



Application

FastGene™ RNA Premium kitを用いた 少数細胞数 (1000個) からのRNA抽出方法の検討

製品名

FastGene™ RNA Premium Kit (FG-81050, FG-81250)
FastGene™ Scriptase II Master Mix (5X) (NE-LS64)

メーカー名

FastGene™

下記のデータは、京都大学のお客様のご厚意により掲載させて頂きました。

概要

FastGene™ RNA Premium kitは細胞から抽出する際に、スタンダードプロトコルで 5×10^6 培養細胞、ラージインプットプロトコルで 1×10^7 培養細胞の細胞数から抽出することを推奨したキットである。本アプリケーションノートでは、FastGene™ RNA Premium kitを用いて少数細胞数 (1×10^3 培養細胞) からRNAを抽出するプロトコルを検討し、Q社微量RNA精製キットと比べて同等以上の収量およびCt値を得られた一例を報告する。

実験条件

1. RNA精製

サンプル種 : マウス胎児線維芽細胞 (MEF)
 サンプル量 : おおよそ1000個/サンプル
 RNA精製キット : ① Q社キット ② FastGene™ RNA Premium Kit
 DNase I 処理 : ①、②とも未実施
 RNA溶出バッファー量 : ①、②とも20 μ L

RNA回収方法:

- TRIzolサンプルヘクロホルムを100 μ L加えボルテックス後、15 min室温で遠心した
- その上清200 μ Lを70% EtOH 200 μ Lと混合し、Q社またはFastGene™のカラムへ乗せた (total 400 μ L)
- スピンドウン (室温、max、 \sim 30 s)

(Q社キットの場合、n = 3)

- Flow throughを捨て、カラムを再装着し、RW1 700 μ Lを加えてスピンドウン (室温、max、 \sim 30 s)
- Flow throughを捨て、カラムを再装着し、RPE 500 μ Lを加えてスピンドウン (室温、max、 \sim 30 s)
- Flow throughを捨て、カラムを再装着し、80% EtOH 500 μ Lを加えてスピンドウン (室温、max、 \sim 30 s)
- 新しい廃液チューブにカラムを装着し、スピンドウン (室温、max、1 min)
- 新しい1.5 mLチューブにカラムを装着し、RNase-free water 20 μ Lをフィルターへ加え、室温で3 min程度静置
- 室温、max、1 minで遠心し、Flow throughを回収

(FastGene™ RNA Premium (簡略プロトコル) の場合、n = 3)

- Flow throughを捨て、カラムを再装着し、RW1 600 μ Lを加えてスピンドウン (室温、max、 \sim 30 s)
- 新しい廃液チューブにカラムを装着し、RW2 700 μ Lを加えてスピンドウン (室温、max、 \sim 30 s)
- 新しい廃液チューブにカラムを装着し、スピンドウン (室温、max、1 min)
- 新しい1.5 mLチューブにカラムを装着し、RE 20 μ Lをフィルターへ加え、室温で3 min程度静置
- 室温、max、1 minで遠心し、Flow throughを回収

RNA濃度測定方法:

Qubit4を用いて、RNA HS Assay Kitによって濃度測定した
 測定にあたり、Q社サンプルは10 μ L、FastGene™サンプルは3 μ Lを持ち込んで測定した

2. 逆転写反応

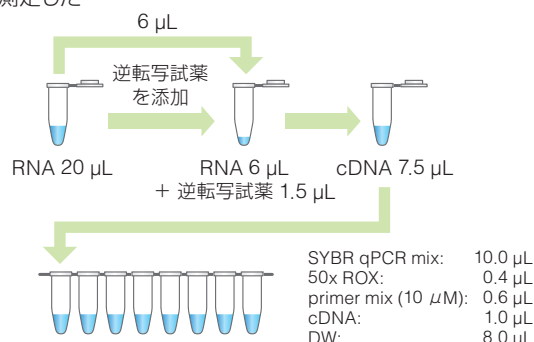
FastGene™ ScriptaseII (マスターミックス) を用いて行った
 RNAサンプル6 μ Lに対して逆転写試薬を1.5 μ L加え、以下の温度サイクルで行った
 25°C 10 min \rightarrow 42°C 60 min \rightarrow 85°C 5 min \rightarrow 4°C hold

3. リアルタイムqPCR

試薬: THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO)
 機器: StepOnePlus (Thermo)
 (解析対象遺伝子: 高発現 (high) および中程度発現 (medium))
 サイクル条件: TOYOBOのThunderbird プロトコル通り



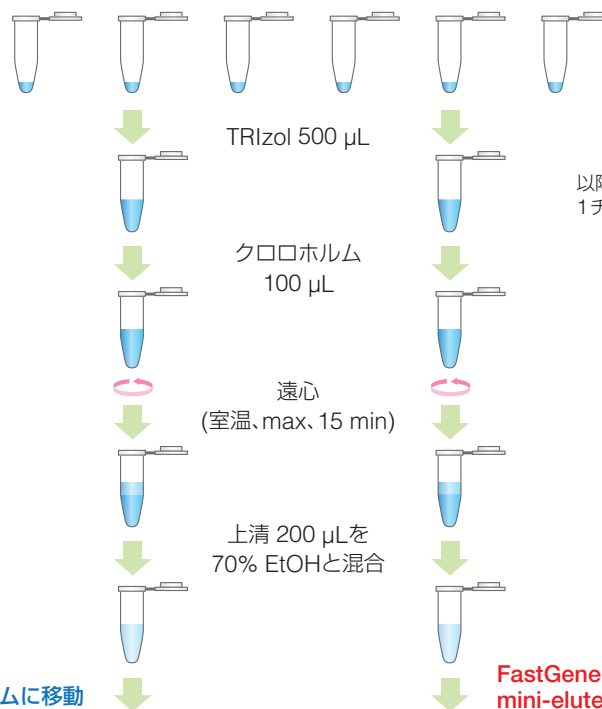
FastGene™ RNA Premium Kit
 Cat.No. FG-81006 トライアル 6回用
 FG-81050 50回用
 FG-81250 250回用



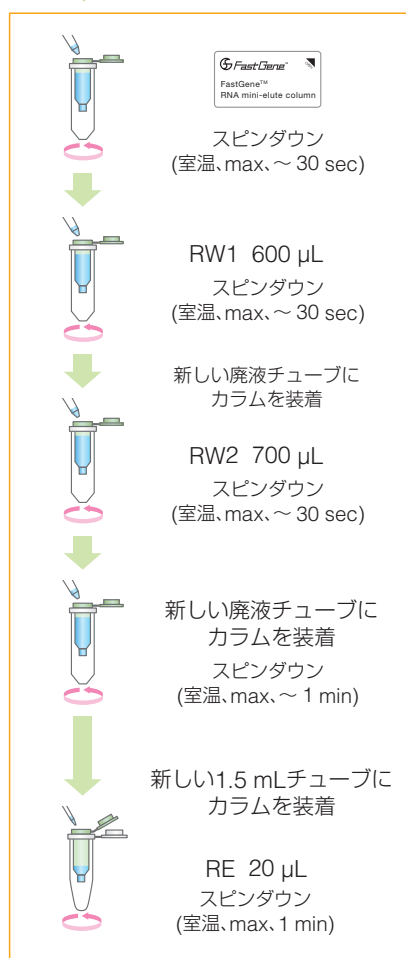
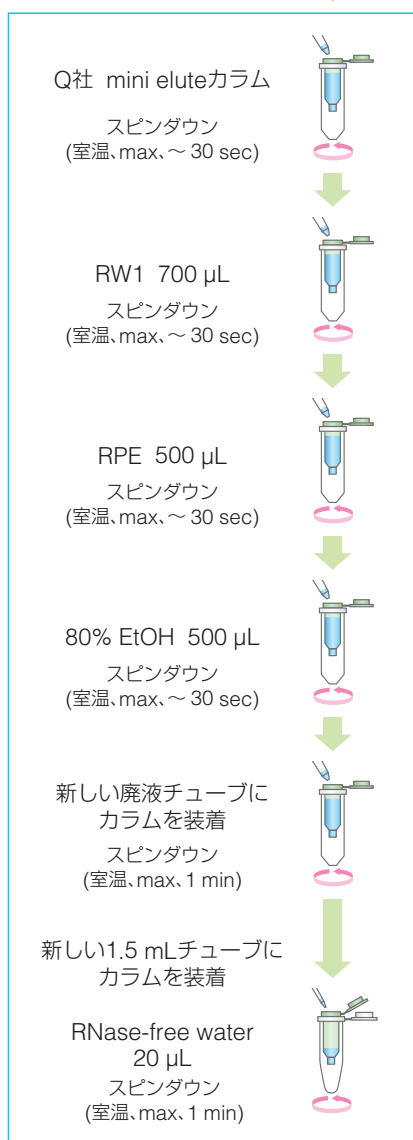


検討方法ワークフロー

マウス胎児繊維芽細胞 (MEF)
1チューブあたり 1000 cells



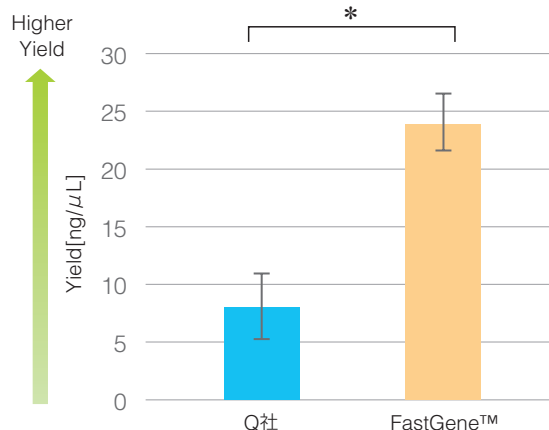
Q社カラムに移動

FastGene™
mini-elute columnに移動

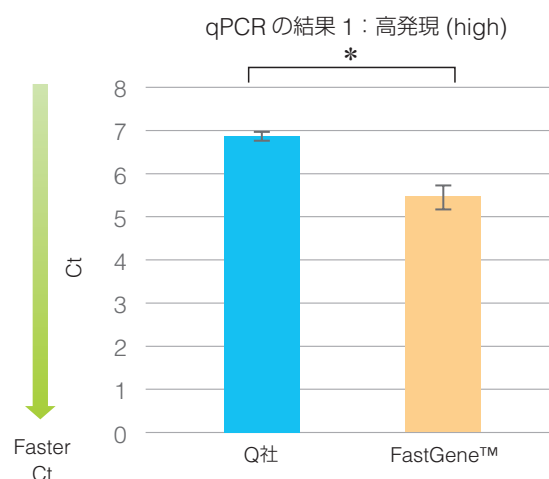
結果
Qubit4による収量の結果

使用キット		Yield		
		Yield [ng/μL]	Mean [ng/μL]	SD
Q社	1	5.06	8.03	3.16
	2	6.62		
	3	12.4		
FastGene™	1	25.3	23.90	2.42
	2	20.5		
	3	25.9		

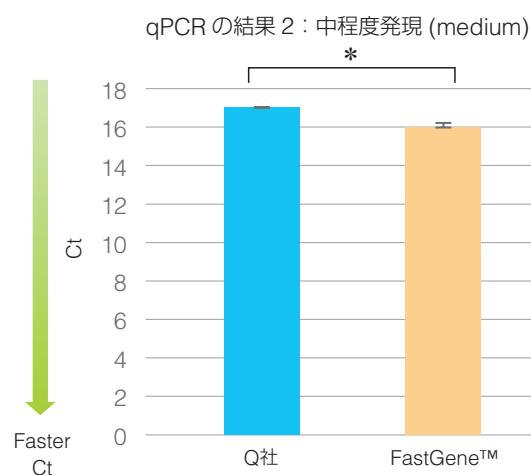
Qubit4による収量を比較したところ、FastGene™ RNA Premium kitはQ社と比較して約3.0倍の量が得られた。(**t*検定: P<0.05)


qPCR結果1: 高発現 (high)

使用キット		Ct	Mean	Mean Ct	SD
Q社	1	6.83	6.87	6.86	0.08
		6.92			
	2	6.74	6.78		
		6.83			
	3	6.98	6.93		
		6.87			
FastGene™	1	5.38	5.36	5.47	0.22
		5.34			
	2	5.78	5.77		
		5.77			
	3	5.32	5.27		
		5.23			


qPCR結果2: 中程度発現 (medium)

使用キット		Ct	Mean	Mean Ct	SD
Q社	1	17.15	17.12	17.03	0.09
		17.08			
	2	16.90	16.91		
		16.92			
	3	17.07	17.05		
		17.03			
FastGene™	1	15.90	15.87	16.00	0.14
		15.85			
	2	16.20	16.19		
		16.17			
	3	15.96	15.94		
		15.93			



qPCRによるCt値を比較したところ、高発現 (high)、中程度発現 (medium) とともにFastGene™ RNA Premium kitはQ社と比較してCt値が小さかった。(**t*検定: P<0.05)


お客様のコメント

今回、コスト面のメリットを期待して、本プロトコルを試しました。
 通常使用しているサンプルは、RNA濃度が低い一方でタンパクやDNAのコンタミが少ないので、(TRIzolを使用しているため) フィルターを含めて3回カラムに通すメリットが無いので、省略しました。
 FastGene™のキットはQ社よりも工程が1つ少ない点と、廃液チューブを繰り返し使用しない点から、作業時間も短縮できています。