



Application

マウスliver (肝臓) およびcalvaria (頭頂骨) からのRNA調製における組織破碎方法の検討 (Cryo-Press破碎法との比較)

製品名 組織・細胞破碎装置 MagNA Lyser (03358968001)

メーカー名 ロシュ ダイアグノスティクス株式会社

下記のデータは、自治医科大学分子病態治療研究センター 抗加齢医学研究部で所属のおお客様のご厚意により掲載させて頂きました。

実験の目的

マウス組織から多検体のRNA調製を実施するため、その前処理方法として組織・細胞破碎装置 MagNA Lyser を検討した。まずはマウスliver (肝臓) で従来のCryo-Press破碎法との比較を行い、更に難易度が高いcalvaria (頭頂骨) の前処理も試みた。

方法

- サンプル
 - マウスliver (肝臓)
 - マウスcalvaria (頭頂骨)
- サンプル量および破碎方法・条件
 - *結果の表1、表2を参照
- RNA抽出試薬および抽出キット
 - RNAiso (Takara)
 - High Pure RNA Isolation Kit (Roche)
- RNA抽出方法
 - (1) 各条件、方法により組織を破碎 (結果の表1、表2を参照)
 - (2) RNAisoのプロトコールに従いクロロホルムの添加、攪拌まで実施
 - (3) 続いて遠心、上清400 μ Lに対して等量の75% EtOHを添加
 - (4) 攪拌後、High Pure RNA Isolation Kitのスピンカラムに添加
 - (5) 以降は、High Pure RNA Isolation Kitのプロトコールに従い精製を実施
- ダウンストリーム

逆転写反応により調製したcDNAを用い、リアルタイムPCRでリファレンス遺伝子 (n=2 : Cyclo-1, Cyclo-2) と特異的遺伝子 (Gene1~5) のCq値を比較した。リアルタイムPCR装置はLightCycler480 (Roche) を用いた。



MagNA Lyser
Cat.No. 03 358 968 001

結果

表1. マウス liver (肝臓) 50mg を用いた結果

Mouse ID	破碎方法	RNAiso添加量	リアルタイムPCR Cq値					
			Cyclo-1	Cyclo-2	Cyclo Ave.	Gene 1	Gene 2	Gene 3
B6 ID-1	ポッター型テフロンホモジナイザー	1mL 6 strokes	20.49		20.49		25.03	22.26
B6 ID-1	MagNA Lyser (MagNa Lyser Green Beads)	1mL 3000rpm 30sec×1	20.24	20.11	20.18	24.07	25.10	21.88
B6 ID-1	MagNA Lyser (MagNa Lyser Green Beads)	1mL 4000rpm 30sec×1	20.53	19.59	20.06	24.23	24.33	22.88
B6 ID-1	MagNA Lyser (MagNa Lyser Green Beads)	1mL 5000rpm 30sec×1	20.26	20.11	20.19	24.45	24.94	22.26
B6 ID-1	MagNA Lyser (MagNa Lyser Green Beads)	1mL 6000rpm 30sec×1	20.24	20.31	20.28	24.24	25.20	22.52
B6 ID-1	MagNA Lyser (MagNa Lyser Green Beads)	1mL 7000rpm 30sec×1	20.48	20.16	20.32	24.64	25.87	22.91

表2. マウス calvaria (頭頂骨) 10mm×7mm を用いた結果

Mouse ID	破碎方法	RNAiso添加量 (※1min interval on ice)	リアルタイムPCR Cq値				
			Cyclo-1	Cyclo-2	Cyclo Ave.	Gene 4	Gene 5
129	MagNA Lyser (MagNa Lyser Green Beads)	1mL 5000rpm 30sec×6*	22.80	22.79	22.80	28.85	17.15
129 Tg	MagNA Lyser (MagNa Lyser Green Beads)	1mL 5000rpm 30sec×6*	22.18	22.11	22.15	23.44	16.57

リアルタイムPCRの結果においてCryo-Press破碎法とほぼ同程度のCq値が得られた。また、サンプル間でも再現性が高く、期待どおりのCq値を得ることができた。



お客様のコメント

16サンプルの破碎が同一回の操作で行える点、Tube内で破碎できるので、そのまま遠心操作に移行できる点が便利。頭頂骨の破碎の際に熱が発生するのを感じたが、RNAは問題なく調製できていた。Cryo-Pressで調製しているRNAと同じ品質のRNAを調製することができた。