

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：褐色脂肪組織からのRNA抽出（応用事例）

下記のデータは、国内のお客様のご厚意により掲載させていただきました。

本アプリケーションノートのポイント

RNA精製において、ダウンストリームに必要な品質・量のRNAを精製するためには最初のステップであるホモジナイズが完全に実施されることが重要です。

一般的なRNA精製キットにおいて、溶解バッファーを用いたホモジナイズの操作は、物理的に細胞や組織を破碎するだけでなく、細胞に含まれるRNaseの不活性化をするために行われます。特に脂肪組織などRNaseを多量に含むような組織や細胞では、ホモジナイズの操作でいかに早く完全にRNaseを不活性化するかが、良質のRNAを精製する上でのポイントとなります。

FastGene RNA Kitの応用事例として、脂肪組織を用いたRNA精製をご紹介します。



ワークフロー



実験条件

■ サンプル情報

マウス 肩甲骨間褐色脂肪組織 30 - 50 mg

■ ここがポイント！

■ ホモジナイズ条件

RL buffer 600 μL + 1 M DTT 40 μL 組織片を添加

↓
電動ホモジナイザーによるホモジナイズ (17700×gで5分間遠心)

↓
上清400 μL程度分取後70% EtOH 400 μLと混合
※上清分取の際に脂肪分をとらないように注意！

■ 収量・純度測定

装置：SimpliNano (Biochrom社)

■ 品質チェック

試薬：Agilent RNA 6000 Nano Chips

装置：Agilent 2100 Bioanalyzer

■ 逆転写反応

インプットRNA量：0.5 μg (1反応10 μLあたり)

逆転写酵素：ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover
(Code No. FSQ-301)

■ リアルタイムPCR条件

インプットcDNA量：200倍希釈物を5 μL (1反応15 μLあたり)

試薬：KAPA SYBR Fast qPCRキット (Universal qPCRキット)

装置：LightCycler 96

● 反応組成

KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2X)	7.5 μL
10 μM forward primer	0.5 μL
10 μM reverse primer	0.5 μL
Template DNA	5 μL
MQ water	1.5 μL
total	15 μL

● プログラム

Initial denature	95 °C	10 min	} 45 cycles
Denature	95 °C	10 sec	
Annealing	60 °C	10 sec	
Extension	72 °C	10 sec	
Melting			



結果

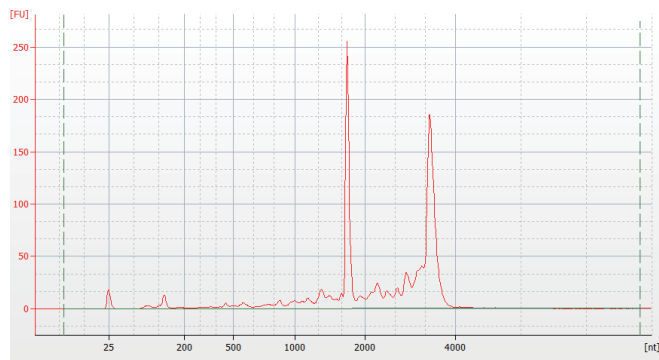
結果① 収量・純度測定

サンプル	溶出量	濃度	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₂₃₀
1	50 μL	392.3 ng/μL	2.08	2.28	9.84	4.76	4.33
2		305.2 ng/μL	2.11	2.26	7.70	3.69	3.45
3		196.2 ng/μL	2.07	2.24	5.04	2.50	2.33

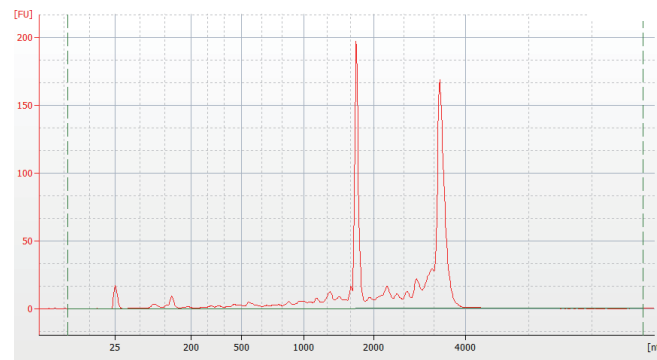
結果② 品質チェック (RIN 値, 28S/18S)

サンプル	RIN 値	28S/18S
1	8.6	1.4
2	8.8	1.5
3	8.9	1.5

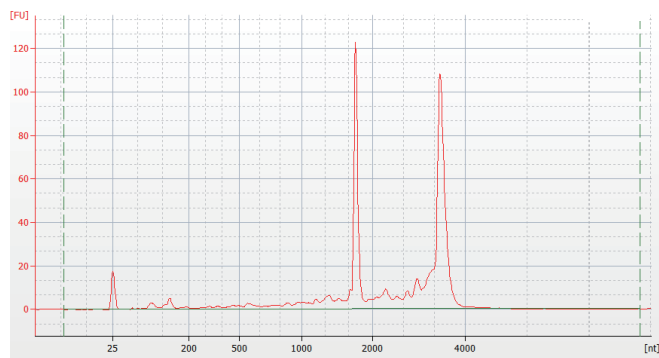
サンプル 1



サンプル 2

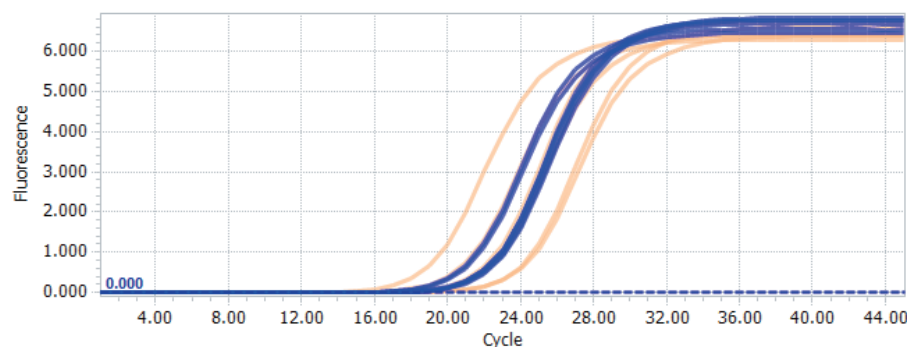


サンプル 3



褐色脂肪組織から十分な純度と収量のRNAが得られた。
また、リアルタイムPCRでも期待どおりの結果が得られた。

結果③ リアルタイム PCR



■ サンプル
■ 検量線作成の希釈系列

サンプル	Cq	Cq Mean
1	19.24	19.36
	19.47	
2	21.05	20.94
	20.83	
3	20.59	20.66
	20.73	

<お客様のコメント>

フェノールとチオシアン酸グアニジンを用いた方法に比べ、簡便に高純度なRNAが十分量精製できます。