

技術資料 (Technical Data Sheet)

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

- **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。
- **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

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>

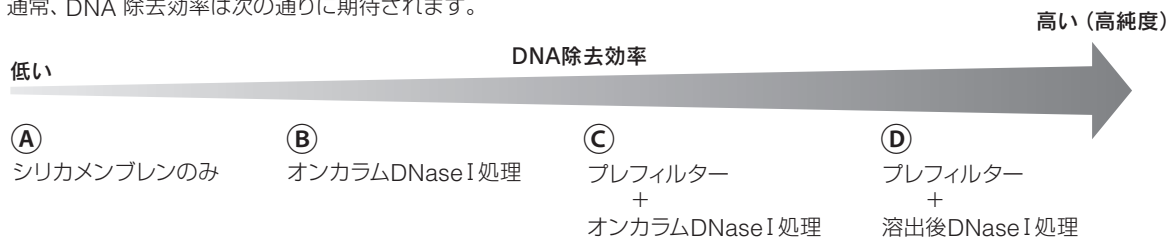
FastGene™ RNA Premium Kitで推奨している方法です。

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

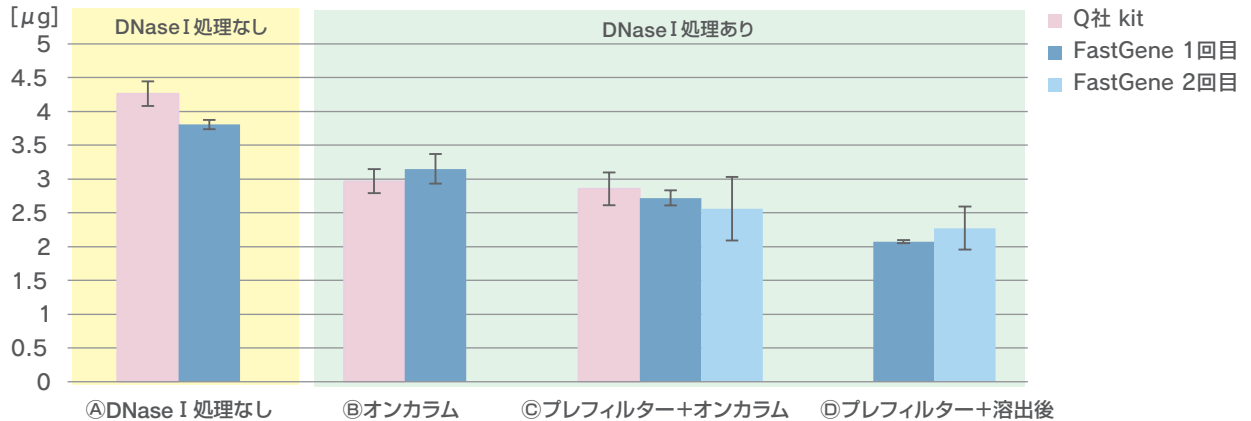
テスト条件:

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 + オンカラム
	(D) プレフィルタ + 溶出後
Q社 kit	(A) なし
	(B) オンカラム
	(C) プレフィルタ + 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。

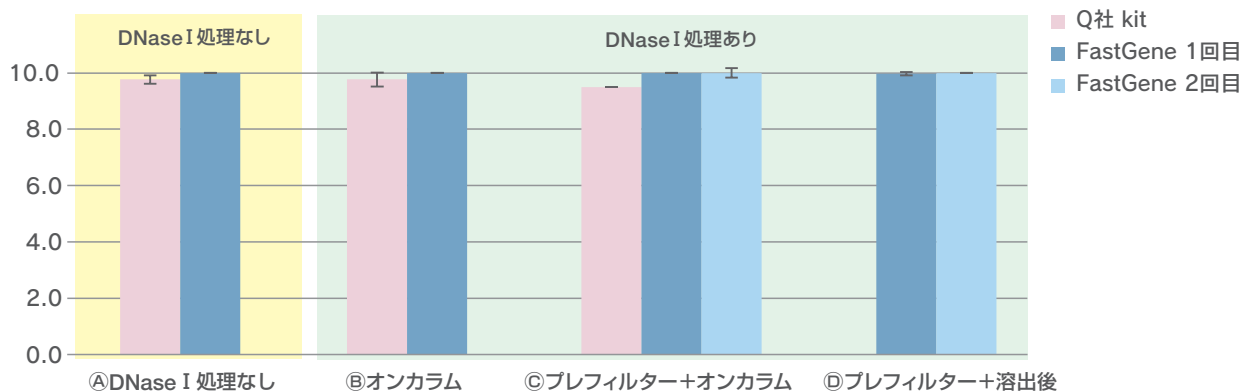
収量は、下記の順でした

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		



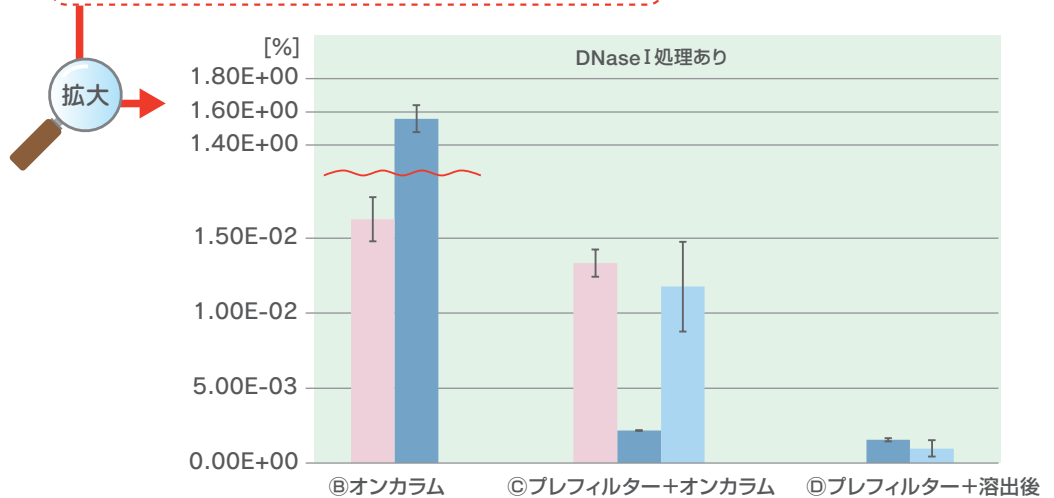
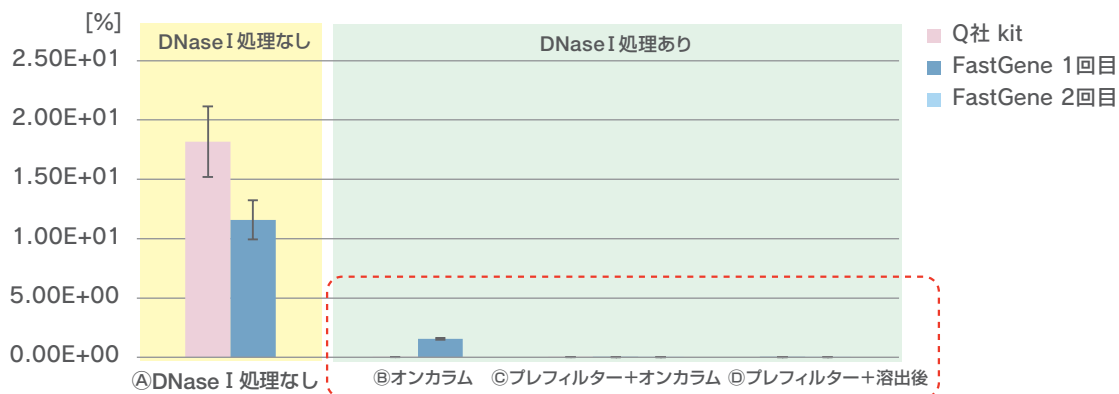
RIN 値はどの条件でも同様の傾向を示しました。

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	Ⓐ なし	1.16×10	1.65		
	Ⓑ オンカラム	1.56	8.07×10 ⁻²		
FastGene™ Premium kit	Ⓒ プレフィルタール + オンカラム	2.16×10 ⁻³	2.36×10 ⁻⁵	1.18×10 ⁻²	3.00×10 ⁻³
	Ⓓ プレフィルタール + 溶出後	1.55×10 ⁻³	1.09×10 ⁻⁴	9.74×10 ⁻⁴	5.41×10 ⁻⁴
Q社 kit	Ⓐ なし	1.82×10	2.98		
	Ⓑ オンカラム	1.63×10 ⁻²	1.47×10 ⁻³		
	Ⓒ プレフィルタール + 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：
Ⓐ DNase I 処理なし > Ⓑ オンカラム DNase I 処理 > Ⓒ プレフィルタール + オンカラム DNase I 処理 > Ⓓ プレフィルタール + 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：
Ⓓ プレフィルタール + 溶出後 DNase I 処理 > Ⓒ プレフィルタール + オンカラム DNase I 処理 > Ⓑ オンカラム DNase I 処理 > Ⓐ 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。