

株式会社ファスマック

神奈川県厚木市緑ヶ丘 5-1-3

お問い合わせ : public-relations@fasmac.co.jp

Technical Note:

製品目	Easy-spin™ Total RNA Extraction Kit
内容	Evaluation Project
番号・日付	TNES190315 / 20190315

1. 目的

iNtRON 社製の簡便な Easy-spin Total RNA 抽出キットの検証。

2. 材料及び方法

ダイズとコーンを用いて Thompson ら (2003) によるプライマー (NAD : AtropaNad2.1a - AtropaNad2.2b) により植物に特異的な内在性コントロール RNA を検出する。Total RNA 抽出方法は図 1 に示したように 5 段階で行う。Total RNA から SuperScript IV Reverse Transcriptase (ThermoFisher 社) で cDNA を合成する。プライマーはファスマック社製を使用し、cDNA 合成はリバースプライマーで行う。合成した cDNA を用いて、PCR にて内在 RNA を増幅する。PCR は GenCheck Hot Start PCR Mix (ファスマック社製) を用いる。電気泳動は 3% GenCheck Instant Agarose と GenCheck ladder marker (ファスマック社製) で行い、188 bp のバンドの有無を電気泳動で確認する。



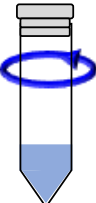
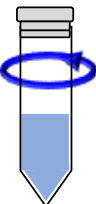
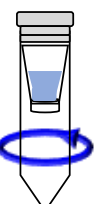
Easy-spin Total RNA Extraction example: Soybean, Corn	
Sample preparation	
① 2mLチューブに50-100 mgサンプルを用意する	
Cell lysis	
② 1 mL Lysis Bufferを加える ③ 室温で10秒間ボルテックスする	
RNA - DNA separation	
④ 200 uLクロロホルムを加えボルテックスする ⑤ 4℃・13,000 rpm・10分間遠心する ⑥ 400 uLの上清を新しい1.5 mLチューブに移す	
RNA isolation	
⑦ 400 uL Binding Buffer を加え2-3回ピペティングで懸濁する。常温で1分間放置する ⑧ 7の溶液を~800 uLまでカラムに移す。13,000 rpmで30秒間遠心し、落とした溶液をチューブから廃棄する。7の溶液が無くなるまで繰り返す	
Washing and RNA collection	
⑨ 700 uL Washing Buffer A をカラムに加える。13,000rpmで30秒間遠心し、落とした溶液をチューブから廃棄する ⑩ 700 uL Washing Buffer B をカラムに加える。13,000 rpmで30秒間遠心し、落とした溶液をチューブから廃棄する ⑪ カラムを乾燥させるため、13,000 rpmで1-2分間遠心する ⑫ カラムを新しい1.5 mLチューブに乗せ、50 uL Elution Bufferを入れる。室温で1分間インキュベートしたのち13,000 rpmで1分間遠心する	

図 1. Quick guide of Easy-spin Total RNA Extraction

Total RNA 抽出結果

表 1. Total RNA 抽出濃度

サンプル名	濃度 (ng/ul)	A260/280	A260/230
乾燥ダイズ粉末(50mg)	597.54	2.10	2.33
乾燥ダイズ粉末(50mg)	675.18	2.15	2.37
乾燥コーン粉砕物(50mg)	54.60	1.77	1.62
乾燥コーン粉砕物(50mg)	64.30	1.89	1.74

コーン、ダイズとも 2 サンプルずつ RNA の抽出を行った。吸光度測定の結果、コーンよりダイズの方が Total RNA を多く回収でき、さらに RNA 純度が良いことが示された。また、ダイズは A260/230 の値が A260/280 より高く、核酸の純度も良好であることが判明した。

3. cDNA 合成及び PCR-電気泳動の結果

Total RNA 抽出は約 2 時間で行った。cDNA 合成と PCR 電気泳動の結果、コーン、ダイズともに内在性 RNA は正しく検出された。

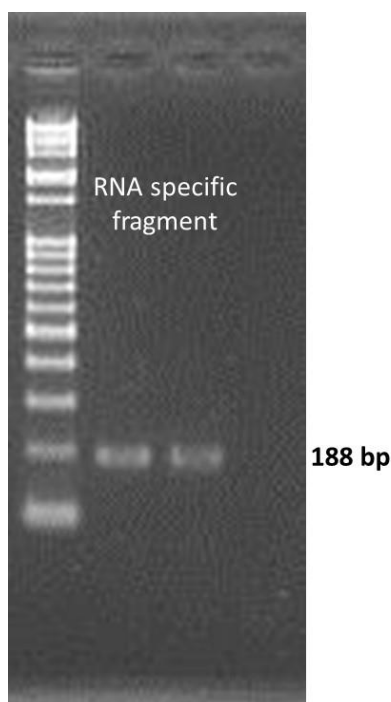


図 2. 内在性 RNA の検出結果, 左から: コーン、ダイズ、陰性コントロール

まとめ

Easy-spin Total RNA Extraction キットでは簡便に純度の高い Total RNA を抽出することが出来た。また、PCR-電気泳動の結果により、ターゲットにした植物の内在性 RNA が確認できた。このことから、Easy-spin Total RNA Extraction キットは様々なターゲット RNA に応用できると考えられる。

4. 参考文献

- a. Thermo Fisher Scientific. 260/280 and 260/230 Ratios. T042-Technical Bulletin NanoDrop Spectrophotometers.
<http://www.nhm.ac.uk/content/dam/nhmwww/our-science/dpts-facilities-staff/Coreresearchlabs/nanodrop.pdf>
- b. Thompson J.R., Wetzel S., Klerks M.M., Vaskova D., Schoen C.D., Spak J., Jelkmann W. 2003. Multiplex RT-PCR detection of four aphid-borne strawberry viruses in *Fragaria* spp. in combination with a plant mRNA specific internal control. *Journal of Virological Methods*, 111: 85 – 93.