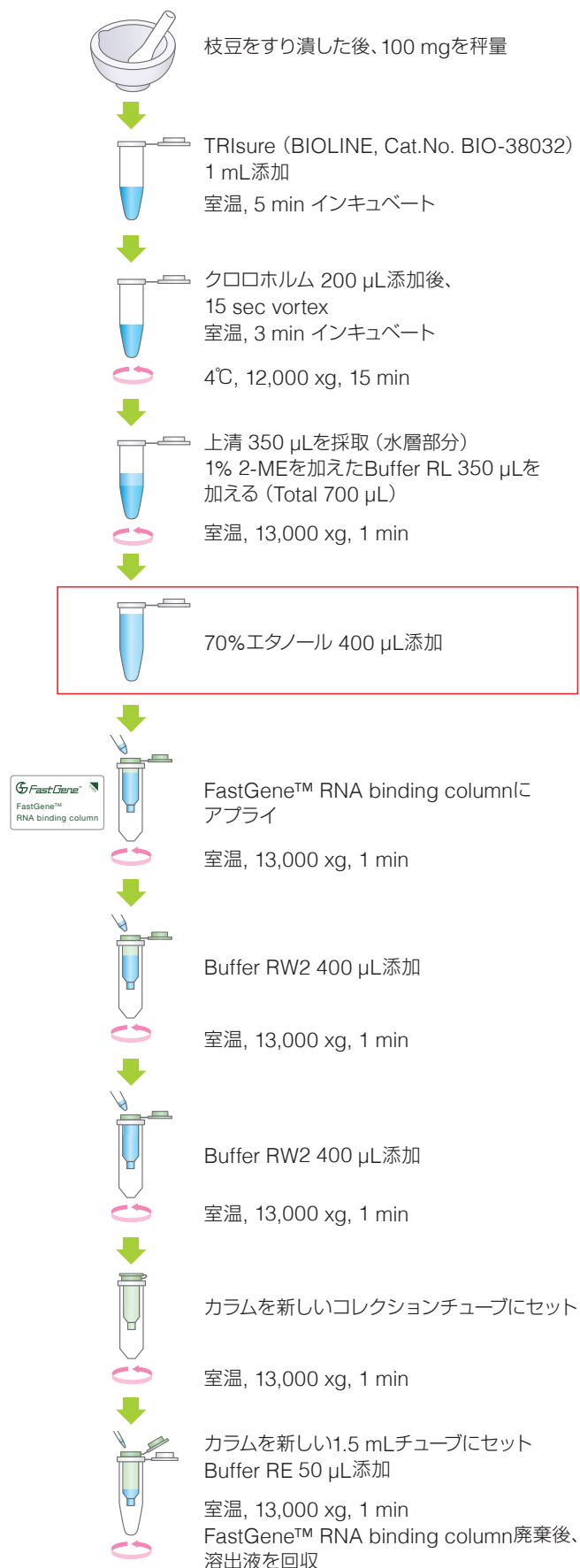


#### FastGene™ miRNA Enhancer

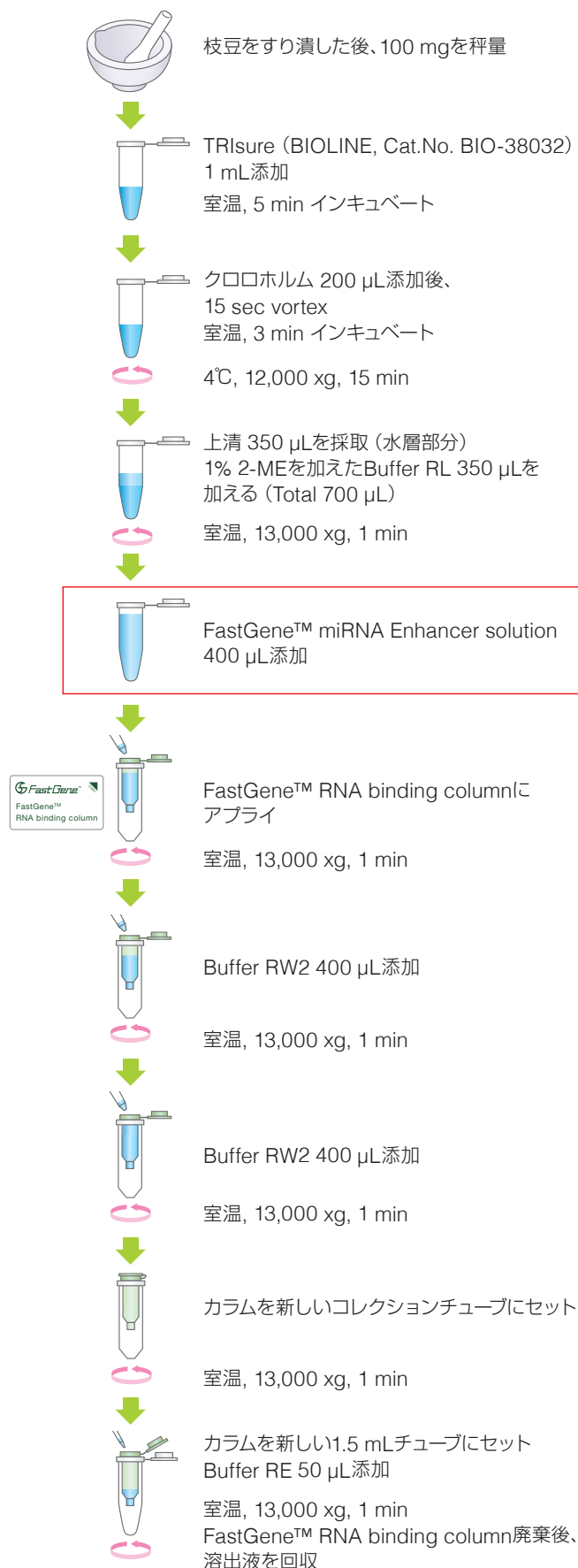
お手持ちのRNAキットに加えるだけで、miRNAを効率的に回収することができる試薬です。  
※ 本製品はスピンカラムを用いた抽出法において、カラムの担体に対してsmall RNAの結合を促進するものです。

# 補足1 : RNA抽出方法

## Sample No. 1-3 : miRNA Enhancer (－)



## Sample No. 4-6 : miRNA Enhancer (+)





## 補足2 : cDNA合成条件, qPCRに使用したプライマー配列

## Stem-Loop RT Primerを用いたcDNA合成 (miR-159で実施)

## ● Stem-Loop RT Primer sequence (5' → 3')

GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGACTGGATACGAAGAGCT

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

## ● 反応組成

Transcriptor RT Reaction Buffer (5×) (Roche)	2 μL
10 μM Stem-Loop RT Primer	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
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 (ACT11遺伝子で実施)

## ● 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

## qPCRで使用したプライマー配列

## ● miR-159

Forward Primer: (5' → 3')

GCGGCGTTGGATTGAAGGG

Reverse Primer: (5' → 3')

GTGCAGGGTCCGAGGT

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

## ● ACT11遺伝子

Forward Primer: (5' → 3')

ATCTTGACTGAGCGTGGTTATTCC

Reverse Primer: (5' → 3')

GCTGGTCCTGGCTGTCTCC

*PLOS One* 2017; 12 (12) : e0189405