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：液体窒素中で破砕した生茶葉を約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、miRNA「csn-miR167b-5p」を検出した。【参考文献1】

[結果]

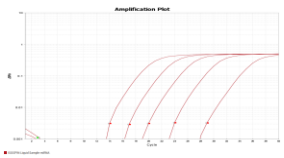
吸光度測定

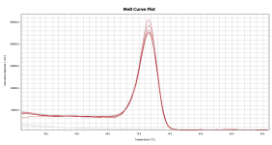
抽出試薬	抽出対象の核酸	RNA収量*（試料50 mgあたり）	RNA濃度	A260/A280	A260/A230
(1) ISOSPIN Liquid Sample miRNA	small RNA	6.75 µg	134.92 ng/µL	2.07	1.24
(2) ISOGEN with Spin Column	Total RNA	39.11 µg	782.25 ng/µL	2.18	2.38
(3) ISOGEN	Total RNA	38.97 µg	779.47 ng/µL	1.98	2.26

*(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

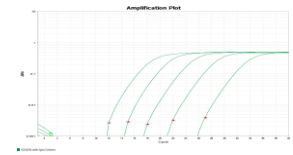
(1) ISOSPIN Liquid Sample miRNA
約50 mgの試料から、134.92 µg /µL(small RNA: 6.75 µg)のsmall RNAが得られた。qPCRへは505.94 ng(3.75 µL)/wellを使用した。

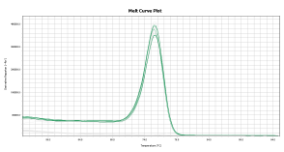




dilution	1	1/10	1/100	1/1,000	1/10,000
Ct値	17.238	20.552	23.609	27.442	32.858

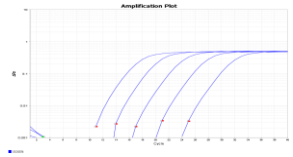
(2) ISOGEN with Spin Column
約50 mgの試料から、782.25 ng/µL(Total RNA: 39.11 µg)のTotal RNAが得られた。qPCRへは2933.45 ng(3.75 µL)/wellを使用した。

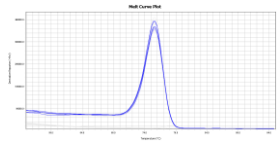




dilution	1	1/10	1/100	1/1,000	1/10,000
Ct値	15.478	18.467	21.966	25.705	30.521

(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。

[参考文献] 【1】Angbaji , S. et al. :Genomics, 113:159-170（2021）

[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 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）

図1 サンプルLysis後

上清をSpin Columnに添加

遠心（13K ×g, 15 秒間, RT）(図2)

図2 遠心後

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)

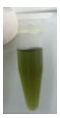


図3 サンプルLysis後

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

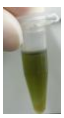


図4 Lysis後に遠心

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）