

生茶葉からのmiRNA抽出検討

[目的]

生茶葉からの効率の良い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。

試料：液体窒素中で破碎した生茶葉を約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(Interpolation法)により、miRNA「ath-miR159b-3p」を検出した。【参考文献1】

[結果]

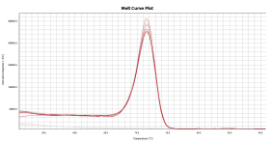
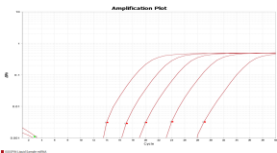
吸光度測定

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	6.75 μg	134.92 ng/μL	2.07	1.24
(2) ISOGEN with Spin Column	Total RNA	39.11 μg	782.25 ng/μL	2.18	2.38
(3) ISOGEN	Total RNA	38.97 μg	779.47 ng/μL	1.98	2.26

*(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

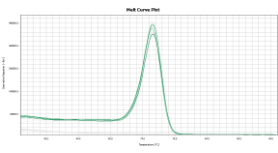
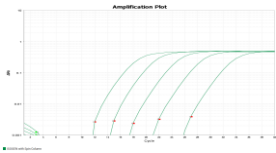
- (1) ISOSPIN Liquid Sample miRNA
約50 mgの試料から、134.92 ng/μL(small RNA: 6.75 μg)のsmall RNAが得られた。qPCRへは505.94 ng(3.75 μL)/wellを使用した。



dilution	1	1/10	1/100	1/1,000	1/10,000
Ct値	17.238	20.552	23.609	27.442	32.858

- (2) ISOGEN with Spin Column

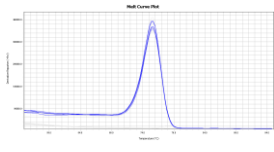
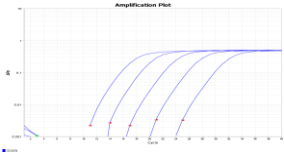
約50 mgの試料から、782.25 ng/μL(Total RNA: 39.11 μg)のTotal RNAが得られた。qPCRへは2933.45 ng(3.75 μL)/wellを使用した。



dilution	1	1/10	1/100	1/1,000	1/10,000
Ct値	15.478	18.467	21.966	25.705	30.521

- (3) ISOGEN

約50 mgの試料から、779.47 ng/μL(Total RNA: 38.97 μg)のTotal RNAが得られた。qPCRへは2923 ng(3.75 μL)/wellを使用した。



dilution	1	1/10	1/100	1/1,000	1/10,000
Ct値	14.599	17.622	21.05	24.663	28.800

[結論]

各製品を用いた抽出方法でmiRNAを検出することができた。一方で、(2)ISOGEN with Spin Column及び(3)ISOGENを用いた場合は、より効率的なmiRNA抽出が可能であることが示唆された。

[別紙] 「生茶葉からのmiRNA抽出検討」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. 生茶葉 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(図1)

- ← 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)

図1 サンプルLysis後

上清をSpin Columnに添加

- 遠心 (13K $\times$ g, 15 秒間, RT) (図2)
- 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

図2 遠心後

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

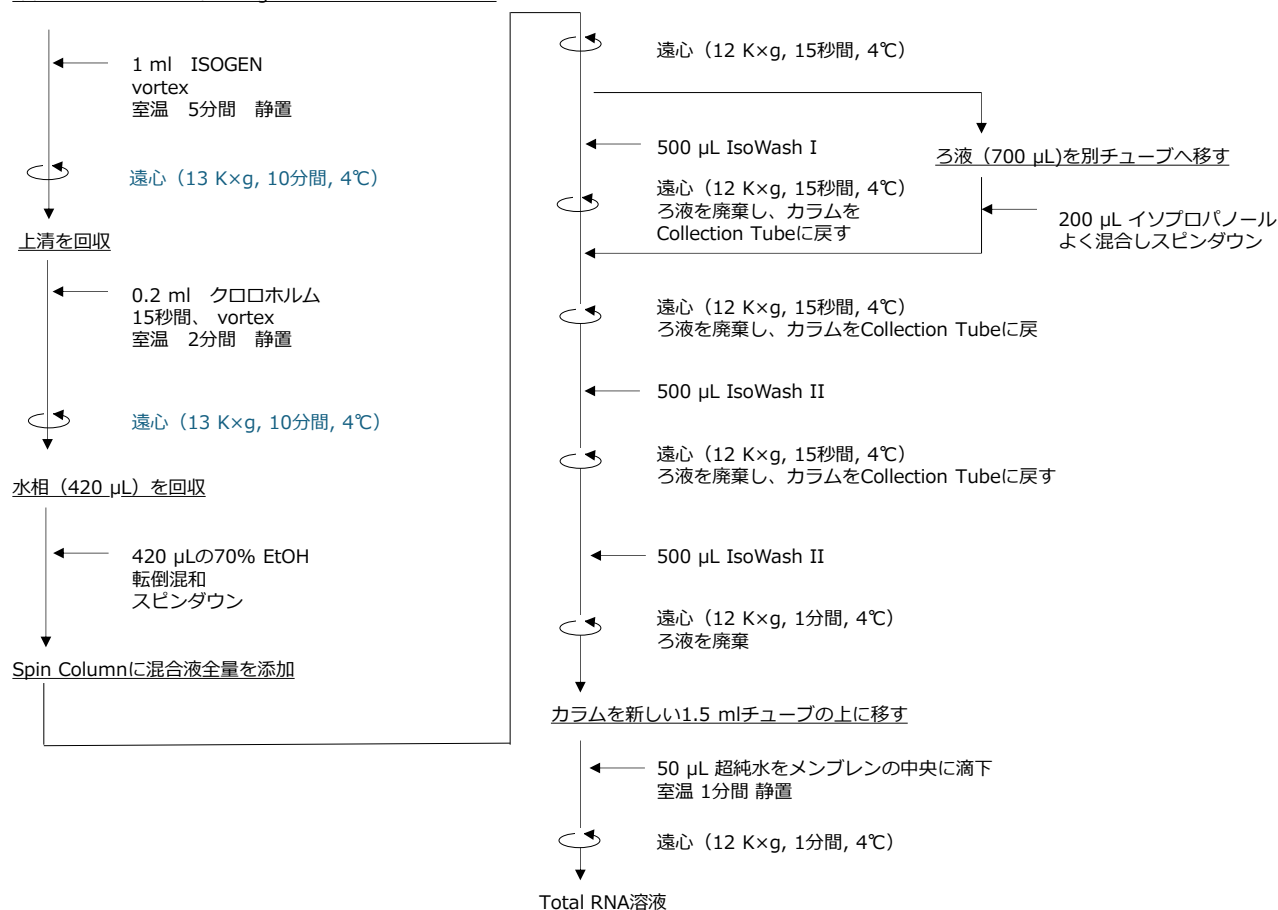
- 遠心 (13 K $\times$ g, 2分間, RT)

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

凍結破碎したサンプル約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

凍結破碎したサンプル約50mgを1.5 mlチューブへ入れた

