

PolyATtract® mRNA Isolation Reagentsを使ったPoly(A)+ mRNAの自動化ロボットによる単離



By Rich Rhodes, B.S., and Daniel Kephart, Ph.D.
Promega Corporation

生物試料からのpoly(A)+ mRNAの単離と解析は、さまざまな研究のアプリケーションで日常的に行われています。さまざまな種類の細胞、異なる薬剤、測定時点を含む発現プロファイルの研究は、ハイスループットのRNA精製の方法論を必要とします。プロメガでは、多様なアプリケーションに対応するRNAの単離と解析のためのテクノロジーを提供します。本稿では、組織培養細胞をモデルとし、PolyATtract® mRNA Isolation SystemとStreptavidin MagneSphere® Paramagnetic Particles (SA-PMPs)を使ったpoly(A)+ mRNAの自動化ロボットによる精製について紹介します。単離したmRNAはRT-PCRを用いた増幅により解析しました。さらに、単離する過程において検出可能な相互汚染が起らないことを示しました。

はじめに

RNAの単離とそれに続くRT-PCRによる解析は、基礎的な研究と同様にさまざまな臨床診断や創薬研究のアプリケーションにも広く使われています。mRNAは細胞内遺伝情報の移行において中心に位置するため、mRNAの単離と解析は遺伝子を基にした研究において重要です。セルベースモデルでリード化合物の初期スクリーニングが頻繁に行われている創薬研究でも、mRNAの単離と解析は極めて重要なテクニックです。このような研究では、目的の標的遺伝子の発現プロファイリングにより治療における化合物の効力や作用機序に関する有用な情報が得られるかもしれません。mRNAの単離と解析は、白血球の機能不全に関わる染色体の再構築のような分子レベルの病態の診断にも役立てることが出来ます(1-3)。

化学物質の大きなライブラリーや多検体の基盤研究では頻りに数百から数千のサンプルからのmRNAの単離が必要になります。このような規模でのmRNAの単離は、かなりの人手と試薬を必要とするきわめて集約的な労働となり得ます。Streptavidin MagneSphere® Paramagnetic Particles (SA-PMPs)は、ビオチン化oligo(dT)プローブにアニーリングしたpoly(A)+ mRNAを捕獲するために使われます。いったん磁気で捕獲し、不純物を取り除くためにSA-PMP:mRNA複合体を洗浄します。そして、低イオン強度のバッファーで高精製度のRNAを溶出します。SA-PMPsは、その操作性の特性により、自動化されたロボットのプラットフォームにうまく適用することができます。プロメガではMagnaBot™ 96 Magnetic Separation Device (カタログ番号 V8151)とPolyATtract® mRNA isolation Systemの試薬を組み合わせ、"open plate"形式でmRNAサンプルの単離を行いました。この構成では約1時間で96サンプルからのRNA単離を同時に行えます。プロメガでは完全な手作業を省いた"単離"の方式をBiomek® 2000 robotics workstation (Beckman Instruments, Inc.)を使って実行しました。単離されたRNAは、臨床医療に有効である白血球の機能不全に関する標的を用いたRT-PCRによってテストしました。

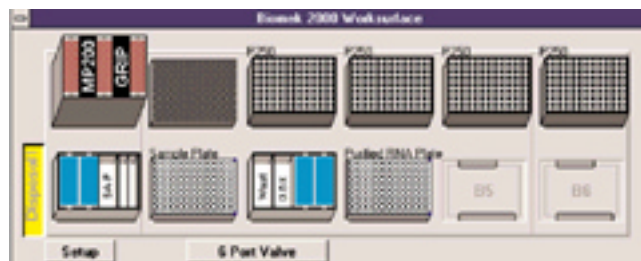


図1. Biomek® 2000ワークステーションのデッキの設定

表1. Biomek® 2000 Roboticsワークステーションを使うときに必要な実験機器と実験器具

実験機器	実験器具	
	チップ	プレート
MagnaBot™ 96 Device	P250チップ(4箱)	V底96ウェルプレート(2)
Biomek® MP250 Tool		Quarter reservoir(3)
Biomek® Gripper Tool		Quarter reservoir divided vertically(1)

K562細胞からのPoly(A)+ mRNAの単離

PolyATtract® mRNA Isolation Systemに含まれる試薬とプロメガのMagnaBot™ 96 Magnetic Separation Deviceは、Biomek®のワークステーションと組み合わせて使用しました。自動化プロトコールには表にリストした実験機器および標準的な実験器具が必要です。図1は、この実験をBiomek®ワークステーションで行なった場合のデッキのレイアウトを示しています。

この試薬セットを標準的なV底の96ウェルプレートで使った場合の操作方法を図2に示します。組織培養細胞は1ウェル当たり約50,000cellsとなるよう20μlずつをプレートに加えました。細胞溶解液中に存在するpoly(A)+ mRNAに結合させるため、ビオチン化oligo(dT)を含んだ65°CのHybridization Bufferを各ウェルに加えました。溶液中に存在するoligo(dT):mRNA複合体を捕らえるために75μlのSA-PMPsを加えました。次に、SA-PMPs:mRNA複合体を捕らえるためにプレートをMagnaBot™ 96 Deviceの上に置きました。細胞溶解液を除いた後、不純物を除くためにSA-PMPsを0.5×SSCで洗浄しました。処理を行ったプレートをMagnaBot™ 96 Deviceから降ろし、Nuclease-Free Waterを加えることでSA-PMPsからmRNAを遊離させました。以降の実験のために単離したmRNAをクリーンな96ウェルプレートに移しました。96サンプルにかかる全操作時間はおよそ1時間です。単離後のサンプルは保存することもできますし、すぐに解析に使うこともできます。

RNAの機能解析

慢性骨髄性白血病 (chronic myelogenous leukemia; CML) の遺伝学的特徴は、フィラデルフィア染色体 (Ph chromosome) と呼ばれる *abl* と *bcr* 遺伝子 (9;22) (q34;q11) の間における相互の転座です (1-3)。CML を発症した Ph 陽性の患者では 95% 以上、CML と診断された Ph 陰性の患者では 30~50%、急性リンパ性白血病 (acute lymphoblastic leukemia; ALL) と診断された患者では 10~20% の割合で *bcr-abl* の転座が見られました (1, 4-5)。これらの研究と関連して、プロメガでは K562 細胞の Ph 陽性細胞から mRNA を単離しました (6)。*bcr-abl* の転座はサザンブロット解析でルーチンに検出されます (7-8) が、RT-PCR ではより簡単に高感度に行えます (9-10)。プロメガでは Ph 陽性の K562 細胞に存在する *bcr-abl* 融合転写産物を検出するために転座の区切り点にわたる RT-PCR プライマーを使いました。このプライマーセットによってゲノム DNA は増幅されません (データは未掲載)。



図2. Biomek® 2000 ワークステーションと PolyATtract® mRNA Isolation System を使った自動化 RNA 精製の流れ

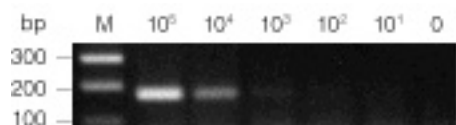


図3. 細胞数を減少させていったときの K562 cells から単離した mRNA の RT-PCR 解析

本稿で紹介した自動化ロボット精製プロトコールを使って、図に示した数の細胞から mRNA を単離した。RT-PCR は溶出された RNA から 1 µl を用いて、プロメガの Access RT-PCR System® (カタログ番号 A1250, A1260, A1280) を用いて実施した。使用したプライマーセットは *bcr-abl* 融合 mRNA 転写産物に特異的であり、以下の配列を持つ。上流プライマー、GGAGCTGCAGATGCGACCAAC。下流プライマー、GCTACTGGCCGCTGAAGGGC。RT-PCR のサイクル条件は、48°C で 45 分を 1 サイクル、94°C で 2 分を 1 サイクル、次に 94°C で 0.5 分、60°C で 1 分、68°C で 1 分を 35 サイクル、最後に 68°C で 7 分の伸長後、4°C に保持した。増幅後の反応液を等量ずつ取り、1.5% アガロースゲルで電気泳動した。
レーン M : 100 bp DNA Ladder (カタログ番号 G2101)。

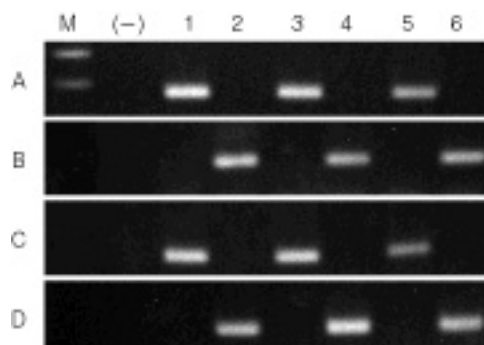


図4. K562 cells から単離した mRNA の RT-PCR 解析

自動化精製のクロスコンタミネーションを評価すると同時に、単離された mRNA の品質を調べるために「チェッカー盤」実験を行った。50,000 cells から調製した細胞溶解液または 0 µl の PolyATtract® GTC Extraction Buffer のみを含んだ交互のウェルから mRNA の単離を試みた。文中に示した自動化ロボット精製プロトコールにしたがって mRNA を単離し、溶出された RNA から 1 µl (500 cells にあたる) を図2に記載された条件にしたがって増幅した。プレートの列、A、B、C、D、ウェル 1~6 に由来する増幅反応液から等量ずつを分取し、1.5% アガロースゲルにて電気泳動を行った。レーン M は 100 bp の DNA ラダー (カタログ番号 G2101) を示し、レーン (-) は mRNA (-) を示す。

感度の限界

図3は、10⁴個以下の細胞から単離された mRNA の RT-PCR 解析により *bcr-abl* 融合転写産物が検出されることを示しています。図4では、単離された mRNA のパフォーマンスとサンプル間のコンタミネーションを調べるために、操作するプレートにチェッカー盤型にサンプルを配置しました。500 個の細胞に相当する RNA (溶出された RNA から 1 µl) を *bcr-abl* 融合転写産物に対する特異的なプライマーを用いて増幅しました。予測されたサイズの明瞭なバンドが Ph 陽性である K562 細胞の RNA から検出されました。RT-PCR により解析した結果、PolyATtract® GTC Extraction Buffer のみで細胞を含まないウェルを交互に置いた実験では、本実験の精製およびアッセイ条件下においてサンプル間のコンタミネーションが見られないことが示されました。

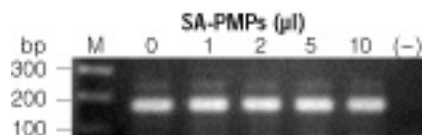


図5. 溶出液中に残った Streptavidin MagneSphere® PMPs は RT-PCR での増幅に影響しない。

K562 細胞から単離された mRNA を用いて図3に示された条件にしたがって RT-PCR を行った。示された量の洗浄した SA-PMPs を増幅前の 10 ng の精製した mRNA に加えた。各増幅反応液から等量を 1.5% アガロースゲルで電気泳動した。レーン M : 100 bp DNA Ladder (カタログ番号 G2101)。レーン (-) : RNA なし。



Streptavidin Magnesphere® PMPs は増幅に影響しない

SA-PMPsが増幅反応に含まれていてもRT-PCRに影響しないことを示すために、SA-PMPsをRT-PCR反応に加え、そのコンタミネーションのレベルを増加させた条件下で単離したK562 RNAを試験しました(図5)。単離の手順に使われたSA-PMPsの総量の3倍量までの添加では、効率的な増幅に影響しませんでした。つまり、mRNAサンプルへの過剰量の粒子のコンタミネーションはRT-PCRの効率に影響を与えません。

結論

本稿では、自動化ロボットのプラットフォーム上でpoly(A)+ mRNAを単離するための PolyATtract® mRNA Isolation Systemの試薬と Streptavidin MagneSphere® Paramagnetic Particlesの用法について紹介しました。プロメガでは、Biomek® 2000に対応し、約1時間で96サンプルからmRNAを単離できるプロトコルを開発しました。この手順ではMagnaBot™ 96 Magnetic Separation Deviceに標準的なプレートと実験器具を使って、細胞から直接mRNAを単離します。この方法により単離されたmRNAは、cDNAに変換できることやRT-PCRにより増幅できること、また増幅試験ではサンプル間のクロスコンタミネーションが検出されないことを示しました。プロメガではKingfisher™ instrument (LabSystems) を利用し、Poly(A)+ mRNA を単離するためにSA-PMPsを使っています。私達はこの一般的な手法が他の自動化プラットフォームにも適用できると考えています。本稿ではK562細胞を使ったmRNA精製方法の実施について紹介しましたが、このようなテクニックはハイスループットスクリーニングのアプリケーションに使われる多くのセルベースの系に適用できるでしょう。セルベースの系で用いられる試料は沈殿物(微粒子)が問題となりにくく、自動化精製に適しています。組織ベースのサンプルでは、ロボットによる精製の前に、遠心操作により沈殿物の問題をあらかじめ解決することが必要とされるかもしれません。プロメガのSA-PMPsを含むPolyATtract® mRNA Isolation Systemの試薬と自動化ロボットの組み合わせは、ハイスループットスクリーニングに必要なmRNAの単離効率を飛躍的に上昇させるための簡単で効率的な方法であると考えられています。

参考文献

- Rowley, J. (1973) *Nature* **243**, 290.
- Seong, D. *et al.* (1994) *Blood* **83**, 2268.
- Amiel, A. *et al.* (1994) *Cancer Genet. Cytogenet.* **76**, 59.
- Nowell, P. and Hungerford, D. (1960) *Science* **132**, 1497.
- Kawasaki, E. *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 5698.
- Lozzio, C. and Lozzio, B. (1975) *Blood* **45**, 321.
- Benn, P. *et al.* (1987) *Cancer Genet. Cytogenet.* **29**, 1.
- Shtalrid, M. *et al.* (1988) *Blood* **72**, 485.
- Heisterkamp, N. *et al.* (1985) *Nature* **315**, 758.
- Tbakhi, A. *et al.* (1998) *Hematopathology* **109**, 16.

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
Streptavidin MagneSphere® Paramagnetic Particles	(15×0.6ml) 9ml	Z5481	20,000
	25ml	Z5482	54,000
MagnaBot™ 96 Magnetic Separation Device	1個	V8151	200,000

関連製品

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
PolyATtract® System 1000 with Magnetic Stand	scalable	Z5420	69,000
PolyATtract® System 1000 without Magnetic Stand	scalable	Z5400	59,000
PolyATtract® System 1000 Magnetic Separation Stand	1個	Z5410	15,000
Access RT-PCR System ^(a)	100回分	A1250	76,000
	500回分	A1280	300,000
Access RT-PCR Introductory System ^(a)	20回分	A1260	19,000
Biotinylated Oligo(dT) Probe (50 pmol/μl)	35μl	Z5261	¥8,000

編集者から：本稿で示しましたカスタム化した自動化mRNA精製アプリケーションに関する試薬は、PolyATtract® mRNA Isolation Systemのバルク製品のコンポーネントとして供給されます。本システム、またはプロメガ製品をご使用の際のカスタムアプリケーションに関する情報は弊社までお問い合わせください。またHTSに関する製品群の詳細は www.promega.com/hts でご覧になれます。

^(a)The PCR process is covered by patents issued and applicable in certain countries. Promega does not encourage or support the unauthorized or unlicensed use of the PCR process. Use of this product is recommended for persons that either have a license to perform PCR or are not required to obtain a license.