

お客様からの製品フィードバック

製品名：FastGene™ RNA Basic Kit (FG-80050, FG-80250)

メーカー名：日本ジェネティクス株式会社

アプリケーション：Neuro2a細胞（マウス由来Neuroblastoma）を用いたRNA精製の検討（リアルタイムqPCRによる確認）

下記のデータは、国立研究開発法人 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 疾病研究第五部様のご厚意により、掲載させていただきました。

方法

マウス由来のNeuroblastoma Neuro2a細胞を6つに分け（1チューブあたり1,000,000 cells）、それぞれ3つずつからQ社キットとFastGene™ RNA BasicキットによるRNA精製を行った。
RNA 1μgをTOYOBO社のReverTra Aceを用いて20μLの反応系で逆転写した。逆転写反応サンプルをMQ水で20倍希釈し、1μLをqPCRに供した。
qPCR反応にはTOYOBO社のTHUNDERBIRD SYBR qPCR Mixを用い、actinおよびGeneAを目的遺伝子としてApplied Biosystems社 7300 Real-Time PCR Systemで増幅、測定した。

条件

1. RNA精製

サンプルの種類 : Neuro2a細胞（マウス由来Neuroblastoma）
サンプル量 : 1.0×10⁶ cells / prep
RNA精製キット : ①Q社キット、②FastGene™ RNA Basic Kit (各n=3)
DNase I 処理 : ①、②とも未実施
RNA溶出バッファ一量 : ①、②とも30μL

2. 逆転写反応

インプットRNA量 : 1μg（1反応20μLあたり）
逆転写酵素 : ReverTra Ace（TOYOBO社）

反応組成：

| | |
|-------------------------------|-------|
| total RNA | 1μg |
| Random Primers (25 pmoles/μl) | 1μl |
| 5×Buffer | 4μl |
| 10mM dNTPs | 2μl |
| ReverTra AceR (100units/μl) | 1μl |
| (Total Volume) | 20μl) |

反応プログラム：

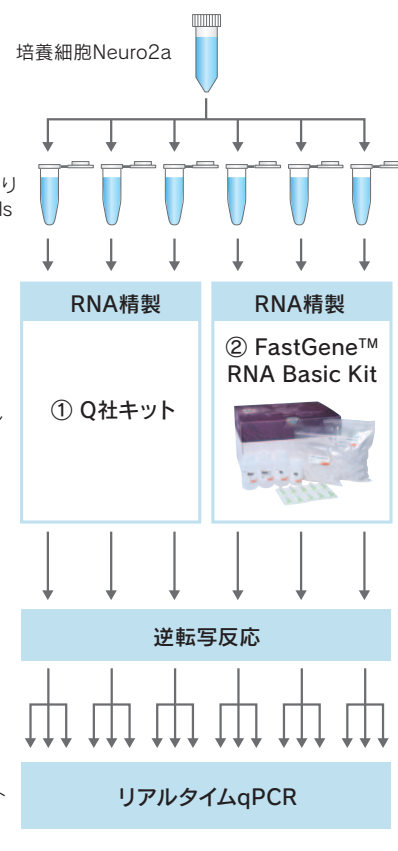
アニーリング 30℃・10min
↓
酵素反応 42℃・30min
↓
変性 99℃・5min

・n=3
・DNase I 処理なし
・30μL溶出

3. リアルタイムqPCR

インプットcDNA量 : 20倍希釈した逆転写反応液1μL（1反応 20μLあたり）
qPCR試薬 : THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix（TOYOBO社）
qPCR装置 : Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System

【検討方法ワークフロー】



結果

収量と純度

| RNA sample | | yield | | purity | |
|------------|---|---------|-----------|----------|----------|
| | | (μg) | Mean (μg) | A260/280 | A260/230 |
| Q社 | 1 | 17.6625 | 18.7547 | 2.05 | 2.31 |
| | 2 | 18.4535 | | 2.05 | 2.47 |
| | 3 | 20.1480 | | 2.04 | 2.50 |
| FastGene™ | 1 | 18.9745 | 19.8202 | 2.08 | 2.33 |
| | 2 | 21.4340 | | 2.06 | 2.49 |
| | 3 | 19.0520 | | 2.07 | 2.42 |

NanoDrop
(Thermo Scientific™ 社)にて測定

Q社キットとの比較において、収量、純度ともほとんど差はない。

qPCR結果 1: **actin**

| Sample | | Ct | Mean | Mean Ct | StdDev Ct | P value |
|-----------|---|---------|---------|---------|-----------|---------|
| Q 社 | 1 | 16.1606 | 16.1369 | 16.3551 | 0.29728 | 0.11140 |
| | | 16.2475 | | | | |
| | | 16.0027 | | | | |
| | 2 | 16.2128 | 16.2347 | | | |
| | | 16.3102 | | | | |
| | | 16.1810 | | | | |
| | 3 | 16.7193 | 16.6937 | | | |
| | | 16.5803 | | | | |
| | | 16.7815 | | | | |
| FastGene™ | 1 | 15.9163 | 15.8943 | 15.8970 | 0.05795 | 0.11140 |
| | | 15.8641 | | | | |
| | | 15.9024 | | | | |
| | 2 | 15.9028 | 15.9563 | | | |
| | | 15.8711 | | | | |
| | | 16.0950 | | | | |
| | 3 | 15.9139 | 15.8405 | | | |
| | | 15.8597 | | | | |
| | | 15.7479 | | | | |

qPCR結果 2: **Gene A**

| Sample | | Ct | Mean | Mean Ct | StdDev Ct | P value |
|-----------|---|---------|---------|---------|-----------|---------|
| Q 社 | 1 | 21.7528 | 21.7298 | 21.9913 | 0.34464 | 0.17405 |
| | | 21.5308 | | | | |
| | | 21.9058 | | | | |
| | 2 | 22.3860 | 22.3819 | | | |
| | | 22.5230 | | | | |
| | | 22.2366 | | | | |
| | 3 | 21.5057 | 21.8623 | | | |
| | | 22.2444 | | | | |
| | | 21.8369 | | | | |
| FastGene™ | 1 | 21.4406 | 21.4551 | 21.5940 | 0.13235 | 0.17405 |
| | | 21.5040 | | | | |
| | | 21.4208 | | | | |
| | 2 | 21.2879 | 21.6081 | | | |
| | | 21.8181 | | | | |
| | | 21.7182 | | | | |
| | 3 | 21.9397 | 21.7187 | | | |
| | | 21.5256 | | | | |
| | | 21.6908 | | | | |

Q社キットとの比較において、qPCRの結果もほとんど差がない (P>0.05)。

<お客様のコメント>

Q社製品をこれまで用いていたが、FastGene™ RNABasicキットは操作性も良く、また収量、純度も遜色ない結果が得られた。