

High-Performance RNA Isolation Using the Maxwell™ 16 Total RNA Purification Kit

Maxwell™ 16 Total RNA Purification Kitを用いたパフォーマンスの高いRNA精製

By Dan Kephart, Ph.D., Terri Grunst, B.S., M.B.A., Steve Krueger, B.S.ChE, Katharine Hoffmann, B.S., and Hemanth Shenoi, Ph.D., Promega Corporation

アブストラクト

Maxwell™ 16 integrated systemは、コンパクトな機器、最適化された自動精製法、試薬がプレバックされたカートリッジおよびサービス・サポートを統合したシステムで、時間の節約、生産性および結果の一貫性を向上させます。我々は様々なサンプル（哺乳動物組織、真核生物細胞、白血球、植物葉）からの高純度Total RNAの精製やRNAのクリーンアップなどのアプリケーションにも使用できるMaxwell™ 16 Total RNA Purification Kitを開発しました。Maxwell™ 16 Instrumentを用いて、前処理したサンプルから手動操作の不要な自動精製により約30分で最大16サンプルの処理を行うことができます。精製されたRNAは沈殿操作やDNase処理、精製後処理を行わずにそのまま次の分析に使用することができます。本稿ではTotal RNA精製のための統合されたMaxwell™ 16 Systemの使用例について説明します。

イントロダクション

標的RNAの精製および分析は、細胞内の遺伝子レベルの発現情報をモニタリングするために使用される最も重要なテクニックの1つです。代謝要求や環境面での刺激に対する応答として細胞増殖中に認められる遺伝子発現のダイナミックな変化をモニタリングするための定量RT-PCR (qRT-PCR) またはマイクロアレイ分析などのアプリケーションでは、精製RNAが日常的に使用されます。良質のRNAの単離は、それに続く有意な実験情報取得のための土台となるステップである一方、実際のRNA単離は面倒、複雑で手間のかかる作業です。ハイスループットスクリーニングを行う研究者はRNA精製の処理量を上げ、手間を抑えるために自動化を試みる場合があります。Maxwell™ 16 Systemはロースループットからミドルスループットユーザーのニーズを満たすために開発され、過大な設備投資、トレーニング、メインテナンスを必要とせず、仕事量に合った自動精製を可能にします(1)。さらにMaxwell™ 16 Systemは実験室の隔離された場所での使用やハイスループット作業を行う研究室で補完的なロースループット~ミドルスループット自動処理を求める場合にも有用です。

Maxwell™ 16 Total RNA Purification KitはRNAを収率良く精製するための試薬がプレバックされたカートリッジを使用し、RNAから混入したゲノムDNAも効率的に除去します。プレバックされたMaxwell™ 16 RNA Purification reagent cartridgeに加え、Maxwell™ 16 Instrumentを用いる自動化法はそれぞれ専用のカートリッジを用いたゲノムDNAまたはTotal RNAの精製をシンプルな操作で実施することができます。最新のMaxwell™ 16 Instrument自動精製法（プログラム）は、すでにご利用の方のニーズ変更に合わせて無償で提供しています。本稿ではMaxwell™ 16 Systemの特長に焦点をあて、Total RNAの精製・分析を行う上での事例を紹介します。

Maxwell™ 16 RNA精製の原理

Maxwell™ 16 Instrumentは実験室において無駄なスペースを取らないようコンパクトに設計されています（図1）。最適化された精製プログラムは装置に予めインストールされています。研究室に到着後、包装を解いてから精製の準備までを約20分以内に完了することができます。

インタクトなTotal RNAの精製を成功させるには、サンプルの迅速な破碎、内在性のリボヌクレアーゼの不活性化、混入DNAの除去、インタクトなRNAの取得が要求されます。Maxwell™ 16 Total RNA Purification Kitのプロトコルでは、クリアライセートを調製するために約15分間の前処理を行います。最初のステップではサンプルを溶解するためにグアニジンチオシアネート（GTC）を含むRNA Lysis Bufferを用います(2)。GTCは、核タンパク質複合体を破壊し、サンプル中のRNAの完全性を保護するためにリボヌクレアーゼ活性を効率的に阻害するカオトロピック塩です(3)。次にサンプルへRNA Dilution Bufferを加えてサンプル残渣を沈殿させ、新規なClearing Agentの添加により混入したゲノムDNAを除去します。一時的に65℃に加熱した後、添付されているスピニングカラムを用いた遠心によりサンプルを清澄化します。クリアライセートを試薬がプレバックされたカートリッジの1番目のウェルに直接添加します。有機溶媒抽出によるTotal RNA精製法からの水層やin vitro転写反応からのRNAクリーンアップも同様のプロトコルで実施することができます（データ未掲載）。

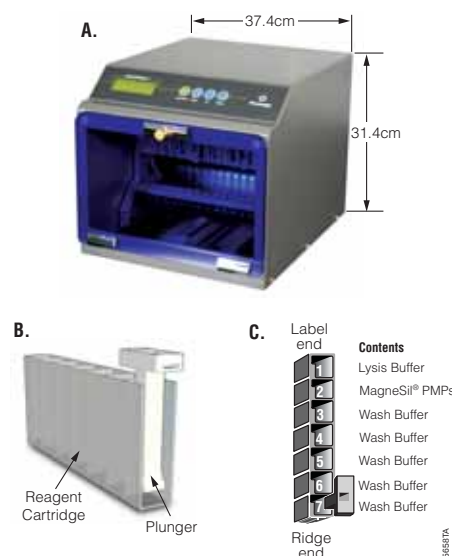


図1. Maxwell™ 16 System

Maxwell™ 16 System Instrument（パネルA）は、最大のパフォーマンスと利便性を追求するために最適化された試薬がプレバックされたカートリッジ（パネルBおよびC）を使用。

Maxwell™ 16 Total RNA Purification Kitの機能性は、Total RNA Purification cartridgeのウェル内に分注された磁性体粒子の連続した捕捉と放出がベースになっています。RNAはMagneSil® Paramagnetic Particles (PMPs) により効率的に捕捉され、アルコールを含むwash bufferによる洗浄を繰り返すことにより効果的に不純物が取り除かれます。精製されたTotal RNAはPMPからNuclease-Free Waterに溶出され、沈殿操作や長時間のRNA再水和操作を必要とせず多くのアプリケーションで直接使用することができます。

表1. Maxwell™ 16 Total RNAカートリッジを用いて組織、細胞から精製したTotal RNAの収量および純度

サンプル	処理量	収量(µg)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀
Mouse Liver	25mg	100	2.12
Mouse Liver	50mg	233	2.12
Mouse Brain	50mg	29	2.08
Mouse Heart	50mg	23	2.11
Mouse Intestine	50mg	128	2.09
Mouse Kidney	50mg	83	2.09
Mouse Lung	50mg	22	2.12
PAXgene® Tube Collected Blood Sample	1 tube	5	1.8
HeLa Cells	5 × 10 ⁶	47	2.13
Tomato Leaf	100mg	33	2.19

優れたパフォーマンス

Maxwell™ 16 Total RNA Purification Kitは、Total RNAの精製を効率的に行うシステムを提供します。このシステムは、広範なTotal RNA 含量幅を持つ様々なサンプルからRNAを効率的に精製します(表1)。多くの組織タイプで最大50mgをRNA Lysis Buffer中で機械的なせん断により破碎して精製操作に用いることができます。また、本システムは安定化血液、全血からの白血球画分、植物葉組織からのTotal RNA精製にも使用することができました(表1)。その他の様々なサンプルタイプからのRNA精製用に最適化されたプロトコルは、Maxwell™ 16 Total RNA Purification Kit Technical Bulletin #TB351に記載されています(2)。

Maxwell™ 16 Total RNA Purification KitのRNA収量は、同等のシステムに比べ2~4倍多く得られます。例えば、吸光度260nmで測定したマウス肝臓からの収量は、50mg組織あたりRNA 200µg以上です。全てのサンプルから精製したRNA純度は高く、A₂₆₀/A₂₈₀比で通常2.0以上の値が得られました。表1にリストされたRNAの質を評価するために、各サンプルの一部を変性条件下でのアガロースゲル電気泳動により分離し、エチジウムブロマイド染色により可視化しました(図2)。アガロースゲル可視化による方法はRNAの完全性を評価する上でマイクロ流体ベースの方法に比べてより正確です。各レーンのリボソームバンドの明瞭な形状から、精製されたRNAが良質でインタクトであることが示されました。

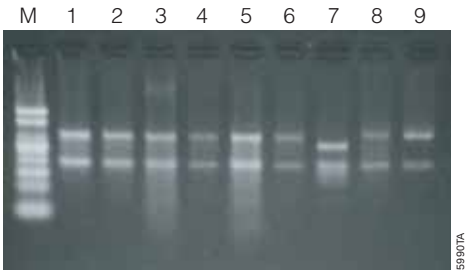


図2. Maxwell™ 16 Total RNAカートリッジを用いて精製したTotal RNAのアガロースゲル分析

表1にリストされた組織から精製したTotal RNA。各サンプルから分取し、1.2%アガロースゲル電気泳動(変性条件下)で分離し、エチジウムブロマイド染色により可視化した。レーン1, マウス脳; レーン2, マウス心臓; レーン3, マウス腸; レーン4, マウス腎臓; レーン5, マウス肝臓; レーン6, マウス肺; レーン7, トマト葉; レーン8, PAXgene®; レーン9, HeLa細胞; レーンM, RNA Markers (カタログ番号 G3191)。

安定した結果

Maxwell™ 16 Total RNA Purification Kitの安定したパフォーマンスを示すために25mgのマウス肝臓ライセートを精製に使用しました。得られたRNAサンプルを吸光度A₂₆₀測定により分析し、収量をプロットしました（図3、パネルA）。収量は非常に安定しており、サンプルあたり平均で約100μgのRNAが得られました。また、精製RNA収量の安定性を示すために各サンプルをアガロースゲル電気泳動法でも分析しました（データ未掲載）。広範なサンプル処理量幅でRNA回収率が直線であることを示すために、マウス肝臓ライセート量を増加させながらRNAを精製しました（トリプリケート）。増加する組織量に対するRNA回収量（A₂₆₀での吸光度を測定）の分析では、検討した組織量幅において直線的な相関性を明示しました（図3、パネルB）。

DNA混入の無いRNA

RNAサンプルに混入するDNAは下流での分析結果を複雑化します。多量の混入DNAは分光光度分析によるRNAサンプルの定量を不正確にする原因となります。さらに重要な点として、qRT-PCRなど非常に敏感な増幅ベースの分析法では、わずかなレベルのゲノムDNA混入でもアプリケーション結果の質を変動させ、信頼性を低下させることにもなりかねません。

Maxwell™ 16 Total RNA Purification Kitでは、Total RNAの精製前にゲノムDNAを除去する新規な方法を採用しています。このテクニックの効果を示すためにエンドポイントPCRおよびPlexor™ qPCR Systemの両方でRNAサンプル内のゲノムDNA検出を試みました（図4）。Plexor™ qPCRアッセイでは、マウスGAPDHイントロン配列を特異的に定量するためにデザインした増幅プライマーを用いました。これらマウス肝臓RNA 24検体のPlexor™ qPCR分析では、4つのサンプルのみに検出可能なゲノムDNAの痕跡が認められました。これら4つの反応にはマウスゲノムDNAが0.6～0.9コピー含まれており、平均（n=24）するとMaxwell™ 16で精製したRNA100ngあたり0.1コピー以下のゲノムDNAに相当します。また、各マウス肝臓RNAサンプルを分析した結果、エンドポイントPCRによる40サイクルの増幅ではゲノムDNAの混入は検出されませんでした。これはDNase除去法よりも混入するゲノムDNAが100～1000倍低いことを示していました。

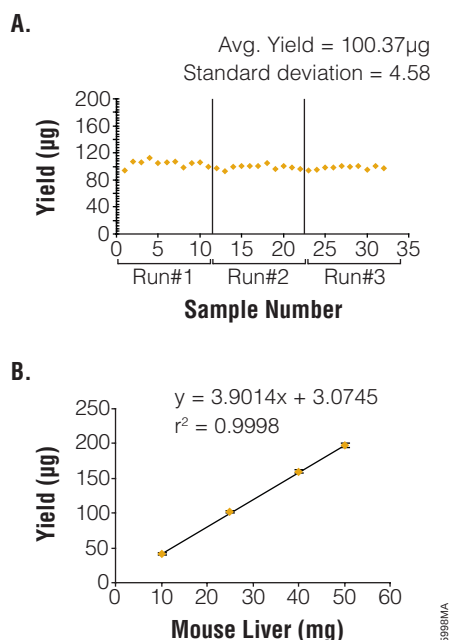


図3. 精製したTotal RNAの安定した収量と安定性

パネルA. Maxwell™ 16 Total RNAカートリッジを用いてTotal RNAを精製することにより再現性のある安定した収量が得られた。Total RNAは25mgマウス肝臓ライセートを用いて、1回で少なくとも10サンプルの運転を3回行った。各精製サンプルのTotal RNA収量は260nmでの吸光度測定により検出し、得られた値をプロットした。平均収量は100.37μg（標準偏差4.58μg）。パネルB. 処理量とRNA収量の直線関係。Total RNAはマウス肝臓ライセート10、25、40および50mgから精製した（各ポイント n=3）。Total RNA収量は260nmにおける吸光度により求め、精製に使用したマウス肝臓組織量に対してプロットした。

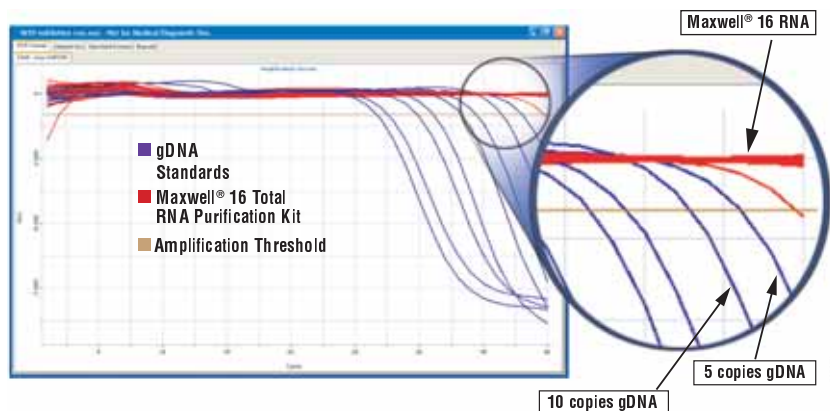


図4. ゲノムDNAの混入は検出限界以下

25mgマウス肝臓ライセート24サンプルからRNAを精製し、エンドポイントPCRおよびqPCRで分析した。増幅曲線は、Plexor™を用いたGAPDHイントロン特異的な定量により、ゲノムDNAスタンダード反応からの10、50、100、500、1,000、10,000コピーおよび25mgマウス肝臓から個々に調製した24サンプルから精製したRNA 100ngに含まれるゲノムDNAの混入量を示した。個別に精製したRNA24サンプルに含まれる平均した混入ゲノムDNA量は、Maxwell™ 16で精製したRNA 100ngあたり0.1コピー。

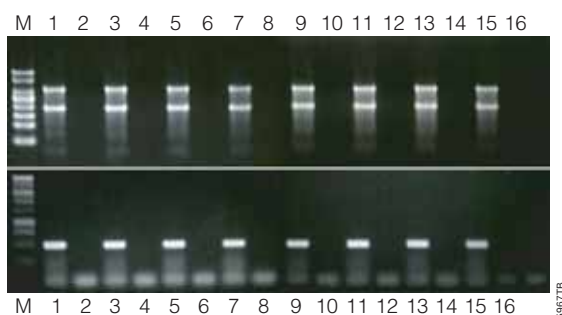


図5. クロスコンタミネーションは検出限界以下

マウス肝臓ライセート 25mg (奇数レーン) またはSV RNA Lysis Bufferのみ (偶数レーン) から成る16サンプルを用いて精製を行った。パネルA. 精製後のサンプルからそれぞれ4μlを1.2%アガロースゲル電気泳動 (変性条件下) で分離した。レーンM, RNA Marker (カタログ番号 G3191)。パネルB. 各サンプルから等量ずつ (1μl) を、β-アクチンRNAの一部に特異的なプライマーペアを用いたエンドポイントRT-PCRで増幅した。各増幅反応から5μlを分取し、1.2%アガロースゲル電気泳動で分析し、エチジウムブロマイドにより染色した。各反応で様々な量のプライマー-ダイマーが観察された。レーンM, 1kb DNA Ladder (カタログ番号 G5711)。

最適化された自動化システム

使い捨て方式の試薬プレバック-カートリッジとMaxwell™ 16 Systemの最適化された自動化法により、サンプル処理中のクロスコンタミネーションに対して強力なバリアーが施されています。検出可能なクロスコンタミネーションが無いことを示すために、マウス肝臓ライセート25mgおよびRNA Lysis Bufferのみを交互に添加した16サンプルから精製した。精製後、各サンプル4μlを変性条件下、アガロースゲルにより分離しました (図5、パネルA)。また、各サンプルから1μl分取し、β-アクチンRNA領域に特異的なプライマーを用いてエンドポイントRT-PCR分析を行いました。増幅35サイクル後、各サンプル5μlをゲル電気泳動により分析しました (図5、パネルB)。その結果、サンプル間でのクロスコンタミネーションは検出されませんでした。

結論

Maxwell™ 16 systemは、コンパクトな機器、最適化した自動精製法、プレバックされた試薬カートリッジおよび技術サポートを統合したシステムで、時間の節約、再現性の向上、安定した精製結果を実現します。コンパクトで簡単操作のMaxwell™ 16 Instrumentは最大のパフォーマンスを示し、ロースルーブットからミドルスルーブットの生体分子の精製を簡便にします。Maxwell™ 16 Total RNA Purification Kitは、最大50mg哺乳動物組織、 5×10^6 真核生物組織培養細胞あるいは100mg植物組織からDNAの混入の無いTotal RNAを高収率、安定に精製することができます。また、本システムは全血からの白血球画分からのTotal RNA精製にも使用できます (例. PAXgene® tubes)。また、qRT-PCR分析により、RNA 100ngあたり0.1コピー以下のレベルまでゲノムDNAを除去していることが示されました。

参考文献

1. Kephart, D. *et al.* (2006) *Promega Notes* **92**, 20–23.
2. Maxwell™ 16 Total RNA Purification Kit Technical Bulletin #TB351, Promega Corporation.
3. Chirgwin, J. *et al.* (1979) *BioChem.* **18**, 5294–9.

プロトコル

- ◆ Maxwell™ 16 Total RNA Purification Kit Technical Bulletin #TB351, Promega Corporation
www.promega.com/tbs/tb351/tb351.html

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
Maxwell™ 16 Total RNA Purification Kit	48 preps	AS1050	38,400
Maxwell™ 16 Instrument	1 each	AS1000	2,000,000

Maxwell™ 16 Systemはさらに・・・

Maxwell™ 16 Integrated Systemは、大腸菌、哺乳動物細胞あるいは昆虫細胞からポリヒスチジンタグ 組換えタンパク質を精製することもできます。安定したパフォーマンスおよび純度を犠牲にすること無く、時間を節約することができます。詳細については24ページまたは、www.promega.com/maxwell16/ をご覧下さい。