# シロイヌナズナからのmiRNA抽出検討

## [目的]
シロイヌナズナからの効率の良いmiRNAの抽出方法を検討する

## [対象製品]
(1) ISOSPIN Liquid Sample miRNA（small RNAのみ抽出）
(2) ISOGEN with Spin Column（Total RNAを抽出）
(3) ISOGEN（Total RNAを抽出）
*植物からのTotal RNA抽出キットの「ISOSPIN Plant RNA」は、原理上small RNAの抽出には適さないため対象外とした。

## [実験方法]
**試料**：液体窒素中で破砕したシロイヌナズナの葉(ロゼット葉未形成)を約50 mgずつに分けたもの。

**RNA抽出（詳細なプロトコールは別紙参照）**
一部プロトコールを変更し、各製品を用いてRNA抽出を行った。
また、それぞれ超純水50 µLで溶解(溶出)して得られたRNAを鋳型にRT-qPCRによる解析を行った。

**RT-qPCR**
各製品で抽出したRNA3.57 µLを鋳型にして、Template Switching逆転写反応でcDNAを合成した。
次に、合成したcDNAを鋳型にして、リアルタイムPCR(Intercalation法)により、実際に発現しているとされるmiRNA「ath-miR159b-3p」を検出した。【参考文献1】

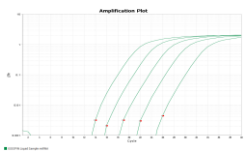
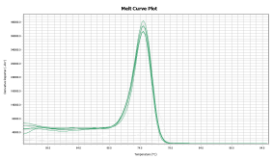
## [結果]
**吸光度測定**

| 抽出試薬 | 抽出対象の核酸 | RNA収量（試料50 mgあたり） | RNA濃度 | A260/A280 | A260/A230 |
|---|---|---|---|---|---|
| (1) ISOSPIN Liquid Sample miRNA | small RNA | 6.39 µg | 127.74 | 2.07 | 1.93 |
| (2) ISOGEN with Spin Column | Total RNA | 36.94 µg | 738.81 | 2.17 | 2.46 |
| (3) ISOGEN | Total RNA | 35.34 µg | 706.84 | 1.97 | 2.50 |

*(1)はsmall RNAのみ、(2)および(3)はsmall RNAを含むTotal RNAを抽出している。

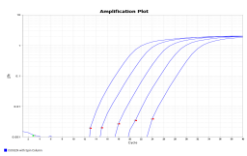
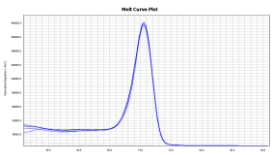
**qPCRによるmiRNA抽出効率の比較**

(1) ISOSPIN Liquid Sample miRNA
50 mgの試料から、127.74 µg /µL(small RNA: 6.39 µg) のsmall RNAが得られた。qPCRへは479.04 ng（3.75 µL）/wellを使用した。

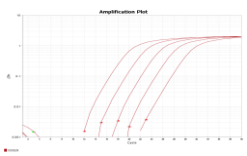
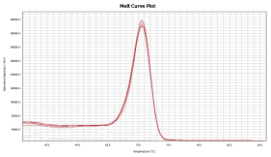
| dilution | 1 | 1/10 | 1/100 | 1/1,000 | 1/10,000 |
|---|---|---|---|---|---|
| Ct | 18.691 | 21.479 | 24.231 | 27.119 | 30.742 |

(2) ISOGEN with Spin Column
50 mgの試料から、738.81 ng/µL(Total RNA: 36.94 µg)のTotal RNAが得られた。qPCRへは2770.55 ng（3.75 µL） /wellを使用した。

| dilution | 1 | 1/10 | 1/100 | 1/1,000 | 1/10,000 |
|---|---|---|---|---|---|
| Ct | 18.160 | 20.732 | 23.450 | 26.096 | 29.035 |

(3) ISOGEN
50 mgの試料から、706.84 ng/µL(Total RNA: 35.34 µg)のTotal RNAが得られた。qPCRへは2650.66 ng（3.75 µL） /wellを使用した。

| dilution | 1 | 1/10 | 1/100 | 1/1,000 | 1/10,000 |
|---|---|---|---|---|---|
| Ct | 17.117 | 19.968 | 22.650 | 25.266 | 28.103 |

## [結論]
**各製品を用いた抽出方法によりmiRNAの検出が可能であった。「ath-miR159b-3p」の検出感度には製品間で大きな差は見られず、miRNAの抽出効率も同程度であることが示唆された。**

[参考文献] 1. Yanjiao, L. et al. :BMC Plant Biology, 16:179（2016）

## [別紙]
## 「シロイヌナズナからのmiRNA抽出検討」の各キットを使用したRNA抽出方法

前処理

1. 予め乳鉢・乳棒を液体窒素で冷却した。
2. シロイヌナズナ0.2gを液体窒素の入った乳鉢に入れて凍結した。
3. 乳棒ですり潰した。
4. 約50mg分（全体の1/4を目分量で）の粉末をサンプルとした。

### (1) ISOSPIN Liquid Sample miRNAでsmall RNAのみを精製
### （スケールアップsmall RNA精製プロトコール（large RNA除去あり）を使用）

※青字はISOSPIN Liquid Sample miRNA マニュアル（第1版）と異なる点

凍結破砕したサンプル約50mgを1.5 mlチューブへ入れた

← 350 µL　LR Extraction Buffer
vortex

← 350µL 超純水、20µL Proteinase K
インキュベート(37℃　30分間)

遠心（13K ×g, 10分間 RT）

上清をSpin Columnに添加

遠心（13K ×g, 15 秒間, RT）

ろ液を新しい1.5 mlチューブに移す

← 360 µL 100% エタノール
15秒間　vortex

遠心（13K ×g, 15 分間, RT）

上清を新しい2 mlチューブに移す

← 720 µL　エタノール
15秒間　vortex
軽くスピンダウン

Spin Column Blue に混合液の半分量（900 µl）を添加

遠心（13 K×g, 15秒間, RT）
ろ液を廃棄し、カラムをCollection Tubeに戻す

← 混合液の残りを全量添加

遠心（13 K×g, 15秒間, RT）
ろ液を廃棄し、カラムをCollection Tubeに戻す

← 500µL LR Wash1 Buffer

遠心（13 K×g, 15秒間, RT）
ろ液を廃棄し、カラムをCollection Tubeに戻す

← 500µL LR Wash2 Buffer

遠心（13 K×g, 2分間, RT）
ろ液を廃棄

カラムを新しい1.5 mlチューブの上に移す

← 50 µL 超純水をメンブレンの中央に滴下
室温 3分間 静置

遠心（13 K×g, 2分間, RT）

small RNA溶液

## (2) ISOGEN with Spin Columnで精製

※青字はISOGEN with Spin Column マニュアル（第6 版）と異なる点

凍結破砕したサンプル約50mgを1.5 mlチューブへ入れた

1 ml　ISOGEN
vortex
室温　5分間　静置

遠心（13 K×g, 10分間, 4℃）

上清を回収

0.2 ml　クロロホルム
15秒間、 vortex
室温　2分間　静置

遠心（13 K×g, 10分間, 4℃）

水相（420 µL）を回収

420 µLの70% EtOH
転倒混和
スピンダウン

Spin Columnに混合液全量を添加

遠心（12 K×g, 15秒間, 4℃）

500 µL IsoWash I

遠心（12 K×g, 15秒間, 4℃）
ろ液を廃棄し、カラムを
Collection Tubeに戻す

ろ液（700 µL)を別チューブへ移す

200 µL イソプロパノール
よく混合しスピンダウン

遠心（12 K×g, 15秒間, 4℃）
ろ液を廃棄し、カラムをCollection Tubeに戻

500 µL IsoWash II

遠心（12 K×g, 15秒間, 4℃）
ろ液を廃棄し、カラムをCollection Tubeに戻す

500 µL IsoWash II

遠心（12 K×g, 1分間, 4℃）
ろ液を廃棄

カラムを新しい1.5 mlチューブの上に移す

50 µL 超純水をメンブレンの中央に滴下
室温 1分間 静置

遠心（12 K×g, 1分間, 4℃）

Total RNA溶液

## (3) ISOGENで精製

※青字はISOGEN, ISOGEN－LS簡易マニュアル（第2版）1608-1807と異なる点

凍結破砕したサンプル約50mgを1.5 mlチューブへ入れた

1 ml　ISOGEN
vortex（図3）
室温　5分間　静置

遠心（13 K×g, 10分間, 4℃）
(図4)

上清を回収

0.2 ml　クロロホルム
15秒間　vortex
室温　2分間　静置

遠心（13 K×g, 10分間, 4℃）

水相（420 µL）を回収（図5)

図5 液相分離後

340 µl （0.8倍量）　イソプロパノール
15秒間　vortex
遠心（13 K×g, 10分間, 4℃）

沈　殿（上清を除去）

75% エタノール（壁面を洗浄）

沈　殿（上清を除去）

遠心（13 K×g, 1秒間, 4℃）

沈　殿（上清を除去）

100 µL 超純水
15秒間 vortex

Total RNA溶液
(今回は濃縮および保管のため、以下操作を実施)

3.3 µLの3M NaOAc、250 µLのEtOH
3分間、 vortexで混合

-30℃に保存（濃度測定時は、EtOH沈殿から
回収し、50 µLのmilliQ水に溶解）