



Application

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞の発現定量解析 (プライマーチェック)

製品名 FastGene™ RNA Premium Kit (FG-81050, FG-81250)

メーカー名 日本ジェネティクス株式会社

製品名 Transcriptor Universal cDNA Master (05893151001)

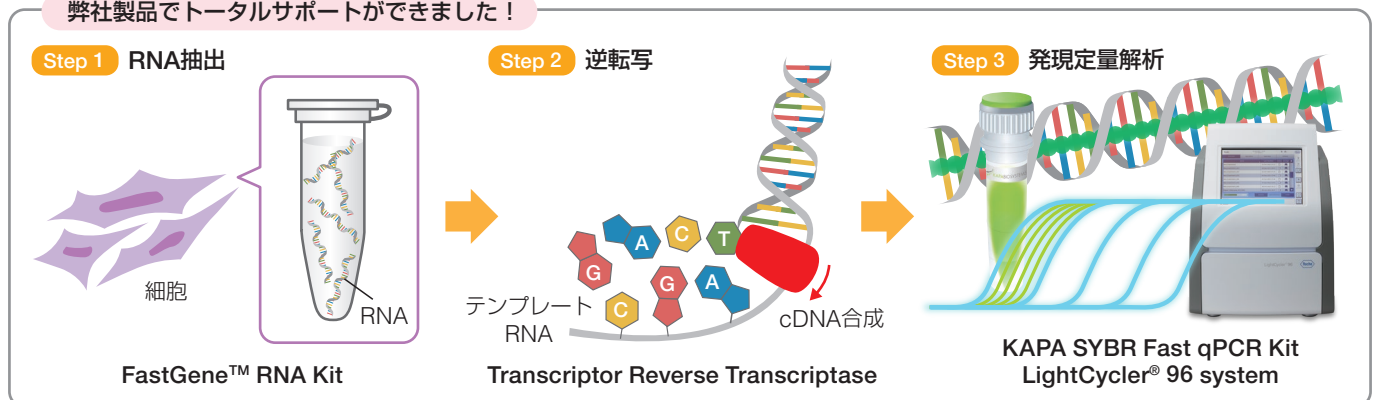
メーカー名 ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社

製品名 KAPA SYBR Fast qPCR Kit (KK4610, KK4611)

メーカー名 KAPA BIOSYSTEMS 社

下記のデータは、学校法人トヨタ学園 豊田工業大学 先端工学専攻 高分子ナノ複合材料研究室 古谷 充 様のご厚意により掲載させていただきました。

弊社製品でトータルサポートができました！



本実験の目的

1) hMSC (ヒト間葉系幹細胞) の軟骨分化と骨分化誘導を実施する予定があるため、事前準備として、hMSC-BM (ヒト骨髄由来間葉系幹細胞) を用いて次の10種類の遺伝子をターゲットにしたプライマーチェックを行った。

遺伝子: ACTB、GAPDH、RUNX2 (2種)、ALPL、Collagen Type I、SP7/Osterix、BGLAP (2種)、SOX9、Aggrecan、Collagen Type II (11種)

2) 逆転写反応の推奨インプットRNA最大値である2.5 µgでもqPCRによる解析に使用できるか検証した (Sample A)。

実験条件

■ RNA抽出 FastGene™ RNA Premium Kit

- 初発サンプル: hMSC-BM (ヒト骨髄由来間葉系幹細胞) 1.8×10^6 cell
- 溶解バッファー RL量: 600 µL
- サンプル前処理: 細胞に溶出バッファー RL (600 µL) を添加して、ホモジナイズせずにボルテックスのみで溶解させた。
- 溶出バッファー RE: 50 µL
- 収量・純度測定: NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific社)

■ 逆転写 Transcriptor Universal cDNA Master

- インプットRNA量: total RNA 1.0 µg (Sample B) または 2.5 µg (Sample A)
- プライマーの種類: ランダムヘキサマープライマー
- 反応組成: RNA

	1.0 µg or 2.5 µg
Transcriptor Universal Reaction Buffer	4 µL
Transcriptor Universal Reverse Transcriptase	1 µL
Distilled Water	up to 20 µL
total	20 µL

- 反応プログラム:
- | | |
|--------|---------------|
| アニーリング | 25°C · 5 min |
| ↓ | |
| 酵素反応 | 55°C · 10 min |
| ↓ | |
| 変性失活 | 85°C · 5 min |

**■ 発現定量解析 KAPA SYBR Fast qPCR Kit**

- インプットcDNA量：DEPC処理水で10倍希釈した逆転写反応液 2 μL (1反応 10 μLあたり)

- リアルタイム装置：LightCycler® 96

- 反応組成：

cDNA	2 μL
KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2X)	5 μL
10 μM forward primer	0.2 μL
10 μM reverse primer	0.2 μL
PCR-grade water	Up to 10 μL
total	10 μL

- 反応プログラム：

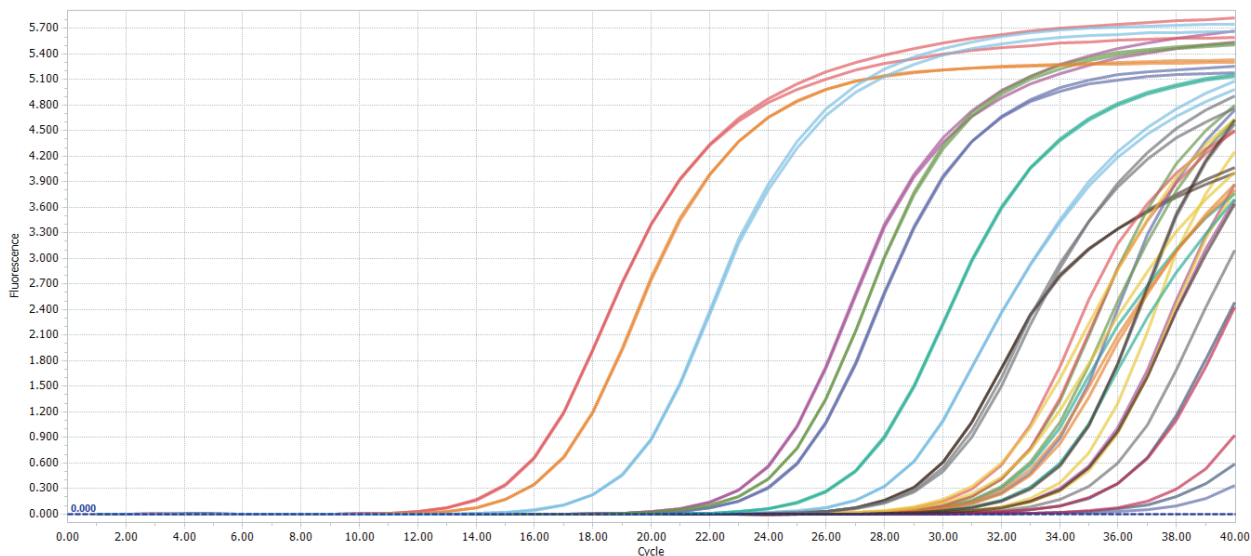
初期変性	95°C · 3 min
↓	
変性	95°C · 10 sec
アニーリング	60°C · 20 sec
伸長反応	72°C · 1 sec
↓	
メルティング	
↓	
クーリング	40°C · 10 sec

結果**1. RNA抽出**

溶出バッファー量 (μL)	濃度 (ng/μL)	A260/A280	A260/A230	A260	A280
50	474.82	2.07	2.23	11.87	5.74

2. 発現定量解析**Sample A (RNA 2.5 μg)**

以下のとおり、全てのプライマーでそれぞれのターゲットを検出できた

● 増幅曲線**● Cq値とポジティブ/ネガティブ判定**

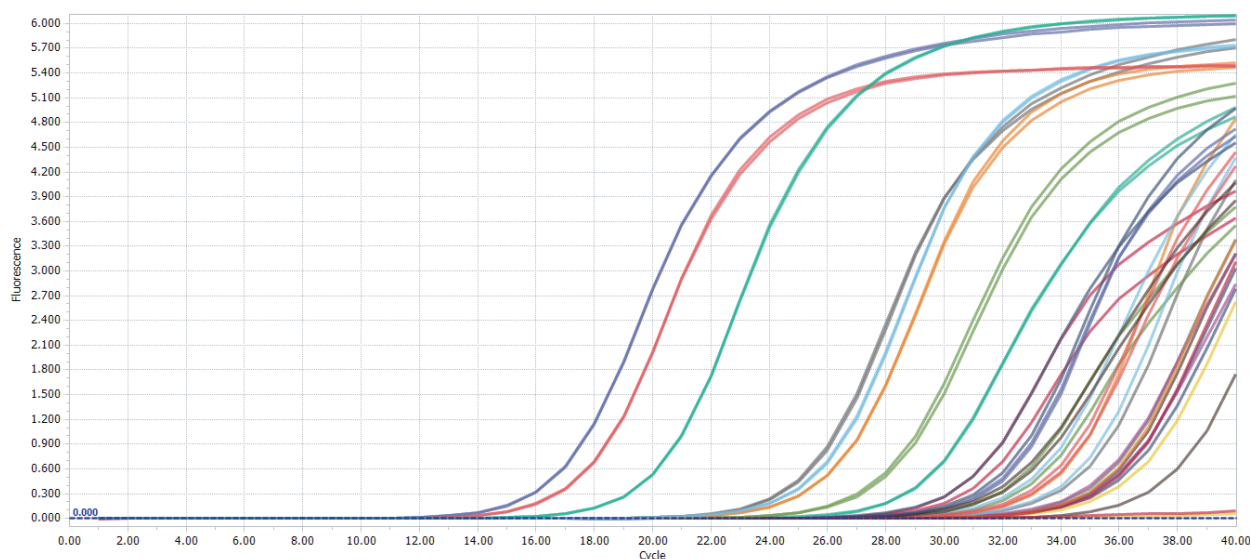
プライマー	No.	Cq値	結果	プライマー	No.	Cq値	結果	プライマー	No.	Cq値	結果	プライマー	No.	Cq値	結果
GAPDH	1	17.85	Positive	SP7	1	33.48	Positive	Col2 9/4_2	1	27.30	Positive	Col2 A	1	28.41	Positive
	2	17.89	Positive		2	32.48	Positive		2	27.30	Positive		2	28.39	Positive
ACTB	1	15.28	Positive	Bglap1	1	28.53	Positive	Col2 9/4_3	1	31.76	Positive	Col2 B	1	32.38	Positive
	2	15.27	Positive		2	28.66	Positive		2	31.53	Positive		2	34.27	Positive
RUNX2_1	1	22.98	Positive	Bglap3	1	30.24	Positive	Col2 9/4_4	1	31.32	Positive	Col2 C	1	33.62	Positive
	2	22.98	Positive		2	30.73	Positive		2	30.95	Positive		2	33.17	Positive
RUNX2_2	1	23.41	Positive	SOX9	1	22.53	Positive	Col2 8/30_1	1	39.03	Positive	Col2 D	1	33.48	Positive
	2	23.39	Positive		2	22.54	Positive		2	31.74	Positive		2	33.41	Positive
ALPL	1	25.59	Positive	Aggrecan	1	37.41	Positive	Col2 8/30_2	1	31.43	Positive				
	2	25.63	Positive		2	35.06	Positive		2	32.34	Positive				
Col1	1	14.26	Positive	Col2 9/4_1	1	31.00	Positive	Col2 8/30_3	1	35.11	Positive				
	2	14.30	Positive		2	30.48	Positive		2	37.93	Positive				



Sample B (RNA 1.0 µg)

以下のとおり、ほとんどのプライマーでそれぞれのターゲットを検出できた

● 増幅曲線



● Cq値とポジティブ/ネガティブ判定

プライマー	No.	Cq値	結果	プライマー	No.	Cq値	結果	プライマー	No.	Cq値	結果	プライマー	No.	Cq値	結果
GAPDH	1	18.66	Positive	SP7	1	34.60	Positive	Col2 9/4_2	1	28.12	Positive	Col2 A	1	29.66	Positive
	2	18.67	Positive		2	-	Negative		2	28.17	Positive		2	30.15	Positive
ACTB	1	16.24	Positive	Bglap1	1	30.51	Positive	Col2 9/4_3	1	32.22	Positive	Col2 B	1	34.47	Positive
	2	16.22	Positive		2	29.61	Positive		2	32.47	Positive		2	34.67	Positive
RUNX2_1	1	24.15	Positive	Bglap3	1	30.95	Positive	Col2 9/4_4	1	33.04	Positive	Col2 C	1	36.38	Positive
	2	24.21	Positive		2	31.28	Positive		2	31.69	Positive		2	34.41	Positive
RUNX2_2	1	24.60	Positive	SOX9	1	23.90	Positive	Col2 8/30_1	1	32.56	Positive	Col2 D	1	34.11	Positive
	2	24.61	Positive		2	23.81	Positive		2	34.34	Positive		2	33.22	Positive
ALPL	1	26.45	Positive	Aggrecan	1	34.99	Positive	Col2 8/30_2	1	31.92	Positive				
	2	26.61	Positive		2	-	Negative		2	31.29	Positive				
Col1	1	15.39	Positive	Col2 9/4_1	1	30.70	Positive	Col2 8/30_3	1	34.37	Positive				
	2	15.37	Positive		2	30.85	Positive		2	33.96	Positive				

総評

- LightCycler® 96 system (高性能、簡易操作)
 - ・メルトカーブに時間をかけないため、実験時間が短縮できて良い
 - ・タッチパネルでの操作が簡単のため、初心者でもつかいやすい
 - ・ソフトウェアも excel との互換があるなど、非常に使いやすい
- FastGene™ RNA Premium Kit (安価、高品質)
 - ・gDNA 除去をオンカラムでなく一度溶出させてから行うのは正直手間だと感じた
 - しかし、丁寧に扱うため手慣れていなくてももしっかりと gDNA を除去できる安心感がある
 - ・カラムが複数種類あるがプロトコルで色分けされており分かり易かった
 - ・従来品よりも反応時間が大幅に減少して数をこなしやすくなった
 - ・Q 社 RNA 精製キットと同等以上の品質で値段が安く満足
- Transcriptor Universal cDNA Master (簡便、高性能)
 - ・プレミックスの試薬で 2 種類の試薬と RNA を混合するだけで簡便に、しかも高品質に cDNA を合成することができ大変満足
 - 当研究室は PCR 初心者ばかりのため、簡単な操作で済むのは大変ありがたい
- KAPA SYBR Fast qPCR Kit (安価、高感度)
 - ・T 社 qRT-PCR キット (細胞用) よりもきれいに検量線を引くことができた



お客様のコメント

LightCycler®を購入し、Roche社の試薬を販売する日本ジェネティクスに相談したところ、安価で品質が良いとおすすめされたため、RNA精製では手間がかかるが、初心者の多い研究室でもしっかりと精製できているため満足です。