



Technical Data

FastGene™ RNA Basic / Premium Kit を用いた DNase I 処理プロトコルの検証

評価製品

FastGene™ RNA Basic kit	6回用	Cat.No.FG-80006
	50回用	Cat.No.FG-80050
	250回用	Cat.No.FG-80250
FastGene™ RNA Premium kit	6回用	Cat.No.FG-81006
	50回用	Cat.No.FG-81050
	250回用	Cat.No.FG-81250

目的

FastGene™ RNA Premium kitで推奨している「溶出後にDNase I 処理するプロトコル」とオプションとして用意した「カラム上でのDNase I 処理（オンカラムDNase I 処理）」を比較して、その優位性を評価しました。

背景

一般的にシリカメンブレンカラム法でのRNA 精製ではDNase I 処理が必須とはされていません。しかしDNA 感受性が高いダウンストリームアプリケーションの場合、次のDNase I 処理方法を選択することができます。

- * 溶出後にDNase I 処理：FastGene™ RNA Premium Kitスタンダードプロトコル
- * カラム上でのDNase I 処理(オンカラムDNase I 処理)：オプションプロトコル

<溶出後にDNase I 処理>

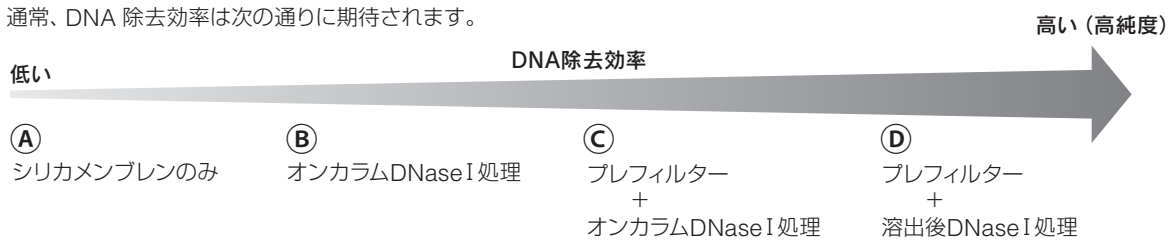
FastGene™ RNA Premium Kitで推奨している方法です。

本方法の場合、RNA を通常の操作どおりにカラム精製を行っているため、塩類などの不純物は除去されます。このように高純度核酸をDNase I 酵素反応に最も適した条件下で処理を行うため、安定して高いDNA 除去効率が期待できます。

<カラム上でのDNase I 処理（オンカラムDNase I 処理）>

操作の簡便性から実施されることが多い方法で、具体的には、RNA をカラムに結合後、カラム上でDNase I 処理を行います。カラムによるRNA 精製では、RNA は塩濃度の高いバッファーを使用することにより、シリカメンブレンに結合させます。しかし、この高塩濃度のバッファーは、DNase I 処理においては、酵素活性に悪影響を与えます。このため、オンカラムでDNase I 処理をする際には、塩類の除去のために、いったんシリカメンブレンを適切な洗浄バッファーで洗浄する必要があります。塩類の除去が不十分な場合、DNase I 活性が影響を受け、DNA の除去効率が下がります。一方で、塩濃度が低いバッファーでは、RNA の結合が弱くなってしまいうため、RNA の収量に影響が出るリスクがあります。

通常、DNA 除去効率は次の通りに期待されます。



本技術資料では、これらのDNA 除去効率が上記の通りの結果になることを示した一例をご紹介します。

実験条件

サンプル: Jurkat 細胞
5×10⁵ cells /prep
n=3

評価ポイント:
① 収量
② RIN 値
③ ゲノムDNA 残留率

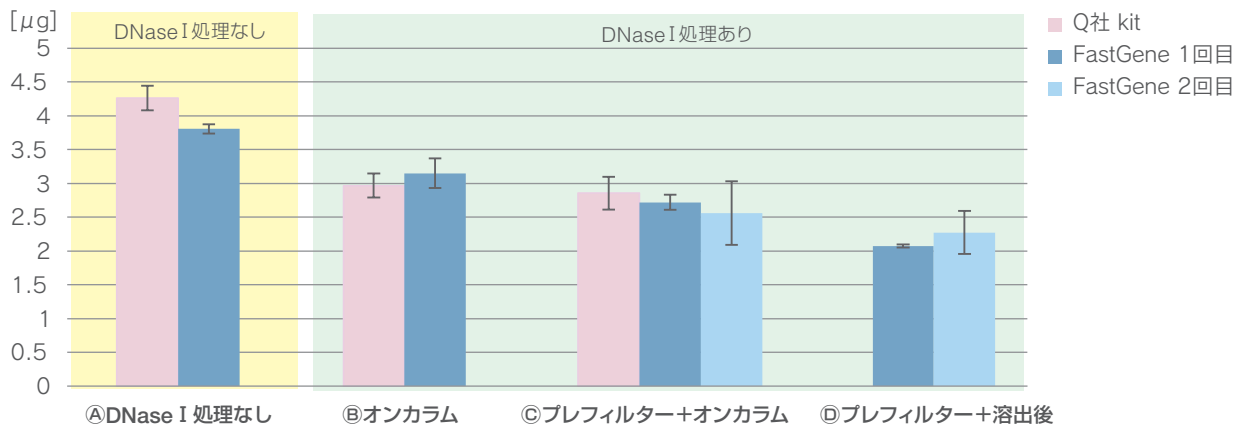
テスト条件:

キット名	DNase I 処理
FastGene™ Basic kit	(A) なし
	(B) オンカラム
FastGene™ Premium kit	(C) プレフィルター + オンカラム
	(D) プレフィルター + 溶出後
Q社 kit	(A) なし
	(B) オンカラム
	(C) プレフィルター + オンカラム

結果

① 収量

キット名	DNase I 処理	1回目		2回目 *	
		収量 平均値 [μg]	収量 標準偏差	収量 平均値 [μg]	収量 標準偏差
FastGene™ Basic kit	① なし	3.81	0.07		
	② オンカラム	3.15	0.22		
FastGene™ Premium kit	③ プレフィルター + オンカラム	2.72	0.11	2.56	0.47
	④ プレフィルター + 溶出後	2.07	0.02	2.27	0.32
Q社 kit	① なし	4.26	0.18		
	② オンカラム	2.97	0.18		
	③ プレフィルター + オンカラム	2.85	0.24		



* 1回目のテストで、オンカラム DNase I 処理の結果が考察していた結果よりもよかったため、2回目のテストを行い、再現性試験を行いました。

同一条件であればどのキットの収量も同様の傾向を示しました。

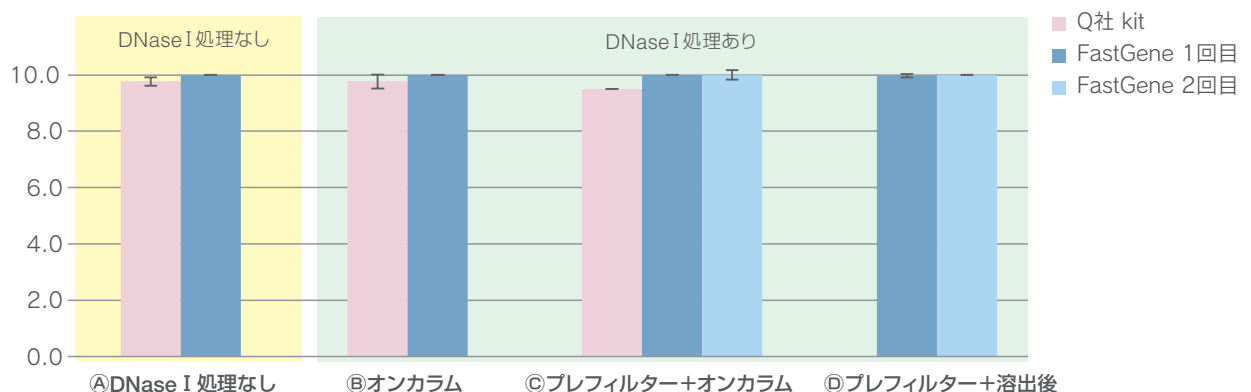
収量は、下記の順でした

① DNase I 処理なし > ② オンカラム DNase I 処理 > ③ プレフィルター + オンカラム DNase I 処理 > ④ プレフィルター + 溶出後 DNase I 処理

この理由は、ゲノム DNA の残留量による影響が含まれたと考えられます。

② RIN 値

キット名	DNase I 処理	1回目		2回目 *	
		RIN 値 平均値	RIN 値 標準偏差	RIN 値 平均値	RIN 値 標準偏差
FastGene™ Basic kit	① なし	10	0		
	② オンカラム	10	0		
FastGene™ Premium kit	③ プレフィルター + オンカラム	10	0	10	0.2
	④ プレフィルター + 溶出後	10	0.1	10	0
Q社 kit	① なし	9.8	0.2		
	② オンカラム	9.8	0.3		
	③ プレフィルター + オンカラム	9.5	0		



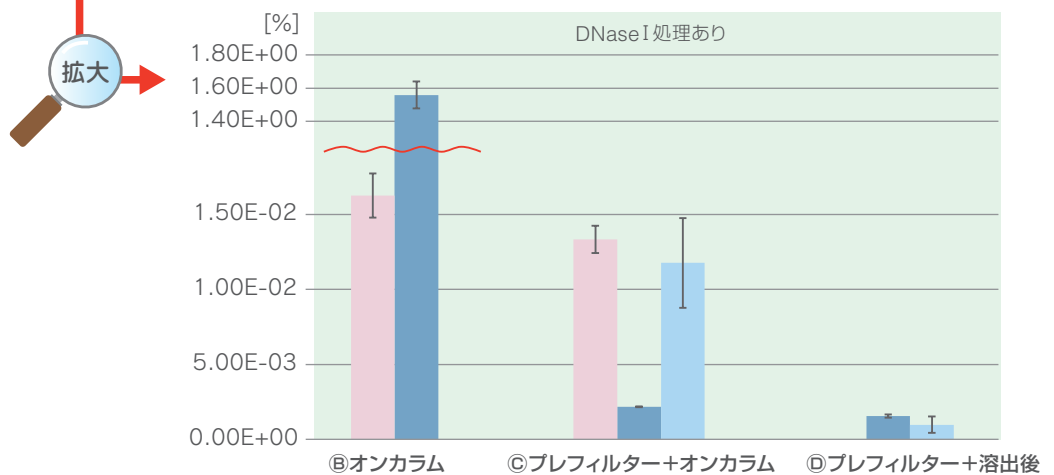
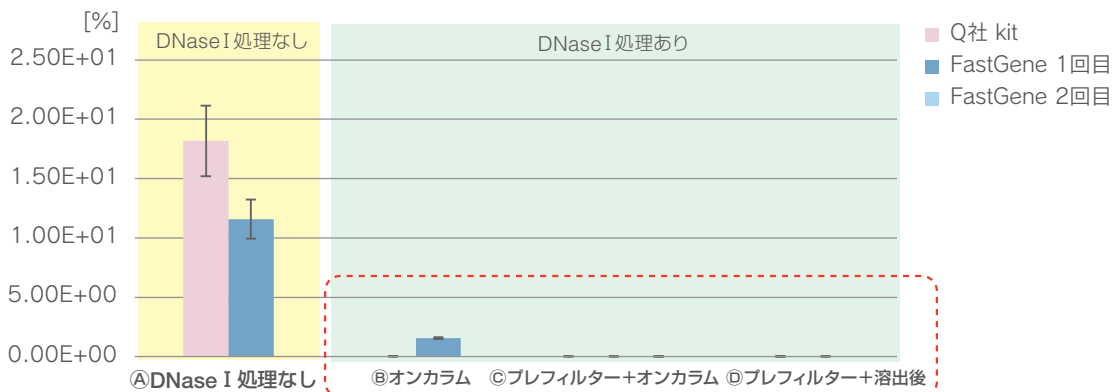
RIN 値はどの条件でも同様の傾向を示しました。

③ ゲノムDNA残留率

吸光度(Abs.)とリアルタイムPCRの結果よりゲノムDNAの残留量を計算

$$\text{残留ゲノムDNA率 [\%]} = \frac{\text{リアルタイムPCRによる残留ゲノムDNA量 [ng]}}{\text{吸光度(Abs.)によるRNAの量 [ng]}} \times 100$$

キット名	DNase I 処理	1回目		2回目 *	
		ゲノムDNA 残留率 平均値 [%]	ゲノムDNA 残留率 標準偏差	ゲノムDNA 残留率 平均値 [%]	ゲノムDNA 残留率 標準偏差
FastGene™ Basic kit	① なし	1.16×10	1.65		
	② オンカラム	1.56	8.07×10 ⁻²		
FastGene™ Premium kit	③ プレフィルター + オンカラム	2.16×10 ⁻³	2.36×10 ⁻⁵	1.18×10 ⁻²	3.00×10 ⁻³
	④ プレフィルター + 溶出後	1.55×10 ⁻³	1.09×10 ⁻⁴	9.74×10 ⁻⁴	5.41×10 ⁻⁴
Q社 kit	① なし	1.82×10	2.98		
	② オンカラム	1.63×10 ⁻²	1.47×10 ⁻³		
	③ プレフィルター + オンカラム	1.33×10 ⁻²	9.13×10 ⁻⁴		



他の条件と比較すると弊社が想定した傾向が確認でき、溶出後にDNase I処理したほうが、ゲノム残留率が低く、またその再現性も高いことが示唆されました。

まとめ

今回の実験により、下記の結果が得られました。

- 収量：
 - ① DNase I 処理なし > ② オンカラム DNase I 処理 > ③ プレフィルター+オンカラム DNase I 処理 > ④ プレフィルター+溶出後 DNase I 処理
- RIN 値：
 - どの条件でも同様の傾向
- ゲノム DNA 除去効率：
 - ④ プレフィルター+溶出後 DNase I 処理 > ③ プレフィルター+オンカラム DNase I 処理 > ② オンカラム DNase I 処理 > ① DNase I 処理なし

これらの結果により、本条件においては、FastGene™ RNA Premium Kitで推奨している「溶出後DNase I処理」がゲノムDNA除去に効果的であることが示されました。