



Application

## フェノール抽出試薬とスピンカラム法を用いた FastGene™ miRNA Enhancerの有用性

製品名

FastGene™ miRNA Enhancer (Cat.No.FG-RNAE-S, FG-RNAE-25)  
FastGene™ RNA Premium kit (Cat.No.FG-81006, FG-81050, FG-81250)  
TRIsure (Cat.No.BIO-38032)

下記のデータは、社会医療法人大雄会医科学研究所 澤村 卓宏 様のご厚意により掲載させて頂きました。

概要

FastGene™ miRNA Enhancerは、市販のカラム法を用いたRNA抽出キットと組み合わせることによって、miRNAの効果的な回収を可能にする試薬です。これまで、FastGene™ RNA Premium kitのような非フェノール法を用いた抽出方法において使用実績がありましたが、酸性フェノール法を用いた抽出法での効果が得られるかは未知でした。

本アプリケーションノートでは、FastGene™ RNA Premium kitの抽出工程を、TRIsureを用いた酸性フェノール抽出法で行い\*、miR-21のターゲットにその収量評価を行いました。

その結果、FastGene™ miRNA Enhancerは、TRIsureを用いた抽出においても、miR-21回収量を増加させることがわかりました。

\* 本アプリケーションノート記載のmiRNA抽出方法は、FastGene™ RNA Premium kitおよびFastGene™ RNA Basic Kitでご使用いただけます。

実験条件

細胞

細胞株 K562

細胞数 10<sup>5</sup>個調整したペレット (n=2)

RNA抽出方法

巻末補足情報に記載

RNA収量/純度測定方法

吸光光度計、DeNovix DS-11使用

RNA回収量検証方法

RT-qPCRにて検証 (詳細は巻末補足情報に記載)

サンプル情報

サンプル		抽出	カラム精製	FastGene™ miRNA Enhancer
①	Kit抽出 + Kit精製 + Enhancer (-)	FastGene™ RNA Premium kit		未添加
②	Kit抽出 + Kit精製 + Enhancer (+)	FastGene™ RNA Premium kit		添加
③	TRI + Kit精製 + Enhancer (-)	TRIsure	FastGene™ RNA Premium kit	未添加
④	TRI + Kit精製 + Enhancer (+)	TRIsure	FastGene™ RNA Premium kit	添加
⑤	TRI + EtOH purification	TRIsure	使用せず (エタノール沈殿のみ)	使用せず

使用キット・試薬



### FastGene™ miRNA Enhancer

お手持ちのRNAキットに加えるだけで、miRNAを効率的に回収することができる試薬。

\* 本製品はスピンカラムを用いた抽出法において、カラムの担体に対してsmall RNAの結合を促進するものです。



### FastGene™ RNA Premium kit

「高品質を低価格で」がコンセプト FastGene™製RNA精製キット。



### TRIsure

フェノール含有RNA抽出試薬



## 結果

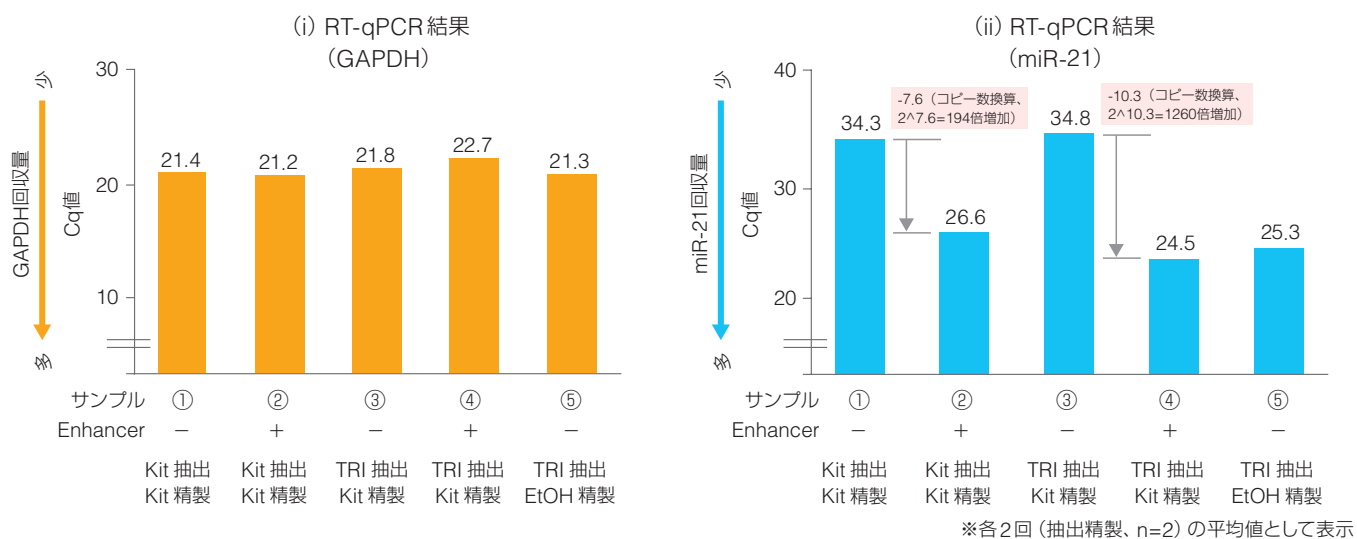
### 結果1：抽出RNAの純度・収量比較

サンプル	吸光度測定結果				
	A260	260/280	260/230	濃度 (ng/μL)	収量 (μg)
① Kit抽出 + Kit精製 + Enhancer (-)	1.03	2.18	2.68	41.13	2.06
	1.41	2.18	2.64	56.42	2.82
② Kit抽出 + Kit精製 + Enhancer (+)	0.74	2.19	2.64	29.71	1.49
	0.84	2.18	2.50	33.68	1.68
③ TRI抽出 + Kit精製 + Enhancer (-)	0.67	2.20	2.31	26.80	1.34
	0.63	2.01	1.75	25.19	1.26
④ TRI抽出 + Kit精製 + Enhancer (+)	0.95	2.22	2.59	37.86	1.89
	0.94	2.18	2.38	37.61	1.88
⑤ TRI抽出 + EtOH purification	2.00	1.60	1.98	80.02	4.00
	2.13	1.61	1.78	85.24	4.26

※各2回抽出精製 (n=2)

- FastGene™ RNA Premium kit 付属のカラム精製を用いた場合 (サンプル①~④) は、純度が高く (260/280、2.0以上)、収量は1.2 μg ~ 2.8 μgの範囲で回収された。
- カラム精製を行わなかった条件 (サンプル⑤) は、RNA純度が低い。
- FastGene™ RNA Premium kitを用いて場合、TRIsureを用いた場合共に、miRNA Enhancer添加の有無で、RNA抽出の純度に顕著な差は見られなかった (サンプル①と②、③と④の比較)。

### 結果2：回収したDNA溶液中 (総量 50 μL) に含まれるRNA量



- miRNA Enhancer 添加前後で、GAPDH mRNAの回収量に顕著な差は見られなかった (結果2 (i))。
- FastGene™ RNA Premium kit に従い抽出した場合 (kit抽出)、TRIsure を使用し抽出した場合共に、miR-21収量は大きく増加した (結果2 (ii))。→ miRNA Enhancer の効果は、フェノール抽出法においても、遜色なく得られた。

## 結論

miRNA Enhancerは、miRNAの収量を大きく増加させることが確認できたことに加え、本製品は、酸性フェノール抽出法を用いるTRIsure使用時においても有用な手段となることが示された。



### お客様のコメント

TRIsureは簡単にRNAが抽出可能でとても身近な試薬です。これを組み合わせることでより多くのマイクロRNAの収量が得られました。



## 補足情報

## (i) : RNA抽出・精製方法詳細

## ① Kit抽出 + Kit精製 + Enhancer (一)

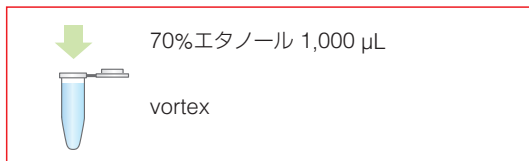


## ② Kit抽出 + Kit精製 + Enhancer (+)

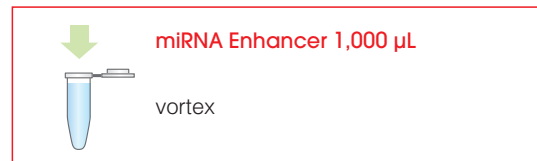




## ③ TRI + Kit精製 + Enhancer (-)



## ④ TRI + Kit精製 + Enhancer (+)





⑤ TRI + EtOH purification



TRIsure 1,000  $\mu$ L



vortex 室温 5 min  
インキュベート



クロロホルム 200  $\mu$ L



vortex 室温 3 min  
インキュベート



遠心  
(室温、13,000 rpm、15 min)



上清 500  $\mu$ Lを採取  
(水層部分)



イソプロパノール処理  
500  $\mu$ L イソプロパノール



室温で10 min静置



遠心  
(室温、13,000 rpm、10 min)



70% EtOH 1 mL  
遠心  
上清を廃棄  
エタノールでリンス



風乾



50  $\mu$ LのDWで溶解

## リアルタイムPCRの条件

## miR-21 解析に用いたステムループ RT プライマーと cDNA 合成

## ● Stem- Loop RT-primer sequences 5' →3'

miR-21

GTCAGAGGAGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCTCCTCTGACTCAACA

## ● Reaction conditions

16 °C … 30 min

30 °C … 30 s

42 °C … 30 s

50 °C … 1 s

85 °C … 5 min

60 cycles

## ● Reverse Transcript → cDNA

Transcriptor RT Reaction Buffer (5×) (Roche) 2 μL

Stem-Loop RT-primer (10 μM) 0.2 μL

Transcriptor Reverse Transcriptase (20 U/μL) (Roche) 0.25 μL

Protector RNase Inhibitor (40 U/μL) (Roche) 0.25 μL

Deoxynucleotide Mix (10 mM) (Roche) 1 μL

RNA solution 2.5 μL

Water 3.8 μL

→ 反応産物を TE buffer で  
5倍希釈して、以降の反応に使用した

## miR-21 解析に用いたリアルタイム PCR 時のプライマー配列、プローブ、反応条件および反応液

## ● Primer sequences (5' →3') and Probe

miR-21

Forward primer GATCGGTAGCTTATCAGACTGATG

Reverse primer GTGCAGGGTCCGGTAAT

Universal ProbeLibrary Probe (Roche) #82

## ● Reaction conditions

95 °C …10 min

95 °C …10 sec

60 °C …30 sec

40 cycles

## ● Reaction mixtures

2.5 μL of cDNA solution

5 μL of Essential Probe Master (Roche)

0.4 μM of each primer

0.4 μM of UPL probe (Roche)

(in a final volume of 10 μL)

反応は LightCycler 96 (Roche) で実施した。2重測定の前平均値を測定値とした。

## GAPDH 遺伝子の cDNA 合成

## ● Reverse Transcript → cDNA

Transcriptor RT Reaction Buffer (5×) (Roche) 2 μL

Anchored oligo (dt) 18 primer (50 μM) (Roche) 0.5 μL

Random Hexamer primer (600 μM) (Roche) 1 μM

Transcriptor Reverse Transcriptase (20 U/μL) (Roche) 0.25 μL

Protector RNase Inhibitor (40 U/μL) (Roche) 0.25 μL

Deoxynucleotide Mix (10 mM) (Roche) 1 μL

RNA solution 2.5 μL

Water 3.8 μL

## ● Reaction conditions

16 °C … 30 min

30 °C … 30 s

42 °C … 30 s

50 °C … 1 s

85 °C … 5 min

60 cycles

→ 反応産物を  
TE buffer で  
5倍希釈して、  
以降の反応に  
使用した

## GAPDH 遺伝子解析に用いたプライマー配列、反応条件および反応液

## ● Primer sequences (5' →3') and Probe

Forward primer AGCCACATCGCTCAGACA

Reverse primer GCCCAATACGACCAAATCC

Universal ProbeLibrary Probe (Roche) #60

## ● Reaction conditions

95 °C …10 min

95 °C …10 sec

60 °C …30 sec

40 cycles

## ● Reaction mixtures

2.5 μL of cDNA solution

5 μL of Essential Probe Master (Roche)

0.4 μM of each primer

0.4 μM of UPL probe (Roche)

(in a final volume of 10 μL)

反応は LightCycler 96 (Roche) で実施した。2重測定の前平均値を測定値とした。