



RNA抽出キットに加えるだけで、miRNAの抽出が可能 FastGene™ miRNA エンハンサー の何がすごい？

- ✓ これまで、miRNAの抽出には専用キットを用いるのが当たり前でした。
- ✓ 当製品はお手持ちのRNA抽出キットに加えてご使用いただくだけでmiRNAを含むsmall RNAの抽出ができる新コンセプトのキットです。
- ✓ 一体何が便利なのか？改めて解説いたします。

FastGene™ マイクロ miRNA エンハンサー

サンプル請求
受付中



1. 目的に合わせてキットとプロトコルを選択可能

2. miRNA専用の抽出キットを購入する必要がありません。

3. FastGene™ RNA Kitと相性抜群！組み合わせて使用することでコストが削減できます。



実績のあるサンプル：培養細胞・FFPE・全血・筋肉組織

miRNA 培養細胞 組織

Cat.No.		入数	価格(税抜)
FG-RNAE-S	FastGene™ miRNA Enhancer トライアルキット	4回用	¥1,000
FG-RNAE-25	FastGene™ miRNA Enhancer 25本入り	100回用	¥20,000

弊社推奨のRNA 精製キット

FastGene™ ベーシック RNA Basic Kit

カスタマーレビュー
★★★★★
平均 4.7!



トータルRNA 培養細胞 組織

仕様	スタンダード	ラージインプット
推奨サンプル量	培養細胞 <math>< 5 \times 10^6</math>	組織* <math>< 1 \times 10^7</math>
	組織* <math>< 10 \text{ mg}</math>	<math>< 20 \text{ mg}</math>
溶出量	50 μL	50 μL
所要時間 (6 prepsあたり)	約40分間	約40分間
フォーマット	シリカメンブレン法	

※組織によって最適な前処理をお選びください。サンプルや部位によって得られる収量は異なります。

一般的な収量

- 培養細胞 (1×10^6 HeLa 細胞) の場合 : 10-20 μg
- 組織 (20 mg マウス肝臓組織) の場合 : 50-100 μg

保存条件 • 室温 (15~25°C)

Cat.No.		入数	価格(税抜)
FG-80006	FastGene™ RNA Basic Kit トライアルキット	6回用	¥3,200
FG-80050	FastGene™ RNA Basic Kit	50回用	¥18,000
FG-80250	FastGene™ RNA Basic Kit	250回用	¥82,000

FastGene™ プレミアム RNA Premium Kit

カスタマーレビュー
★★★★★
平均 4.7!



トータルRNA 培養細胞 組織 ゲノムDNA除去

仕様	スタンダード	ラージインプット
推奨サンプル量	培養細胞 <math>< 5 \times 10^6</math>	組織* <math>< 1 \times 10^7</math>
	組織* <math>< 10 \text{ mg}</math>	<math>< 20 \text{ mg}</math>
溶出量	20 μL (10~50 μL)	50 μL (20~50 μL)
所要時間 (6 prepsあたり)	約60分間	約60分間
フォーマット	シリカメンブレン法	

※組織によって最適な前処理をお選びください。サンプルや部位によって得られる収量は異なります。

一般的な収量

- 培養細胞 (1×10^6 HeLa 細胞) の場合 : 10-20 μg
- 組織 (20 mg マウス肝臓組織) の場合 : 50-100 μg

保存条件 • FastGene™ RNA mini-elute columnのみ到着後4°C
• 他構成品は全て室温 (15~25°C)

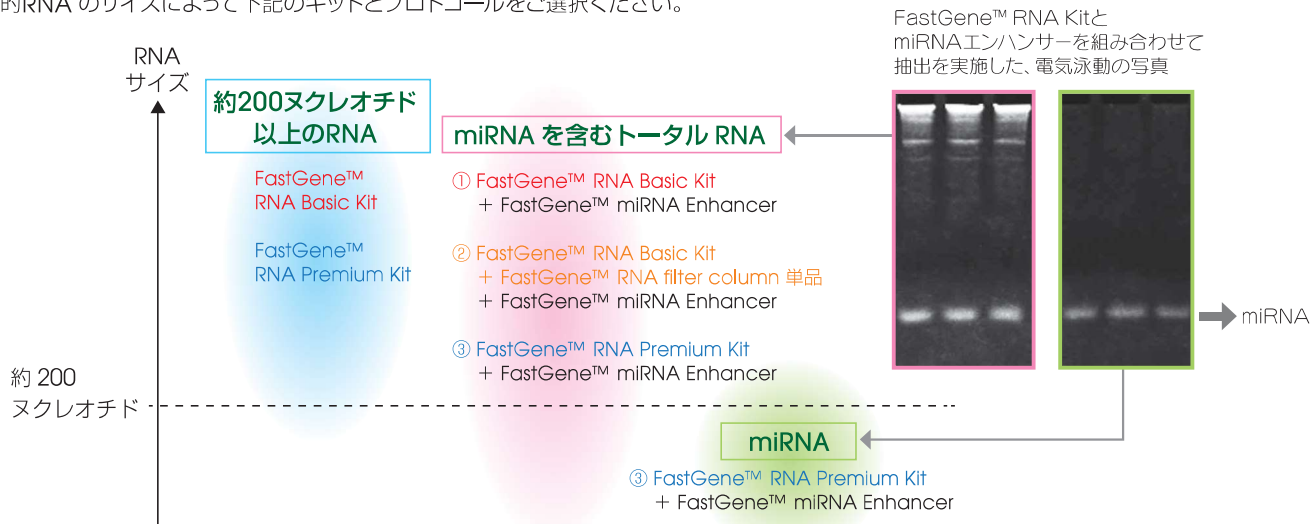
Cat.No.		入数	価格(税抜)
FG-81006	FastGene™ RNA Premium Kit トライアルキット	6回用	¥5,100
FG-81050	FastGene™ RNA Premium Kit	50回用	¥28,000
FG-81250	FastGene™ RNA Premium Kit	250回用	¥130,000

1. 目的に合わせてキットとプロトコルを選択可能

本試薬をFastGene™ RNA Basic kit とFastGene™ RNA Premium kit と併用していただくことで、

約 200 ヌクレオチド以上の RNA miRNA を含むトータル RNA miRNA を抽出することが可能になります。

目的RNA のサイズによって下記のキットとプロトコルをご選択ください。



2. miRNA専用の抽出キットを購入する必要がありません。

これまで、miRNA抽出には専用キットを別途準備する必要がありましたが、miRNAエンハンサーがあれば、お手持ちのRNA抽出キットに加えてご使用いただくことでmiRNAを含むsmall RNAの抽出が可能となり、コスト削減ができます。



3. FastGene™ RNA Kitと組み合わせることでコストが削減できます。

弊社推奨のFastGene™ RNA精製キットは、収量・純度などにおいて他社と同等の性能を有するにも関わらず、価格が比較的安価であるため大変好評のキットです。こちらのキットとmiRNAエンハンサーを組み合わせることで大幅なコストダウンが可能になります。



FastGene™ miRNA エンハンサーの何がすごい?

Application Note

FastGene™ miRNA Enhancer kit と FastGene™ RNA Premium kit または 他社 RNA 抽出キットを組み合わせて使用した際の比較評価試験

■ 製品名

FastGene™ miRNA Enhancer kit (Cat.No. FG-RNAE-S, FG-RNAE-25)

FastGene™ RNA Premium kit (Cat.No. FG-81006, FG-81050, FG-81250)

下記のデータは、社会医療法人大雄会医科学研究所 菊池 有純 様のご厚意により掲載させて頂きました。

概要

臨床検査室のサンプルは、組織、血液、尿、髄液などの臨床検体が対象であり、PCRにおける反応阻害物質を除去し、解析に必要な十分量を確保する必要があります。遺伝子検査において試料から解析対象となる核酸の抽出は検査の精度を維持する上で極めて重要です。とりわけ、様々な状態が想定される臨床検体において、安定的に試料調整が可能な抽出方法の構築は必須です。本アプリケーションノートでは、FastGene™ miRNA Enhancer kitとFastGene™ RNA Premium kitまたは他社RNA抽出キットを組み合わせて臨床検体を含む様々なサンプルからmiRNAを抽出し、cDNA合成後リアルタイムPCRによりCp値を評価した一例を報告します。

● miRNAとは

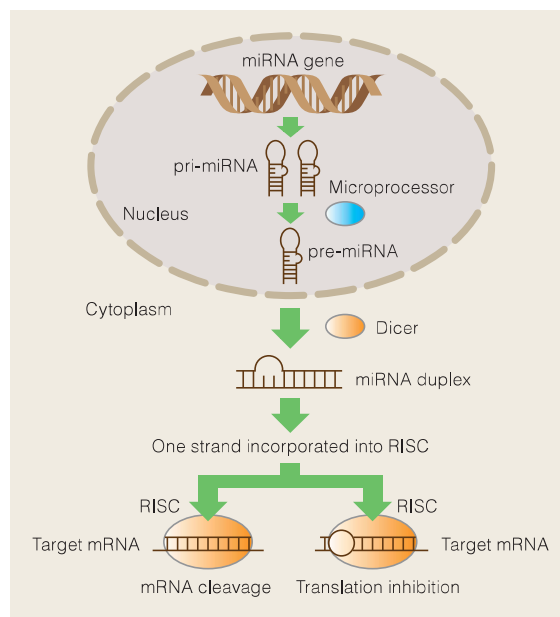
- 約30%のヒト遺伝子がmiRNAによる調節を受けていると予想されている。
- ゲノムから転写後、precursor miRNAがいくつかの酵素類の作用の後にmature miRNAとなる。
- mature miRNAは21~23ntの1本鎖RNAとなりmRNAと相互作用する。
- miRBase Release22 (2018)によると38,589が登録されている。

mRNA発現によりタンパク質が翻訳

↓
miRNAの発現増加によりmRNAからのタンパク質翻訳抑制

↓
タンパク質発現レベルの低下

↓
癌、代謝性疾患、神経疾患や感染症などへの関与が示唆されている。



Meltzer, P.S. *Nature* 435, 745–746 (2005) .参照

実験条件

対象サンプルと前処理方法

- Cell line (K562)→ 細胞数105個に調整したペレットを使用 (n=3)
- human white blood cell (臨床検体)→ EDTA・2Na抗凝固剤入り採血管を用い、健康者3名より採血した全血500 μLの溶血剤処理後の白血球のペレットを使用 (n=3)
- Formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue sample (臨床検体)→ 大腸癌患者5例から採取した大腸組織のFFPEサンプル (詳細は*)
- Bovine muscle→ 組織と等量のPBS (-)を用い、ホモジナイズした溶液10 μL (n=3)

*FFPEの前処理方法の詳細

- 1) 厚さ5 μmのFFPE標本から試料を採取する
- 2) 800 μLキシレンを加える
- 3) 室温で5 minインキュベート
- 4) 400 μL無水エタノールを加える
- 5) 2 min遠心分離し、上清を廃棄
- 6) 1000 μL無水エタノールを加える
- 7) 2 min遠心分離し、上清を廃棄
- 8) 56 °Cで20 minインキュベート
- 9) 100 μLの溶解バッファー (10 nmol/L Tris-HCl, 0.1 mmol/L EDTA, 5 g/L SDS)を加える
- 10) 40 μLのproteinase Kを加える
- 11) 56 °Cで30 minインキュベート
- 12) 85 °Cで30 minインキュベート
- 13) 溶解バッファーを加え、全量を150 μLとする



検討方法ワークフロー

● キットとプロトコルの選択ガイド

FastGene™ miRNA Enhancerは、FastGene™ RNA Basic kit、FastGene™ RNA Premium kitや他社RNA抽出キットと併用していただくことで、抽出が困難な低分子RNA (miRNA) を回収することが可能になります。

本アプリケーションノートでは、FastGene™ miRNA EnhancerとFastGene™ RNA Premium kitまたは他社RNA抽出を組み合わせた右記のプロトコルを使用しました。さらに抽出したmiRNAをcDNA合成後、リアルタイムPCRを行うことによりCp値の評価を行いました。



miRNAを含むトータルRNAを回収したい場合

プロトコル I

FastGene™ RNA Premium kit
+ FastGene™ miRNA Enhancer

< 1×10⁵ 培養細胞

350 μL バッファー RL※1
添加後十分にホモジナイズ



≥ 10,000 x g (室温: 20 ~ 25℃) 1 min
上清を新しいコレクションチューブに移す

400 μL FastGene™ miRNA
enhancer solution
ピペティングで混合



FastGene™ RNA binding columnに
最大700 μLまでのサンプル溶液を添加
≥ 10,000 x g (室温: 20 ~ 25℃) 1 min
ろ液廃棄後 カラムを元のコレクション
チューブ (2.0mL) に戻す

400 μL バッファー RW2※1
≥ 10,000 x g (室温: 20 ~ 25℃) 30 s
カラムを新しいコレクションチューブ
(2.0mL) に移す

400 μL バッファー RW2※1
≥ 10,000 x g (室温: 20 ~ 25℃) 30 s
カラムを新しいコレクションチューブ
(2.0mL) に移す

フルスピードで遠心 (室温: 20 ~ 25℃)
1 min
カラムを新しいコレクションチューブ
(1.5mL) に移す

50 μL バッファー RE
(注: メンブレンの中央に添加)
≥ 10,000 x g (室温: 20 ~ 25℃) 1 min
FastGene™ RNA binding column
廃棄後 溶出液を回収

プロトコル II

他社RNA抽出キット
+ FastGene™ miRNA Enhancer

< 1×10⁵ 培養細胞

350 μL Buffer Lysis Buffer
添加後十分にホモジナイズ



14,000 rpm (室温: 20 ~ 25℃) 2 min
上清を新しいコレクションチューブに移す

350 μL FastGene™ miRNA
enhancer solution
ピペティングで混合

columnに最大700 μLまでの
サンプル溶液を添加
14,000 rpm (室温: 20 ~ 25℃) 1 min
ろ液廃棄後 カラムを元のコレクション
チューブ (2.0mL) に戻す

500 μL バッファー Wash Buffer
14,000 rpm (室温: 20 ~ 25℃) 1 min
ろ液廃棄後 カラムを元のコレクション
チューブ (2.0mL) に戻す

500 μL バッファー RPE
14,000 rpm (室温: 20 ~ 25℃) 2 min
カラムを新しいコレクションチューブ
(2.0mL) に移す

フルスピードで遠心 (室温: 20 ~ 25℃)
1 min
カラムを新しいコレクションチューブ
(1.5 mL) に移す

RNaseフリー水 (30~50 μL)
(注: メンブレンの中央に添加)
14,000 rpm (室温: 20 ~ 25℃) 1 min
column 廃棄後 溶出液を回収

miRNAのみを回収したい場合

プロトコル III

FastGene™ RNA Premium kit
+ FastGene™ miRNA Enhancer

< 1×10⁵ 培養細胞

350 μL バッファー RL※1
添加後十分にホモジナイズ



FastGene™ RNA filter columnに
ライゼート添加
≥ 10,000 x g (室温: 20 ~ 25℃) 1 min
FastGene™ RNA filter column廃棄後
ろ液を回収

350 μL 70% エタノール
ピペティングで混合



FastGene™ RNA binding column に
最大700 μLまでのサンプル溶液を添加
≥ 10,000 x g (室温: 20 ~ 25℃) 1 min
ろ液を回収

400 μL FastGene™ miRNA enhancer
solution
ピペティングで混合



FastGene™ RNA mini-elute columnに
サンプル溶液を添加
≥ 10,000 x g (室温: 20 ~ 25℃) 1 min
ろ液廃棄後 カラムを元のコレクションチューブ
(2.0 mL) に戻す

400 μL バッファー RW2※1
≥ 10,000 x g (室温: 20 ~ 25℃) 30 s
カラムを新しいコレクションチューブ (2.0 mL)
に移す

400 μL バッファー RW2※1
≥ 10,000 x g (室温: 20 ~ 25℃) 30 s
カラムを新しいコレクションチューブ (2.0 mL)
に移す

フルスピードで遠心 (室温: 20 ~ 25℃) 1 min
カラムを新しいコレクションチューブ (1.5mL)
に移す

50 μL バッファー RE
(注: メンブレンの中央に添加)
≥ 10,000 x g (室温: 20 ~ 25℃) 1 min
FastGene™ RNA mini-elute column
廃棄後 溶出液を回収

FastGene™ miRNA エンハンサーの何がすごい?

リアルタイムPCRの条件

● miR-21 解析に用いたステムループ RT プライマーと cDNA 合成 (Cell line・human white blood cell・FFPE 検体で使用)

● Stem- Loop RT-primer sequences 5' →3'

miR-21
GTCAGAGGAGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCTCCTCTGACTCAACA

● Reverse Transcript → cDNA

Transcriptor RT Reaction Buffer (5×) (Roche)	2	μL
Stem-Loop RT-primer (10 μM)	0,2	μL
Transcriptor Reverse Transcriptase (20 U/μL) (Roche)	0,25	μL
Protector Rnase Inhibitor (40 U/μL) (Roche)	0,25	μL
Deoxynucleotide Mix (10 mM) (Roche)	1	μL
RNA solution	2,5	μL
Water	3,8	μL

→ 反応産物を TE buffer で 5 倍希釈して、
以降の反応に使用した

● Reaction condition

16 °C	30 min	} 60 cycles
30 °C	30 s	
42 °C	30 s	
50 °C	1 s	
85 °C	5 min	

● miR-21 解析に用いたリアルタイム PCR 時のプライマー配列、プローブ、反応条件および反応液

● Primer sequences (5' →3') and Probe

miR-21
Forward primer GATCGGTAGCTTATCAGACTGATG
Reverse primer GTGCAGGGTCCGGGTAAT
Universal Probelibrary Probe (Roche) #82

● Reaction mixtures

2,5 μL of cDNA solution
5 μL of Essential Probe Master (Roche)
0,4 μM of each primer
0,4 μM of UPL probe (Roche)
(in a final volume of 10 μL)

反応は LightCycler 96 (Roche) で実施した。2 重測定の前平均値を測定値とした。

● Reaction conditions

95 °C	10 min	} 40 cycles
95 °C	10 sec	
60 °C	30 sec	

● bta-miR-23a 解析に用いたステムループ RT プライマーと cDNA 合成 (Bovine muscleで使用)

● Stem- Loop RT-primer sequences 5' →3'

bta-miR-23a
CTCAACTGGTTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGTGGAAATC *
*Guan L *et. al.* : *Sci Rep*, 7: 43716, 2017

● Reverse Transcript → cDNA

Transcriptor RT Reaction Buffer (5×) (Roche)	2	μL
Stem-Loop RT-primer (10μM)	0,2	μL
Transcriptor Reverse Transcriptase (20 U/μL) (Roche)	0,25	μL
Protector Rnase Inhibitor (40 U/μL) (Roche)	0,25	μL
Deoxynucleotide Mix (10 mM) (Roche)	1	μL
RNA solution	2,5	μL
Water	3,8	μL

→ 反応産物を TE buffer で 5 倍希釈して、
以降の反応に使用した

● Reaction condition

16 °C	30 min	} 60 cycles
30 °C	30 s	
42 °C	30 s	
50 °C	1 s	
85 °C	5 min	

● bta-miR-23a 解析に用いたプライマー配列、反応条件および反応液

● 1 Primer sequences (5' →3') *

bta-miR-23a
Forward primer CCGAGTCAGATCACATTGCCAGG
Reverse primer CTCAACTGGTTCGTGGAGTCG
*Guan L *et. al.* : *Sci Rep*, 7: 43716, 2017

● Reaction mixtures

2,5 μL of cDNA solution
5 μL of KAPA SYBR Fast qPCR (KAPA)
0,4 μM of each primer
(in a final volume of 10 μL)

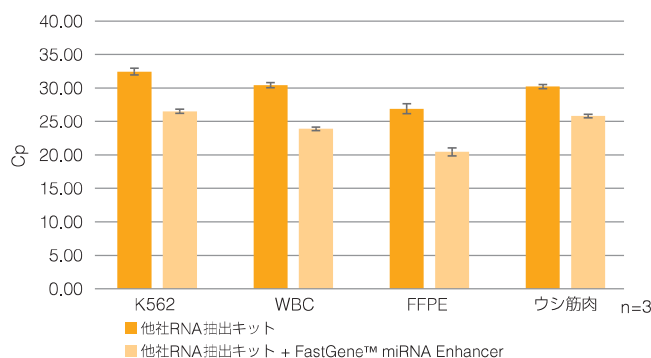
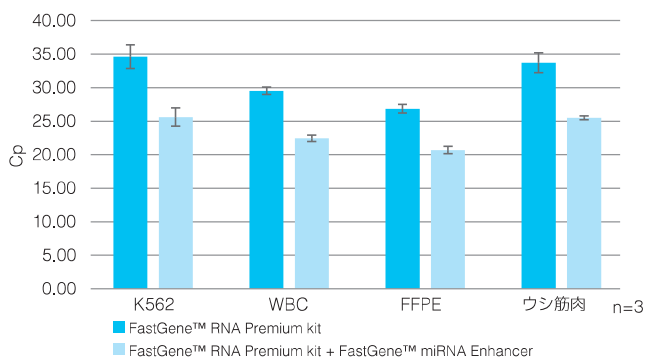
反応は LightCycler 96 (Roche) で実施した。2 重測定の前平均値を測定値とした。

● Reaction conditions

95 °C	10 min	} 40 cycles
95 °C	10 sec	
60 °C	30 sec	

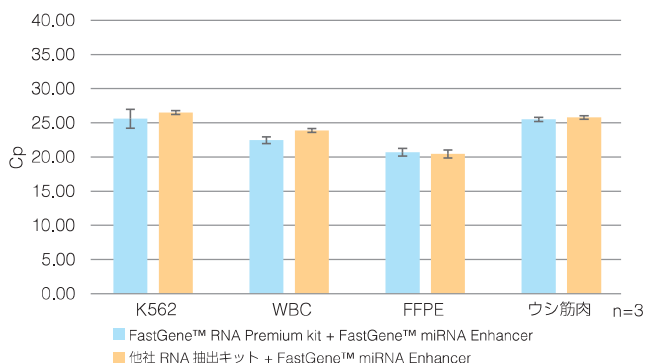
結果

● IIの protocols を使用：FastGene™ miRNA Enhancer を使用・未使用の際のリアルタイムPCRによるCp値の評価



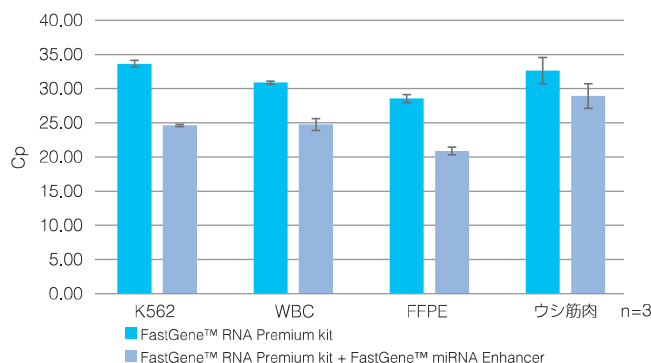
どのキットにおいてもFastGene™ miRNA Enhancerを加えることによりmiRNAの収量が向上した。

● IIの protocols を使用：FastGene™ miRNA Enhancerを使用した際のリアルタイムPCRによるCp値の評価



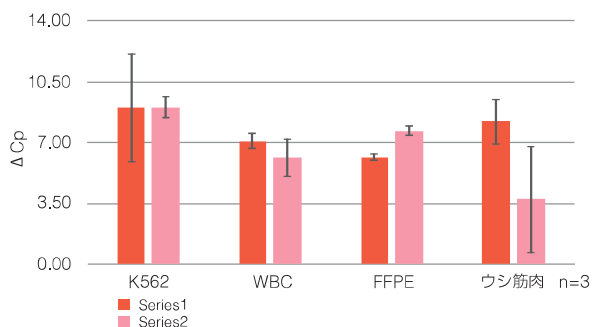
どのキットにおいてもIIの protocols を使用した際のCp値は同程度だった。

● IIIの protocols を使用：様々なサンプルを使用した際のリアルタイムPCRによるCp値の評価



どのサンプルにおいてもIIIの protocols を使用することによりmiRNAの収量が向上した。

● IとIIIの protocols を使用：ΔCpの評価



Iの protocols を使用した場合でも、IIIの protocols を使用した場合でも、miRNAの抽出量は同程度だった。

ΔCpの算出方法 $\Delta Cp = (\text{FastGene™ miRNA Enhancer 未使用の際のCp値}) - (\text{FastGene™ miRNA Enhancer 使用の際のCp値})$

● まとめ

FastGene™ miRNA Enhancerを加えることにより、どちらのキットを用いてもmiRNAの収量が向上しました。また、カラムを通す回数が異なっても、miRNAの抽出量は同程度であることがわかりました。



お客様の声

当検査室ではFFPEや腹膜透析液排液を検体としてmiRNAを抽出した、経験がありますが、やはり解析に十分な量の抽出が困難な例がありました。そんな際にこの試薬の活用は有効であると思いました。FastGene™シリーズのRNA抽出試薬は純度・収量が優れていることから、この試薬と組み合わせることで他社のmiRNA抽出専用試薬と同等以上の効果が期待できると思います。