

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：液体窒素中で破碎したシロイヌナズナの葉(ロゼット葉末形成)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Web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】

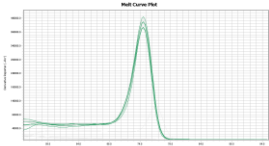
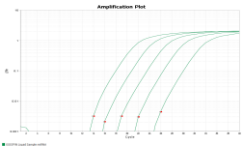
吸光度測定

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。

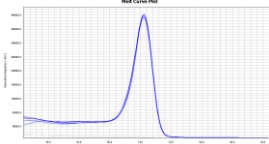
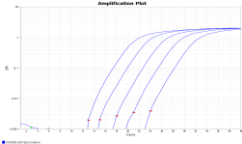
qPCRによるmiRNA抽出効率の比較

- (1) ISOSPIN Liquid Sample miRNA
50 mgの試料から、127.74 ng/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。



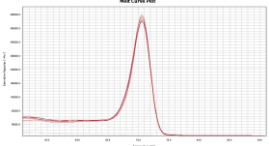
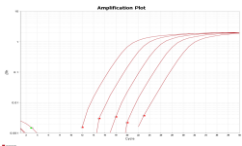
dilution	1	1/10	1/100	1/1,000	1/10,000
Ct	18.691	21.479	24.231	27.119	30.742

- (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 μ L LR Extraction Buffer
vortex
- ← 350 μ L 超純水、20 μ L Proteinase K
インキュベート(37℃ 30分間)
- 遠心 (13K $\times$ g, 10分間 RT)

上清をSpin Columnに添加

- 遠心 (13K $\times$ g, 15 秒間, RT)
- ろ液を新しい1.5 mlチューブに移す

- ← 360 μ L 100% エタノール
15秒間 vortex
- 遠心 (13K $\times$ g, 15 分間, RT)

上清を新しい2 mlチューブに移す

- ← 720 μ L エタノール
15秒間 vortex
軽くスピンドウン

Spin Column Blue に混合液の半分量 (900 μ L) を添加

- 遠心 (13 K $\times$ g, 15秒間, RT)
ろ液を廃棄し、カラムをCollection Tubelに戻す

← 混合液の残りを全量添加

- 遠心 (13 K $\times$ g, 15秒間, RT)
ろ液を廃棄し、カラムをCollection Tubelに戻す

← 500 μ L LR Wash1 Buffer

- 遠心 (13 K $\times$ g, 15秒間, RT)
ろ液を廃棄し、カラムをCollection Tubelに戻す

← 500 μ L LR Wash2 Buffer

- 遠心 (13 K $\times$ 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 μ L 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 $\times$ 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



(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

